



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS

DOCTORADO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

**Estructura Genética y Filogeografía del Lobo Marino de California
(*Zalophus californianus californianus*) en Aguas Adyacentes a la
Península de Baja California, México**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

YOLANDA SCHRAMM URRUTIA

Ensenada, Baja California, noviembre de 2002

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
POSGRADO EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

**Estructura Genética y Filogeografía del
Lobo Marino de California (*Zalophus californianus californianus*)
en Aguas Adyacentes a la Península de Baja California, México**

TESIS QUE PRESENTA
Yolanda Schramm Urrutia

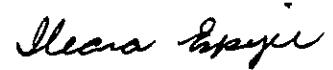
APROBADA POR



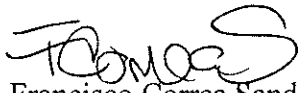
Dr. Jorge de la Rosa Vélez
Presidente del Jurado



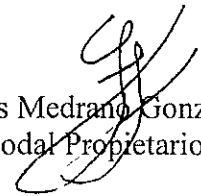
Dra. Sarah L. Mesnick
Sinodal Propietario



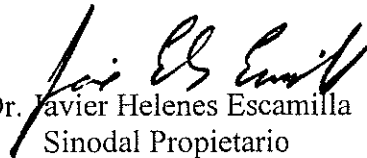
Dra. Ileana Espejel Carbajal
Sinodal Propietario



Dr. Francisco Correa Sandoval
Sinodal Propietario



Dr. Luis Medrano González
Sinodal Propietario



Dr. Javier Helenes Escamilla
Sinodal Propietario

RESUMEN

El lobo marino de California *Zalophus californianus californianus* es el pinnípedo más abundante y de distribución más amplia en México; fue aprovechado desde hace por lo menos dos mil años por los antiguos pobladores de la región y se cazó comercialmente por más de 150 años. Desde 1982 se encuentra en veda por el gobierno de México, pero se utiliza ilegalmente y existe una gran interacción con diversas pesquerías, lo que provoca una mortandad accidental e intencional. El lobo marino de California es capaz de desplazarse grandes distancias (~2000 Km), y presenta diferentes niveles de dispersión a lo largo de su distribución. Sin embargo, no se conoce un patrón de migración definido, lo que dificulta conocer la estructura de la población. Aunque existen evidencias de una población subdividida, los resultados no son conclusivos y; por lo tanto, no ha sido posible realizar acciones de conservación efectivas.

Se investigó el grado de estructuración y variabilidad genética de la población actual y la filogeografía de *Z. c. californianus*, en su distribución en México. Durante el verano de 1997 se recolectaron muestras de tejido de 177 crías, en once loberas reproductivas a lo largo de las costas de la Península de Baja California. Se secuenció un fragmento de 301 pares de bases de la región hipervariable I de la región control del DNA mitocondrial.

Se encontraron un total de 33 haplotipos, a partir de 19 sitios variables, donde el 100% de las sustituciones fueron transiciones. Se reportan niveles de diversidad genética por localidad y de manera global como diversidad haplotípica ($\hat{H} = 91.83 \pm 0.82$), diversidad nucleotídica ($\hat{\pi}_n = 1.18 \pm 0.67$) y promedio de diferencias pareadas entre haplotipos ($\hat{\pi} = 3.57 \pm 1.82$).

Con base en el análisis molecular de varianza (AMOVA), se encontró una población estructurada en cuatro grupos bien definidos ($F_{st} = 0.1098$, $P < 0.05$; $\Phi_{st} = 0.1441$, $P < 0.05$): Pacífico (islas Coronados, Benitos, Cedros, Asunción y Santa Margarita), Golfo Sur (Los Islotes), Golfo Centro (Isla San Esteban, lobera Los Cantiles en la Isla Angel de la Guarda, Isla Granito e Isla Lobos) y Golfo Norte (Isla San Jorge). De manera complementaria, se realizó un análisis jerárquico de cúmulos, con base en las similitudes genéticas, con el cual se corroboró la estructura antes descrita. Se discute la vulnerabilidad de algunos grupos y sus implicaciones para cuestiones de manejo del lobo marino como recurso natural, así como las posibles causas de la estructura.

Los resultados no son concluyentes sobre un posible efecto de un cuello de botella, por causa de la explotación.

Los métodos filogenéticos empleados (Máxima Parsimonia, UPGMA y Neighbor-Joining), no mostraron una buena resolución. Sin embargo, a partir de la red de la mínima separación (MSN, Minimum Spanning Network) se propone la filogeografía de *Z. c. californianus*.

Palabras clave: Lobo marino de California, *Zalophus californianus californianus*, estructura genética, variabilidad genética, filogeografía, Minimum Spanning Network, Baja California, México.

ABSTRACT

The California sea lion *Zalophus californianus californianus* is the most abundant and widely distributed pinniped in Mexico. It was used for about two thousand years by native Americans in the region and was commercially hunted for more than 150 years. Since 1982 it has been protected by the Mexican government, but is still illegally used and there is large interaction with several fisheries that cause accidental and intentional mortality. The California sea lion is capable of travelling large distances (~2000 Km) and has different dispersal levels along its distribution. However, the migration pattern has not been defined, and this had made it difficult to know the population's structure. Although there is some evidence of a subdivided population, the results have not been conclusive. Therefore, effective conservation actions have not been possible.

The genetic structure and variability as well as the phylogeography of *Z. c. californianus* was investigated in its present distribution in Mexico. During the summer of 1997, 177 tissue samples from pups were collected in eleven rookeries along the coasts of the Baja California Peninsula. A fragment of 301 base pairs of the hypervariable region I of the mitochondrial DNA control region was sequenced.

33 haplotypes from 19 variable sites were found, where 100% of the substitutions were transitions. Levels of genetic diversity for each locality are reported and global haplotypic diversity ($\hat{H} = 91.83 \pm 0.82$), nucleotidic diversity ($\hat{\pi}_n = 1.18 \pm 0.67$), and averages of paired differences between haplotypes ($\hat{\pi} = 3.57 \pm 1.82$).

Based on Molecular Analysis of Variance (AMOVA), a structured population with four well-defined groups was found ($F_{st} = 0.1098$, $P < 0.05$; $\Phi_{st} = 0.1441$, $P < 0.05$): Pacific (Coronados, Benitos, Cedros, Asunción and Santa Margarita islands), Southern Gulf (Los Islotes), Center Gulf (San Esteban Island, Los Cantiles rookery on Angel de la Guarda Island, Granito and Lobos islands), and Northern Gulf (San Jorge Island). In addition, a hierarchical cluster analysis was carried out based on genetic similarities, and the previously described structure was confirmed. The vulnerability of some groups is discussed, as well as the implications for the sea lions's management as a natural resource, and the possible causes for this structure.

The results are not conclusive about a possible bottleneck effect due to exploitation.

The phylogenetic methods used (Maximum Parsimony, UPGMA and Neighbor-Joining) did not show a good resolution. However, based on the Minimum Spanning Network (MSN), the phylogeography of *Z. c. californianus* was proposed.

Keywords: California sea lion, *Zalophus californianus californianus*, genetic structure, genetic variability, phylogeography, Minimum Spanning Network, Baja California, Mexico.

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco al Dr. Jorge de la Rosa por haber dirigido mi tesis, por enseñarme el fascinante mundo de la Genética, por hacer de su laboratorio un lugar de trabajo irresistible, por permitirme trabajar con mamíferos marinos y por todo su apoyo durante mis estudios de posgrado y mi incipiente carrera profesional. A mi comité de tesis, por aceptar formar parte de él, por su asesoría, apoyo y tiempo. La Dra. Sarah Mesnick (Southwest Fisheries Science Center, La Jolla, California, EUA) compartió conmigo su experiencia en el manejo de programas e interpretación de los datos; admiro su calidad humana y su pasión por los lobos marinos. La Dra. Ileana Espejel (Facultad de Ciencias, UABC) me hizo pensar en la importancia del Manejo y me dio confianza para escribir. El Dr. Luis Medrano (Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM) me ayudó desde la planeación de la recolecta de muestras, y sus puntualizaciones en los avances de este trabajo fueron muy importantes. El Dr. Francisco Correa (Instituto de Investigaciones Oceanológicas, UABC) siempre estuvo pendiente de mis avances, me apoyó durante el tiempo del trabajo de laboratorio e hizo observaciones valiosas en el manuscrito de la tesis. El Dr. Javier Helenes (División de Ciencias de la Tierra, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, CICESE) siempre fue propositivo durante los avances de este trabajo, y con sus preguntas logró aclarar mis ideas.

Aunque no formó parte de mi comité, el Dr. David Aurióles-Gamboa (Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, CICIMAR, La Paz, B.C.S.) aportó grandes y valiosas ideas para la interpretación de los resultados, además de revisar el primer borrador. También le agradezco todos los años que ha dedicado a la investigación del lobo marino en México.

A quienes revisaron el primer manuscrito de este trabajo, por su interés y gran ayuda para mejorarlo, así como por su tiempo: los Dres. Sergio Escorza y Mark Lowry (Southwest Fisheries Science Center), a los M. en C. Daniel Palacios (College of Oceanic & Atmospheric Sciences, Oregon State University, EUA) y Octavio Maravilla (Centro Regional de Investigación Pesquera, CRIP-La Paz, Instituto Nacional de la Pesca).

Al Dr. Lorenzo Rojas (Programa Nacional de Mamíferos Marinos, Instituto Nacional de Ecología) por su interés en los avances de este trabajo y por seguir formando vínculos de colaboración a pesar de los participantes.

Agradezco profundamente el apoyo y amistad de mis compañeros de laboratorio, especialmente al M. en C. Luis Enquirez, la M. en C. Clara E. Galindo y la M. en C. Asunción Lago. A Luis por toda su paciencia en mis primeros días en el laboratorio, por enseñarme los protocolos y tips de las técnicas, por las ricas discusiones sobre la interpretación de los resultados y por bajarle a la música. A Clarissa por enseñarme el gusto por entender los fundamentos de las técnicas, por toda su ayuda en mis intentos por clonar, por pasarme artículos sobre lobos y por amenizar nuestras horas en el laboratorio. A Chon por su ayuda en mis primeras consultas al GenBank, por las interminables discusiones sobre las técnicas y animarme cuando no salían las cosas. En el laboratorio también conté con la ayuda de Paulina Cetina, a quien le agradezco su interés en el proyecto.

A lo largo de mi doctorado recibí asesorías de muchos investigadores quienes aportaron valiosas ideas para la realización de diferentes partes de este trabajo: los Dres. Jorge Ledesma, Reginaldo Durazo, Eduardo Santamaría y Rubén Castro (Facultad de Ciencias Marinas, UABC); el Dr. Faustino Camarena (Facultad de Ciencias, UABC); el M. en C. Vicente Ferreira (Departamento de

Ecología, CICESE) y el Dr. Greg O'Corry-Crowe (Southwest Fisheries Science Center), gracias por su tiempo.

Al Southwest Fisheries Science Center, en especial al Dr. Andrew E. Dizon, por las facilidades que me otorgó para correr las muestras en el secuenciador automático; sin él no habría terminado la tesis. Kelly Robertson y John Hyde me apoyaron en el laboratorio de esa institución.

A la Dra. Karen K. Martien (Southwest Fisheries Science Center) por permitirme usar su programa (BoundaryRank) para corroborar el establecimiento de los grupos aquí propuestos.

Los Dres. José Luis Stephano y Meredith Gould (Facultad de Ciencias, UABC) me prestaron la computadora Mac y el programa Sequencher, para hacer las alineaciones. Los Dres. Jorge Olmos y Miguel Angel del Río (Departamento de Acuicultura, Biotecnología, CICESE) me facilitaron equipo de laboratorio.

El Ocean. Eduardo Morteo fue mi asesor particular en el uso de programas para diseñar y maquillar las gráficas; le agradezco su tiempo y disponibilidad. La M. en C. Claudia Hernández Camacho (Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, CICIMAR) amablemente me regaló una copia de su tesis, que fue importante en la discusión de este trabajo.

Las gestiones del M. en C. Octavio Maravilla y del Dr. Alfredo Zavala (Zona de Refugio de Flora y Fauna Silvestre Islas del Golfo de California) hicieron posible mi participación en los cruceros para la recolecta de muestras. En el trabajo de campo conté con la valiosa ayuda y experiencia en la captura de crías del Dr. Alfredo Zavala, el M. en C. Octavio Maravilla, el Dr. Mark Lowry, el M. en C. Leonardo Inclán (Zona de Refugio de Flora y Fauna Silvestre Islas del Golfo de

California), la Biól. Marie Lys Anoge (Facultad de Ciencias, UNAM) y sobre todo con la Dra. Gisela Heckel (Investigación y Conservación de Mamíferos Marinos de Ensenada, A.C.), quien además de formar parte del equipo de captura, me apoyó en la planeación y preparación de la salida; además de cuidarme durante las interminables horas de marea.

El Centro Regional de Investigación Pesquera (CRIP-La Paz), me invitó a participar en los Cruceros de Evaluación de Poblaciones de Pinnípedos (Oficio No. CRIP-LP/97/537), organizados por el Instituto Nacional de la Pesca; la Armada de México facilitó las embarcaciones (Cañoneros "Altamirano" y "Juan de Aldama"), con especial agradecimiento a la tripulación del Cañonero Juan de Aldama. El Instituto Nacional de Ecología me otorgó el permiso para recolectar las muestras (Doo750.-8106/97).

En la recolecta de muestras fue importante la ayuda de la Dra. Denisse Re Araujo (Departamento de Acuicultura, Biotecnología, CICESE), el Dr. Rubén Lara Lara y el Dr. Eduardo Millán (Departamento de Ecología, CICESE), por prestarme los termos para transportar las muestras con nitrógeno líquido. El Instituto de Astronomía de la UNAM (Ensenada) me proporcionó el nitrógeno líquido. El M. en C. Guillermo Torres Moya (Facultad de Ciencias Marinas, UABC) me ayudó en la logística de campo.

A la Universidad Autónoma de Baja California le agradezco haberme permitido ser parte de ella. A todos mis profesores, porque con la dedicación a su trabajo me enseñaron a respetar las diferentes áreas de investigación. A los directivos que siempre se esfuerzan por mejorar nuestro posgrado y a los administrativos quienes con su apoyo logran que todo funcione.

Investigación y Conservación de Mamíferos Marinos de Ensenada, A.C. (ICMME), fue parte importante en mi formación durante estos años, por lo que no quiero dejar de agradecer a todos sus integrantes, especialmente a Gisela, Leo, Rodolfo, Santiago, Nemer, Oscar, Lalo, Erick, Clarissa, Samantha, Ligeia, Lety, Daniel, Ricardo y Alejandra.

La M. en C. Claudia Hernández Merlo me brindó su amistad y le agradezco todo su apoyo por hacer más fácil los trámites ante CONACyT y seguir pendiente de mi sobrevivencia cuando se terminó la beca.

A mis amigos de parrandas, disculpas por la falta de tiempo, pero sin él no habría terminado mi tesis: Gisela, Leo, Chon, Oscar, Luis E., Clarissa, Samantha, Alejandra, Luis S., Sawako, Ligeia, Gaby, Tona, Zack, Lydia, Olga, Lucía y Diego. Gracias por su apoyo.

A la familia Camacho Solís por su amistad, apoyo e intervención en mi búsqueda de nuevas becas, y al Ing. Ramón De Damm por su apoyo en la gestión de la beca de ABB Alstom Power.

Este trabajo fue financiado por la Universidad Autónoma de Baja California y el Southwest Fisheries Science Center. Recibí becas de CONACyT, Telmex, ABB Alstom Power y CICESE, a todos ellos muchas gracias por su apoyo.

A mi familia (papá, mamá, hermanos, hermanas, cuñadas, cuñados, sobrinos y sobrinas) por todo su apoyo e interés. Porque todos ellos son una buena muestra para un experimento genético, pero los quiero por muchas otras cosas más. Muy en especial a mi familia portátil, Gisela, a quien por muchas razones le debo este logro, y con quien he disfrutado y celebrado el camino recorrido, no sólo la meta.

ÍNDICE

RESUMEN	I
ABSTRACT	III
AGRADECIMIENTOS	V
ÍNDICE.....	X
LISTA DE CUADROS.....	XII
LISTA DE FIGURAS.....	XIII
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES	4
DISTRIBUCIÓN.....	4
MIGRACIÓN.....	5
ABUNDANCIA	8
EXPLOTACIÓN COMERCIAL.....	9
SISTEMÁTICA DEL GÉNERO <i>Zalophus</i> (GILL, 1866).....	13
DIFERENCIACIÓN INTRAESPECÍFICA	14
SECUENCIA DE LA REGIÓN CONTROL DEL mtDNA COMO MARCADOR MOLECULAR	15
HIPÓTESIS	19
OBJETIVO GENERAL.....	20
OBJETIVOS PARTICULARES.....	20
ÁREA DE ESTUDIO	21
MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
TRABAJO DE CAMPO: RECOLECTA DE MUESTRAS	24
TRABAJO DE LABORATORIO	28
Extracción del DNA Genómico	28
Amplificación.....	29
Secuenciación.....	31
ANÁLISIS DE DATOS.....	32
Alineación de Secuencias.....	32
Diversidad Genética	33
Diversidad Haplotípica	33
Diversidad Nucleotídica	34
Promedio de Diferencias Pareadas entre Haplotipos.....	35

Neutralidad.....	35
Estructura Poblacional.....	36
Análisis Filogenético.....	40
<i>Máxima Parsimonia</i>	40
<i>UPGMA y NJ</i>	41
Filogeografía	42
<i>Red de la Mínima Separación</i>	43
RESULTADOS	44
ALINEACIÓN Y VARIACIÓN DE SECUENCIAS	44
DIVERSIDAD GENÉTICA Y NEUTRALIDAD	47
ESTRUCTURA POBLACIONAL	50
ANÁLISIS FILOGENÉTICO	52
FILOGEOGRAFÍA.....	57
DISCUSIÓN	62
ALINEACIÓN DE SECUENCIAS	62
DIVERSIDAD GENÉTICA Y NEUTRALIDAD	64
ESTRUCTURA POBLACIONAL	67
ANÁLISIS FILOGENÉTICO	80
FILOGEOGRAFÍA	82
CONCLUSIONES	90
PERSPECTIVAS	92
LITERATURA CITADA	94
ANEXO I. Datos de la Recolecta de Muestras	112
ANEXO II. Secuencias Originales	118
ANEXO III. Justificación de la Agrupación de las Islas	140

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Islas visitadas durante el trabajo de campo, en el Golfo de California y la costa occidental de la Península de Baja California.....	26
Cuadro 2. Ejemplo de algunas secuencias entre los sitios 105 a 121, donde se encontró la zona variable de timinas (T) y citosinas (C).....	45
Cuadro 3. Ejemplo de una secuencia completa de la región hipervariable I de la región control del DNA mitocondrial de <i>Z. c. californianus</i>	45
Cuadro 4. Parte de la secuencia de los 33 haplotipos, donde se presentan los 19 sitios variables	46
Cuadro 5. Índices de diversidad genética y prueba de neutralidad de Tajima de once loberas reproductivas del lobo marino de California.....	48
Cuadro 6. Índices de diversidad genética y prueba de neutralidad de Tajima por grupos.	48
Cuadro 7. Distribución de haplotipos por grupos y sus frecuencias relativas....	49
Cuadro 8. Valores de F_{st} y Φ_{st} en comparaciones pareadas entre los cuatro grupos y sus valores correspondientes de P.....	50
Cuadro 9. Análisis molecular de varianza (AMOVA) jerárquico entre cuatro grupos, por medio del índice de fijación de Wright, F_{st}	51
Cuadro 10. Análisis molecular de varianza (AMOVA) jerárquico entre cuatro grupos, por medio del índice de fijación Φ -estadístico (Φ_{st}).....	52

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Esquematización de los principales dominios de la región control del DNA mitocondrial (mtDNA) de mamíferos..... 16
- Figura 2. Localización de las islas donde se realizó la recolecta de muestras de crías de lobo marino de California..... 27
- Figura 3. Parte del genoma mitocondrial, donde se localizan los cebadores Tro y Dxx que se usaron para amplificar la región hipervariable I, de la región control..... 30
- Figura 4. Árbol consenso de 33 haplotipos de *Zalophus c. californianus*, por medio del método de Máxima Parsimonia 54
- Figura 5. Relación genética entre 33 haplotipos de *Zalophus c. californianus*, por medio del método UPGMA 55
- Figura 6. Relación genética entre 33 haplotipos de *Zalophus c. californianus*, por medio del método Neighbor-Joining 56
- Figura 7. Red de la mínima separación (Minimum Spanning Network), con nombre de los haplotipos, frecuencias y grupos externos 58
- Figura 8. Red de la mínima separación (Minimum Spanning Network). Los haplotipos están marcados de acuerdo al origen de la muestra 59
- Figura 9. Las gráficas en el mapa muestran la red de la mínima separación (Minimum Spanning Network), por zona 61

INTRODUCCIÓN

El lobo marino de California *Zalophus californianus californianus* (Lesson, 1828), es el pinnípedo más abundante y de distribución más amplia en México. Habita en el noreste del Océano Pacífico y se distribuye entre México, Estados Unidos y Canadá. En el Golfo de California se encuentra el 16% de la población total, en la costa occidental de la Península de Baja California cerca del 46%, en California el 35% y en Columbia Británica el 3% (Le Boeuf *et al.*, 1983).

Estos animales son capaces de desplazarse grandes distancias (Lowry, 1985; Auriol-Gamboa, 1988) y aún cuando la presencia y ausencia del lobo marino de California en diferentes localidades sugiere un movimiento regular de los mismos, no se conoce un patrón de migración definido, lo cual dificulta conocer la estructura geográfica o subdivisión de la población o poblaciones.

En México, el lobo marino fue aprovechado desde hace por lo menos dos mil años por los antiguos pobladores de Baja California, Sonora y Sinaloa (Lluch-Belda, 1969). Comercialmente se cazó desde 1800 y hasta 1972 (Cass, 1985), lo que disminuyó la población. Desde 1982 el lobo marino se encuentra en veda permanente por el gobierno de México (Ley Federal de Pesca, 1986), y desde 1972 por los Estados Unidos de América (EUA) (Marine Mammal Commission, 1994). Aunque no existen censos confiables antes de su explotación, la abundancia total de *Z. c. californianus* ha aumentado. A principios de 1960 se reportaron 39,346 individuos (Lluch-Belda, 1969), en 1983 se estimó un total de 145,000 animales (Le Boeuf *et al.*, 1983) y 217,000 en 1990 (Lowry *et al.*, 1992), por lo que algunos autores consideran que la población se ha recuperado (Zavala-González, 1990 y 1993; Lowry *et al.*, 1992).

Como consecuencia del aumento de la población, los pescadores consideran al lobo marino como una plaga (Gallo-Reynoso, 1986; Zavala-González, 1993) por

la gran interacción de éstos con diversas pesquerías (Hanan *et al.*, 1989; Fleischer y Cervantes-Fonseca, 1990; Zavala-González *et al.*, 1992); los matan intencionalmente porque dañan a sus artes de pesca y causan pérdidas del producto (Townsend, 1919; Stroud y Roffe, 1979; Miller *et al.*, 1983; Lowry y Folk, 1987; Zavala-González y Esquivel-Macías, 1991; Zavala-González *et al.*, 1992; Zavala-González, 1993; Delgado-Estrella *et al.*, 1994). Además, existe una mortandad incidental por enmallamiento (Stewart y Yochem, 1987; Harcourt *et al.*, 1994). También se utiliza ilegalmente como carnada en la pesquería del tiburón (Zavala-González y Esquivel-Macías, 1991).

Aún cuando se considere al lobo marino de California demográficamente recuperado, existen evidencias de que esta subespecie está formada por al menos dos grupos o poblaciones: una en el Golfo de California y otra en la costa pacífica de Baja California, México, y California, EUA (Maldonado *et al.*, 1995). Sin embargo, este trabajo sólo consideró localidades ubicadas en los extremos de la distribución de *Z. c. californianus* (Bahía de los Ángeles, Golfo de California; Punta Banda, Baja California; Islas del Canal, California), por lo que el trabajo no es conclusivo. Para que una especie se pueda utilizar y, por lo tanto, conservar efectivamente a través de acciones planeadas, éstas deben fundamentarse en una sólida base de conocimiento. En México, la única forma legal de utilizar al lobo marino era a través de la captura de organismos para exhibición por medio de permisos otorgados por el gobierno. Sin embargo, debido a modificaciones a la Ley General de Vida Silvestre, en los últimos cinco años se ha prohibido este tipo de permiso (Reyna-Medrano, com. pers.)¹.

Sin información sobre la estructura genética de la subespecie (es decir, cuántas poblaciones existen) es difícil decidir cuántos individuos y de cuál zona se

¹ Mauro Iván Reyna Medrano. Subdirector de Acuerdos de Conservación, Dirección General de Vida Silvestre, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, SEMARNAT.

pueden extraer. Por lo tanto, es importante analizar una mayor cantidad de loberas que permita conocer el número de poblaciones que se pueden encontrar en la distribución de esta subespecie en México. Así es como en el presente trabajo se investigó la estructura y variabilidad genética existente de *Z. c. californianus* a lo largo de su distribución en México. Por último, como consecuencia de este análisis, también se investigó su filogeografía².

² Filogeografía: Es el área de estudio concerniente a los principios y procesos que rigen la distribución geográfica de linajes genealógicos, especialmente aquéllos entre y dentro de especies cercanamente relacionadas. Como el término lo indica, la filogeografía trata con componentes históricos y filogenéticos de la distribución espacial de los linajes génicos (Avice, 2000).

ANTECEDENTES

DISTRIBUCIÓN

Fuera de la temporada reproductiva es posible encontrar a estos animales a lo largo de la costa norte del Pacífico Oriental, desde Columbia Británica en Canadá (51° N), hasta los 19° N, en la costa mexicana, y en el Golfo de California (King, 1983). Hay registros de lobos marinos hasta el paralelo 14° N, pero se consideran casos aislados (Gallo-Reynoso y Solórzano-Velasco, 1991).

El área reproductiva del lobo marino de California se ubica desde la Isla San Miguel en California, EUA (Peterson y Bartholomew, 1967; King, 1983). Sin embargo, se tienen registros de nacimientos en Isla Año Nuevo (Keith *et al.*, 1984) e Isla Farallón, donde evidencias arqueológicas confirman la existencia de una lobera reproductiva durante el siglo pasado que fue eliminada por la caza (Pierotti *et al.*, 1977). En México, las loberas reproductivas se encuentran desde las Islas Los Coronados (De Anda-Delgado, 1985) y hacia el sur, hasta Isla Margarita (Le Boeuf *et al.*, 1983). Dentro del Golfo de California el área reproductiva se extiende desde las Rocas Consag, B.C., y hacia el sur hasta Los Islotes, en los límites de la Bahía de La Paz, B.C.S. (Aurioles-Gamboa y Zavala-González, 1994).

Existen 4 loberas reproductivas en las costas de EUA, ubicadas en Isla San Miguel, Isla Santa Bárbara, Isla San Nicolás e Isla San Clemente (Lowry *et al.*, 1992). En la costa occidental de la Península de Baja California se pueden contar 9 loberas reproductivas, localizadas en Los Coronados (De Anda-Delgado, 1985), Isla San Jerónimo, Isla San Benito (este, oeste y centro), Isla de Cedros, Isla Natividad, Isla Asunción e Isla Margarita (Le Boeuf *et al.*, 1983).

Las 14 loberas reproductivas en el Golfo de California están ubicadas en Rocas Consag, Isla San Jorge, Isla Lobos, Isla Granito, Los Cantiles y Los Machos (en Isla Ángel de la Guarda), Isla La Calavera, Perdederos, Islote El Rasito, Isla San Esteban, Isla San Pedro Mártir, Isla San Pedro Nolasco, Los Islotes y Farallón de Topolobampo (Aurioles-Gamboa y Zavala-González, 1994).

Los lobos marinos, como otros pinnípedos, son animales poligínicos (Peterson y Bartholomew, 1967), y parte de su vida transcurre en tierra, especialmente durante la época reproductiva (Lluch-Belda, 1969). En el Golfo de California, la época reproductiva del lobo marino va de mediados de primavera (tercera semana de mayo) a mediados de verano (tercera semana de julio), con su mayor actividad en los meses de junio y julio (Aurioles-Gamboa, 1988; Morales-Vela, 1985 y 1990; Zavala-González, 1990; Morales-Vela y Aguayo-Lobo, 1992). Recientemente se reportó que la época reproductiva en el Golfo de California inicia en la segunda semana de mayo y concluye en la tercera de agosto (García-Aguilar y Aurioles-Gamboa, 2001). En la costa occidental de Baja California, la época reproductiva se ha reportado de mayo a julio (Peterson y Bartholomew, 1967; Lowry *et al.*, 1992).

MIGRACIÓN

El patrón de migración del lobo marino de California a lo largo de su distribución en el Pacífico fue inferido por primera vez por Fry (1939). Con base en censos realizados durante invierno y verano en la parte sur de California, Fry encontró una población mayor durante el invierno, y sugirió una posible migración de lobos marinos desde aguas mexicanas hacia California. Bartholomew y Hubbs (1952) apoyaron esta hipótesis con base en la ausencia de machos adultos en Isla Benitos durante el invierno, mientras que en las Islas del Canal la población de machos adultos fue mayor que durante el verano. Además, la cantidad de

hembras en verano excedió a la de invierno en las Islas del Canal (Bartholomew y Hubbs, 1952). De acuerdo a Bartholomew y Boolootian (1960), la migración de los lobos de las Islas del Canal sugiere un movimiento de machos adultos hacia el norte en otoño y hacia el sur en primavera. Lo anterior se ha apoyado con observaciones realizadas durante el invierno, cuando la población de lobos en las Islas San Miguel y San Nicolás estaba compuesta exclusivamente por machos adultos (Bartholomew y Boolootian, 1960). En la Isla Año Nuevo, California, se ha reportado la presencia de machos adultos y subadultos durante primavera, otoño e invierno. La ausencia de animales durante el verano se atribuye al movimiento de los mismos hacia el sur, debido a la temporada de reproducción (Orr y Poulter, 1965). También existen registros de la presencia de machos adultos y subadultos en la Isla Vancouver en Columbia Británica, Canadá, durante otoño y principios de invierno, donde los lobos permanecen hasta la primavera (Cowan y Guiguet, 1956; Hancock, 1970; Bigg, 1973). Aún cuando la presencia y ausencia de lobos marinos en diferentes localidades sugiere un movimiento regular de los mismos, hasta ahora no ha sido posible establecer un patrón de migración definido.

En aguas mexicanas, Aurióles-Gamboa (1988) menciona que, con base en la información sobre el movimiento de los lobos marinos del Golfo de California, no se puede considerar la existencia de un patrón de migración definido, sino que sólo se conoce el nivel de dispersión de los animales. En estudios realizados en diferentes localidades del Golfo de California como Los Islotes, Farallón de Topolobampo, Isla San Pedro Nolasco e Isla San Jorge, se reportó que los machos adultos presentan la tasa más alta de dispersión (52-100%), seguida por los machos subadultos (50-84%) y los jóvenes (34-62%). Las hembras adultas son la clase más sedentaria (28-56%).

Existe una tendencia inversa entre la cantidad anual de machos subadultos comparada con las hembras y machos adultos. La población de machos subadultos es menor durante la temporada reproductiva, pero aumenta durante el invierno. Los jóvenes de ambos sexos se dispersan de forma irregular, y se pueden mover en cualquier dirección recorriendo distancias de hasta 800 Km (Aurioles-Gamboa, 1988). Sin embargo, se sabe que los lobos marinos del Golfo de California permanecen en la zona a lo largo del año, principalmente en la Región de las Grandes Islas (Aurioles-Gamboa, 1982 y 1988; Zavala-González, 1990; Zavala-González y Aguayo-Lobo, 1988).

Al considerar varios censos realizados en la lobera reproductiva Los Islotes (al sur del Golfo de California), la población presenta dos máximos anuales en verano e invierno. El máximo de verano resulta de una mayor cantidad de hembras, mientras que durante el invierno éstas disminuyen y aumenta el número de machos subadultos (Aurioles-Gamboa *et al.*, 1983). En el Farallón de Topolobampo, una lobera reproductiva al sur del Golfo de California, el comportamiento de la lobera con respecto a la presencia de hembras y machos subadultos es similar a la encontrada en Los Islotes (Aurioles-Gamboa, *et al.*, 1983).

Los únicos registros concretos acerca del movimiento de los animales son los basados en el marcaje de organismos. Hasta el momento, no es poco el esfuerzo realizado con marcas, sin embargo, no se ha logrado entender del todo el movimiento de estos animales. Se encontró que un individuo marcado en Los Islotes en verano de 1983 permaneció hasta marzo de 1984 en la lobera y posteriormente se reavistó en Isla Granito en junio del mismo año (Aurioles-Gamboa, 1988). Una cría marcada en la Isla Margarita se encontró muerta en una red localizada en la Bahía de La Paz, cuando tenía dos años de edad (Aurioles-Gamboa, 1988). Lowry (1985) reporta que un lobo marcado en la Isla

Santa Barbara, California, en 1983, se encontró muerto en la costa central de Oregon en marzo de 1984. Durante el trabajo de campo de este estudio se localizó en la Isla San Martín a un macho adulto marcado con el número 233; Mark Lowry³ identificó la marca como las utilizadas en Seattle, Washington, en animales adultos, como control de individuos que interactúan con la pesquería del salmón.

ABUNDANCIA

Aunque los primeros censos de lobos marinos no se realizaron en forma sistemática, es importante mencionar los valores que se reportaron como el total poblacional en diferentes décadas. La población total estimada del lobo marino de California para fines de los 1950s era de 50,000 a 100,000 animales (Scheffer, 1958). Los censos realizados en los 1960s arrojaron un total de 39,346 individuos, de los cuales 6,027 se encontraban en el Golfo de California, 16,150 en la costa occidental de la Península de Baja California y 17,169 en la costa de California, EUA, sin ajustes por errores censales (Lluch-Belda, 1969).

La variabilidad en los censos de lobos marinos dentro de una misma localidad depende en gran medida de la estación en que se hayan efectuado y del método empleado. Por tal motivo, se citan sólo censos realizados durante la época reproductiva (verano).

Como ejemplo de censos más confiables se presentan los siguientes. Para 1964, en las Islas del Canal, se obtuvo un total de 34,382 individuos (Odell, 1971); en 1968 se registró un total de 15,467 lobos, en Isla Guadalupe, Benitos

³ Mark S. Lowry. National Marine Fisheries Service. Southwest Fisheries Science Center. La Jolla, California, USA.

Centro, Cedros y Natividad (Brownell *et al.*, 1974). Los censos realizados en 1979 en el Golfo de California arrojaron un total de 15,140 individuos y 23,098, en la costa occidental de la península (Le Boeuf *et al.*, 1983). Los mismos autores reportan 14,389 y 14,994 animales para 1981, en el golfo y la costa occidental de la península, respectivamente. El tamaño de la población de lobo marino durante la década de los ochenta en el Golfo de California, se estimó en 31,393 animales (Auriol-Gamboa y Zavala-González, 1994). Para la misma década se manejó un total de 80,000 a 125,000 animales como población total (Antonelis y Fiscus, 1980). Con base en datos poblacionales de 1979 a 1981, Le Boeuf y colaboradores (1983) estimaron la población total en 145,000 animales. La población de lobos marinos durante 1990 se estimó en 111,016 organismos en las costas de EUA y 74,467 en la costa occidental de la Península de Baja California (Lowry *et al.*, 1992); en el Golfo de California fue de 28,200 individuos a fines de la década de los 1980s (Zavala-González, 1990) y entre 28,300 y 30,770 animales a comienzos de los 1990s (Zavala-González, 1993). Recientemente, Lowry y Maravilla-Chávez (2002) reportaron 247,000 animales para las costas de EUA y 71,000 lobos para la costa occidental de Baja California. En el segundo caso parece no existir aumento, comparado con lo reportado en 1992, sin embargo, no se incluyeron todas las localidades reportadas durante 1992.

EXPLOTACIÓN COMERCIAL

Existen muy pocos datos sobre la explotación del lobo marino con fines comerciales. Sin embargo, en distintos documentos se proporciona información que muestra el nivel de explotación al que fueron sometidos tanto en California, EUA, como en la costa occidental de la Península de Baja California y el Golfo de California.

En las costas de California, EUA y las Islas del Canal, principalmente en la Isla San Miguel, la explotación comercial del lobo marino se realizó desde 1800 hasta 1972 (Cass, 1985). Entre 1800 y 1850, cazadores rusos de nutrias e indios aleutianos mataron de 30 a 70 animales al año (Ogden, 1933). Scammon menciona que durante varios años una gran cantidad de lobos marinos se sacrificaron en California y Baja California para la producción de miles de barriles de aceite y puntualizó que se requieren de tres a cuatro animales adultos para llenar un barril (Scammon, 1874). Con base en las descripciones de Scammon, se estimó una extracción de 9,000 a 15,000 animales, entre 1860 y 1870 (Cass, 1985). En la Isla San Miguel, EUA, se mataron todos los machos adultos en 1907; durante 1927 en la misma isla se sacrificaron 400 adultos (no se especifica el sexo) y todas las crías (Bonnot, 1928; citado por Cass, 1985). De 1909 a 1930 hubo una extracción permanente no cuantificada (Bonnot, 1931). Se sabe que desde finales de los 1920s hasta la aprobación de la Ley de Protección de Mamíferos Marinos de los EUA (Marine Mammal Protection Act) en 1972 (Marine Mammal Commission, 1994), se les permitía a los pescadores comerciales y deportivos matar lobos marinos si éstos interferían con sus operaciones de pesca (Jones, 1981).

De acuerdo a Zavala-González y Mellink-Bijtel (2000) la explotación del lobo marino de California en México se puede dividir en cuatro períodos: el Prehispánico (antes de 1533) cuando los nativos americanos utilizaron al lobo marino de forma no intensiva, el Colonial (1534-1821) y el Independiente (1822-1911) cuando la mayor parte de la explotación la realizaron extranjeros y siempre asociada a la caza de otros mamíferos marinos; y por último el período Postrevolucionario (después de 1911) cuando la explotación se realizó por mexicanos y norteamericanos para diferentes usos comerciales.

Desde 1937 y hasta 1955, en la costa occidental de la Península de Baja California se mataban 180 animales por día por compañías norteamericanas, para la elaboración de alimento para animales (Abbott, 1939; citado por Cass, 1985; Lluch-Belda, 1969).

En el Golfo de California, el lobo marino se capturó en abundancia en las costas de Baja California, Sonora y Sinaloa, pero sólo se cuenta con registros sobre su captura e industrialización a partir de 1936. De acuerdo a la producción de 50,000 Kg de aceite registrada para 1951, Lluch-Belda calculó que se requirieron 1,000 machos adultos como mínimo para la operación de ese año (Lluch-Belda, 1969). El 6 de junio de 1856 apareció en las costas e islas del Golfo de California el primer permisionario legal a quien por decreto se le autorizó cazar al lobo marino con exclusividad por ocho años como una medida de control contra la matanza que se realizaba en la zona (Lluch-Belda, 1969). Dos años después, apareció un nuevo permisionario al cual se le autorizó cazar lobos y ballenas durante 10 años (Sierra y Sierra, 1977; citados por Zavala-González y Mellink-Bijtel, 2000). Desde 1950 y hasta aproximadamente 1970 existieron concesionarios de Guaymas, Sonora, dedicados a la explotación del lobo marino para la obtención de aceite. Desde el 15 de mayo y hasta el 15 de julio, los cazadores de Guaymas sacrificaban cada año a machos adultos en las mismas localidades, tales como en Isla Granito, San Pedro Nolasco, San Pedro Mártir y Ángel de la Guarda (Lluch-Belda, 1969). Desde 1942 y hasta 1964 los concesionarios de Sonora cazaron aproximadamente 400 machos adultos por temporada, dentro del Golfo de California (Aurióles-Gamboa y Zavala-González, 1994).

Desde 1982 el lobo marino se encuentra en veda permanente (Ley Federal de Pesca, 1986), situación que permitió el aumento de la población (Zavala-González, 1990; Lowry *et al.*, 1992). La tasa de crecimiento de la población en

el Golfo de California, desde 1979 y hasta 1987, fue de 1.89%, (Zavala-González, 1990). Para la Región de las Grandes Islas, el incremento fue de 5.2% desde 1966 y hasta 1991 (Zavala-González, 1993). De 1983 a 1990 la tasa de crecimiento anual en las loberas localizadas en EUA fue de 10.2% y en la costa occidental de la Península de Baja California la población se mantuvo estable (Lowry *et al.*, 1992).

En la actualidad el lobo marino se utiliza como carnada en la pesquería del tiburón (Zavala-González y Esquivel-Macías, 1991). También se capturó ocasionalmente por compañías particulares, para delfinarios o acuarios nacionales y extranjeros, aunque este tipo de permisos se encuentra interrumpido. Actualmente, sólo las instituciones educativas y de investigación pueden obtener autorizaciones para la recolecta de muestras biológicas que se utilicen para estudios específicos de la especie.

La abundancia de los lobos marinos coincide con las áreas de mayor actividad pesquera (Aguayo-Lobo, 1989; Aurióles-Gamboa, 1988; Zavala-González y Esquivel-Macías, 1991; Aurióles-Gamboa y Zavala-González, 1994), donde éstos ocasionan daños a las artes de pesca y pérdidas en el producto de la pesca de sierra, baqueta, cabrilla, pargo, corvina (Fleischer y Cervantes-Fonseca, 1990), jurel y lisa (Fleischer y Cervantes-Fonseca, 1990; Zavala-González *et al.*, 1992), así como en la pesca deportiva (Hanan *et al.*, 1989). Por lo anterior, los pescadores consideran al lobo marino como una plaga (Townsend, 1918, 1919; Stroud y Roffe, 1979; Gallo-Reynoso, 1986; Zavala-González, 1993). Como consecuencia, en ocasiones los pescadores matan intencionalmente a los lobos (Townsend, 1919; Stroud y Roffe, 1979; Miller *et al.*, 1983; Lowry y Folk, 1987; Zavala-González y Esquivel-Macías, 1991; Zavala-González *et al.*, 1992; Zavala-González, 1993; Delgado-Estrella *et al.*,

1994), como un intento por reducir la depredación de éstos sobre las especies de importancia comercial.

La interacción con diversas pesquerías provoca la muerte accidental por enmallamiento de los lobos. De acuerdo a Harcourt y colaboradores (1994), existe un porcentaje alto de lobos marinos enmallados (3.9-7.9%) en Los Islotes, B.C.S. En loberas más alejadas de poblaciones humanas, como las Islas San Miguel y San Nicolás, se ha reportado un porcentaje menor (0.08-0.16%) en la incidencia de lobos marinos enmallados (Stewart y Yochem, 1987). En un estudio reciente Zavala-González y Mellink-Bijtel (1997) realizaron observaciones en la parte central y norte del Golfo de California durante 5 años (1991-1995); encontraron un porcentaje intermedio de organismos enmallados en diferentes loberas (0 - 2.24%).

Actualmente, uno de los mayores problemas que podría enfrentar esta subespecie es la interacción con las pesquerías, por ello algunos investigadores consideran que pueden surgir conflictos, en el futuro cercano, en cuanto al manejo del lobo marino de California en México (Zavala-González y Mellink-Bijtel, 2000).

SISTEMÁTICA DEL GÉNERO *Zalophus* (GILL, 1866)

A lo largo de la historia se han reconocido tres subespecies para el género *Zalophus* (Scheffer, 1958 y muchos otros autores) o tres especies diferentes (Rice, 1998). Específicamente, se trata de un género distribuido en tres zonas diferentes: Japón, California y Galápagos. En el caso del lobo marino de Japón existen al menos dos trabajos que apoyan la separación de este taxa como especie (Ito, 1985; Brunner, 2000). Ambos trabajos se realizaron con base en morfometría craneal de organismos de diferentes localidades. Por lo tanto, se

puede considerar al extinto lobo marino de Japón (*Zalophus japonicus*, Peters, 1866) como una especie diferente. Sin embargo, las evidencias no son tan claras como para considerar al lobo marino de California (*Zalophus californianus californianus*, Lesson, 1828) como una especie diferente al lobo marino de Galápagos (*Zalophus californianus wollebaeki*, Sivertsen, 1953). El mismo autor que describió a esta última especie o subespecie considera que las diferencias morfológicas son igualmente grandes entre el lobo marino de Galápagos y el de California, que entre éstos y el lobo marino de Japón (Sivertsen, 1954; citado por Rice, 1998). Además, existen desigualdades en el comportamiento social (Eibl-Eibesfeldt, 1984; citado por Rice, 1998) y en las vocalizaciones (Cenami-Spada *et al.*, 1991; citados por Rice, 1998). Sin embargo, en el presente trabajo el lobo marino de California y el de Galápagos se consideran subespecies.

DIFERENCIACIÓN INTRAESPECÍFICA

Uno de los primeros trabajos en que se intentó establecer diferencias entre las poblaciones de *Zalophus c. californianus*, fue el realizado por Orr *et al.* (1970). Con base en las características craneales y dentarias de 121 machos, se realizó una comparación entre la población de California, EUA y el Golfo de California, México y se encontró una gran variación individual en las características craneales sin existir una diferencia significativa entre los lobos de las dos regiones.

Recientemente, Aurióles-Gamboa y colaboradores (en preparación), estudiaron las relaciones entre diferentes poblaciones del lobo marino, con base en características dentarias consideradas como primitivas (presencia de doble o triple raíz en los poscaninos y/o presencia del sexto poscanino en la mandíbula y el maxilar). Los resultados indican que existen diferencias entre los

organismos del Golfo de California (incluye islas de todo el golfo e Isla Margarita en la costa occidental de B.C.S.) y la costa occidental de la península (Islas del Canal, Cedros, Benitos, Natividad, Asunción y San Roque).

El único trabajo sobre genética poblacional de esta subespecie, es el realizado por Maldonado *et al.* (1995). Por medio de la secuenciación de un fragmento de la región control del DNA mitocondrial, compararon tres loberas del Pacífico (San Miguel y San Nicolás, en California, y Punta Banda, en Baja California) y organismos de Bahía de los Ángeles en el Golfo de California. Los resultados indican una notable distinción filogenética de los grupos Pacífico y Golfo de California. Este resultado provocó una nueva interrogante acerca de las relaciones entre los lobos que ocupaban loberas intermedias entre estos dos puntos analizados, que podrían considerarse extremos de la distribución geográfica de la subespecie. Es decir, a partir de dicho trabajo no fue posible inferir el límite de ambos grupos o si la población presenta más de dos grupos, lo cual sólo podría probarse al incluir muestras de localidades intermedias a las utilizadas por Maldonado *et al.* (1995).

SECUENCIA DE LA REGIÓN CONTROL DEL mtDNA COMO MARCADOR MOLECULAR

Las dificultades para determinar los factores que influyen en la dinámica de poblaciones silvestres han provocado un aumento en el uso de marcadores moleculares. Una de las herramientas útiles para este fin es la técnica de secuenciación de la región control del DNA mitocondrial (mtDNA).

En las células animales se puede encontrar una pequeña cantidad de ácido desoxirribonucleico (DNA) dentro de organelos que se encuentran en el citoplasma, como es la mitocondria. El genoma de una mitocondria es DNA de doble cadena, circular y relativamente pequeño (16,000 a 19,000 nucleótidos;

Ovenden, 1990). La información genética se encuentra ordenada linealmente por cuatro nucleótidos diferentes (adenina, guanina, citosina y timina); el orden de estos nucleótidos es lo que se conoce como secuencia. La secuencia de nucleótidos codifica diferentes proteínas y RNAs de transferencia (tRNA). El genoma mitocondrial contiene una secuencia regulatoria que no codifica ningún producto y se considera más aproximada a un régimen de selección neutral (Avise *et al.*, 1987; Moritz *et al.*, 1987). Esta región se le conoce como región control (Figura 1). En los mamíferos, esta región tiene aproximadamente 1,000 pares de bases (pb), regula la replicación y la transcripción del genoma mitocondrial, y en ella existe un sitio de origen para la replicación (Taberlet, 1996; citado por Avise, 2000).

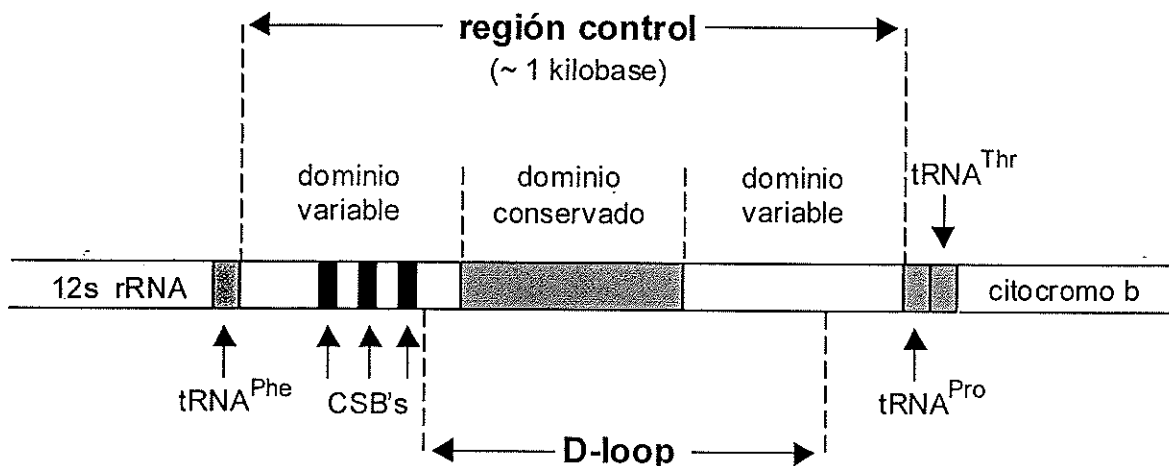


Figura 1. Esquemización de los principales dominios de la región control del DNA mitocondrial (mtDNA) de mamíferos (Taberlet, 1996; citado por Avise, 2000). Existen dos regiones hipervariables dentro de la región control, que flanquean una región más conservada. En uno de los dominios variables, se encuentran tres (algunas veces dos) zonas de secuencias conservadas (CSB, por sus siglas en inglés, "conserved sequence blocks"). El asa D (D-loop), forma parte de la región control, la cual es visible bajo el microscopio como un desprendimiento de una de las cadenas asociado a la replicación.

Pueden existir diferencias en la secuencia de nucleótidos del genoma mitocondrial de dos organismos de la misma especie. La diferencia puede ser por el tipo o la cantidad de nucleótidos en un sitio dado del genoma; lo que se conoce como mutación puntual o de longitud, respectivamente. Los análisis de variabilidad genética se circunscriben en gran medida a la región control, debido a que es una zona hipervariable del genoma mitocondrial. Es decir, la tasa de mutación es mayor en la región control (Awise, 2000) y, por lo tanto, proporciona mayor información útil para distinguir entre organismos cercanamente relacionados.

En el mtDNA, la mayoría de las diferencias en la secuencia se deben a sustituciones, más que a deleciones o adiciones, lo que hace a este genoma muy estable en períodos evolutivos cortos. Esta característica favorece la utilidad del mtDNA como marcador genético para determinar la topología de filogenias y la polaridad de cambios de secuencia (Awise, 2000).

Las mitocondrias se encuentran tanto en células somáticas como en las germinales, por lo que se puede emplear prácticamente cualquier célula para obtener el mtDNA. Además, la mayoría de los individuos tienen la misma secuencia en todas sus mitocondrias, lo que se conoce como homoplasmia (Awise, 2000).

Con base en experimentos de cruza en diferentes organismos, se concluyó que las mitocondrias se heredan estrictamente por vía materna (Dawid y Blackler, 1972; Giles *et al.*, 1980; ambos citados por Ovenden, 1990). La pequeña cantidad de mitocondrias que se encuentra en la cabeza del espermatozoide y que se inyecta dentro del óvulo durante la fecundación, no sobreviven en el citoplasma del cigoto. Por lo tanto, el mtDNA se hereda asexualmente y aparentemente sin recombinación genética intramolecular.

Como consecuencia, esta molécula proporciona información única para estudios filogenéticos ya que guarda información ancestral (Avice, 2000). Debido a que los individuos se pueden caracterizar o identificar de acuerdo a un haplotipo⁴ particular, se pueden considerar como unidades taxonómicas operacionales (OTUs) en determinaciones filogenéticas (Avice, 2000).

Por lo tanto, a partir de la secuencia nucleotídica de la región control del mtDNA se pueden inferir diversos aspectos de la estructura y dinámica poblacional. Algunos de estos aspectos son: dispersión, hábitos o regularidades reproductivas, la historia reciente de las especies y sus relaciones filogenéticas, así como su zoogeografía histórica (Avice, 1986).

⁴ Fragmento del genoma mitocondrial con una secuencia nucleotídica determinada.

HIPÓTESIS

Debido a que la reducción de la población por la explotación, no fue discreta sino continua en la mayoría de las loberas, es probable que la población no presente un efecto de cuello de botella. Además, se espera encontrar una variabilidad genética alta dentro de cada lobera, debido al movimiento continuo de organismos jóvenes entre las loberas, aunque exista una tendencia a la filopatría por parte de los machos territoriales y las hembras adultas. La posible estructura genética de la población podría estar en función de la distancia geográfica entre las loberas. Por lo tanto, se espera encontrar una diferencia en la variabilidad y frecuencia de los haplotipos, entre las loberas del Golfo de California y la costa occidental de la península de Baja California.

OBJETIVO GENERAL

Analizar la estructura genética poblacional y la filogeografía de *Zalophus californianus californianus* de las loberas reproductivas en las costas de la Península de Baja California.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la variación genética de los individuos dentro y entre las diferentes loberas reproductivas de *Zalophus c. californianus*, en la costa occidental de la Península de Baja California y en el Golfo de California.
2. Determinar si existe un efecto de cuello de botella que haya disminuido la variabilidad genética de los individuos en función de la explotación a la que fueron sometidos.
3. Determinar la filogeografía de *Zalophus c. californianus* en su distribución en México, con base en su caracterización genética.

ÁREA DE ESTUDIO

La zona de estudio comprendió cinco islas de la costa occidental de la Península de Baja California (Coronados, Benitos, Cedros, Asunción y Margarita) y seis islas en el Golfo de California (San Jorge, Lobos, Granito, Ángel de la Guarda, San Esteban y Los Islotes).

La costa occidental de la Península de Baja California es una región delimitada al norte por la línea fronteriza con los Estados Unidos de América cerca de la Ciudad de Tijuana, B.C. ($32^{\circ} 30' N$ y $118^{\circ} 24' W$) y se extiende por toda la costa occidental de dicha península, hasta Cabo San Lucas, Baja California Sur ($22^{\circ} 48' N$ y $110^{\circ} 00' W$). Su litoral tiene una longitud aproximada de 1,250 Km y se encuentra dentro de la provincia fisiográfica de la llanura costera de Baja California (De la Lanza-Espino, 1991). En esta zona predominan costas y montañas de clima árido, con precipitaciones en invierno en el norte y en verano en el sur (De la Lanza-Espino, 1991).

El sistema de la Corriente de California está delimitado al norte y al sur por la Corriente Subártica y la Corriente Norecuatorial, respectivamente (Parés-Sierra *et al.*, 1997). La transición de uno a otro sistema se hace en regiones de mezcla de características complejas. De acuerdo a Vélez-Muñoz (1981), Gómez y Vélez-Muñoz (1982; ambos estudios citados por Parés-Sierra *et al.*, 1997), la corriente de California se puede dividir en tres zonas: zona del dominio de la masa de agua subártica, zona de transición y zona de dominio de masa de agua ecuatorial. Estos autores sugieren que la zona de transición se encuentra frente a la costa norte de Baja California y sur de California (entre los 30 y $35^{\circ} N$); la zona de influencia ecuatorial, frente a Baja California Sur desde Punta Eugenia hasta Cabo San Lucas y la zona de influencia Subártica, de San Francisco a Cabo Mendocino.

La corriente de California tiene un flujo de norte a sur de 1,000 Km de ancho, una profundidad de 500 m y con una velocidad de $25 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ aproximadamente (Wooster y Reid, 1963; citados por Millán-Núñez y Lara-Lara, 1995). A lo largo de la corriente de California se desarrollan surgencias costeras y los estudios realizados, tanto estacionales como espaciales, han mostrado que las máximas surgencias se presentan en el sur durante los primeros meses del año (invierno-primavera), y hacia el norte a finales de primavera y verano (Reid *et al.*, 1958; citados por Millán-Núñez y Lara-Lara, 1995).

El promedio anual de productividad primaria para mar abierto es de aproximadamente $10 \text{ mgC}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$, mientras que para las aguas interiores es de $40 \text{ mgC}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$ (Millán-Núñez y Lara-Lara, 1995).

El Golfo de California se encuentra ubicado en la región noroccidental de México, entre los 18° y 35° N. Es un mar marginal de forma alargada con una orientación de noroeste a sureste, limitada al oriente por los estados de Sonora, Sinaloa y Nayarit; al occidente por la Península de Baja California y al sur por una línea imaginaria entre Cabo San Lucas, B.C.S. y Cabo Corrientes, en Jalisco (De la Lanza-Espino, 1991). Es una cuenca marina de aproximadamente 1,400 Km de longitud, con una superficie aproximada de $210,000 \text{ Km}^2$, su máxima amplitud es de 210 Km y se estrecha hasta los 90 Km al sur de la Isla Tiburón (Roden y Groves, 1959). El sistema montañoso de la Península de Baja California, con una altitud de 700 a 1,000 m sobre el nivel del mar, funciona como una barrera de vientos que minimiza la influencia marina del Océano Pacífico, lo cual ocasiona que el clima dentro del Golfo sea más continental que oceánico (Roden, 1964). El Golfo de California se considera una gran cuenca de evaporación que gana calor a través de su superficie (Lavín-Peregrina y Organista, 1988; Paden *et al.*, 1991). Este flujo de calor tiene una importante modulación estacional (Ripa-Alsina y Marinone-Moscetto, 1989) por

lo que se presentan grandes cambios de temperatura (Roden y Groves, 1959; Álvarez-Borrego y Schwartzlose, 1979). La temperatura media del aire en el norte del golfo varía desde 14.8°C en invierno a 31.3°C en verano; mientras que la temperatura media anual superficial del mar es de 15.9°C en invierno y 30.6°C en verano (Osuna-López e Izaguirre-Fierro, 2000).

En el Golfo de California, los vientos predominantes, durante invierno y primavera, provienen del noroeste. En verano, el patrón se invierte (viento del sureste) y usualmente produce lluvias en la parte sur. Debido a los vientos dominantes, los eventos de surgencia se presentan en la costa oriental durante el invierno y la primavera, y en la costa occidental durante el verano (Álvarez-Borrego y Lara-Lara, 1991).

La circulación general del agua se caracteriza por la entrada de agua profunda y la salida de agua superficial. Como consecuencia de esta circulación, el agua profunda rica en nutrientes alcanza la zona eufótica y estos nutrientes pueden ser utilizados por el fitoplancton. Lo anterior hace del Golfo de California un área subtropical con tasas excepcionalmente altas de productividad primaria (Álvarez-Borrego y Lara-Lara, 1991; Santamaría-Del Ángel *et al.*, 1994).

Dentro del golfo se pueden encontrar aproximadamente 100 islas e islotes, de las cuales 29 están ocupadas por el lobo marino de California (Aurioles-Gamboa y Zavala-González, 1994).

MATERIALES Y MÉTODOS

TRABAJO DE CAMPO: RECOLECTA DE MUESTRAS

La recolecta de muestras se realizó en 11 islas, localizadas a lo largo de las costas de la Península de Baja California, por medio de la participación en dos cruceros organizados por el Instituto Nacional de la Pesca, CRIP-La Paz, a bordo de embarcaciones de la Armada de México (cañoneros "Altamirano" y "Juan de Aldama"). El primer crucero abarcó las islas del Golfo de California, del 14 al 25 de julio de 1997, y el segundo cubrió la costa occidental de la Península de Baja California, del 28 de julio al 6 de agosto de 1997. Los cruceros tenían como finalidad evaluar las poblaciones de pinnípedos, por lo tanto, primero se censaron los animales.

Las muestras se obtuvieron únicamente de crías. El censo previo a las capturas permitió reconocer las zonas de fácil acceso, cercanas a sitios donde se encontraron más de 30 crías. Esto se debió al número máximo de muestras por localidad (20 crías) que fue permitido obtener por recomendación de la Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca (SEMARNAP); al otorgar el permiso No.DOO750.8106/97, para la recolecta de muestras.

En el Golfo de California se censaron 12 loberas reproductivas y se obtuvieron 96 muestras en seis de ellas, con un mínimo de 14 y un máximo de 20 por lobera (o isla). En la costa occidental de la Península de Baja California, se censaron siete loberas y se recolectaron 81 muestras de tejido en cinco de ellas, con un mínimo de 15 y un máximo de 19 por lobera (o isla). En el Cuadro 1 se presenta la lista de las islas visitadas, y en la Figura 2, los sitios de recolecta de las muestras. En el Anexo I se pueden ver con detalle los datos de las muestras, por lugar y en orden cronológico de visita.

Se procuró no desembarcar en la zona de captura para evitar la perturbación de los animales. Después de desembarcar, los participantes se aproximaron lentamente y agachados a la zona de crías, caminando a lo largo del cantil o por las rocas más alejadas del agua y los animales. Una vez cerca de las hembras y crías, se hizo una aproximación rápida hacia ellas. Usualmente, las hembras se arrojaban al agua y las crías se capturaban tomándolas de las aletas posteriores. Esta acción se llevó a cabo en aproximadamente cinco minutos. Cada cría capturada se sostuvo durante menos de un minuto, para determinar el sexo y recolectar la muestra. Esto consistió en cortar con tijeras de disección el extremo del segundo dígito interior de la aleta posterior izquierda. Siempre se tomó la muestra del mismo dígito, para evitar obtener muestras repetidas. Las muestras de tejido midieron 1 cm de largo, 1 cm de ancho y 3 mm de espesor, aproximadamente. Éstas se colocaron en un recipiente desechable de cartoncillo y en él se anotó el sexo del individuo al que perteneció la muestra.

Cada muestra se lavó con agua destilada y etanol al 70% (Medrano-González, com. pers.)⁵ y posteriormente se colocó en un criotubo de 2 mL, se etiquetó y se guardó en una hielera con bloques plásticos congelados. Una vez en el barco, las muestras se colocaron en un termo con nitrógeno líquido (-170°C). Después, las muestras se mantuvieron en un ultracongelador a -80°C, en la Universidad Autónoma de Baja California (Unidad Ensenada), para su posterior análisis.

⁵ Luis Medrano González. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.

Cuadro 1. Islas visitadas durante el trabajo de campo, en el Golfo de California y la costa occidental de la Península de Baja California. Se indican las citas de las coordenadas.

ISLAS CON LOBERAS REPRODUCTIVAS	COORDENADAS	
	LATITUD	LONGITUD
GOLFO DE CALIFORNIA		
Rocas Consag ¹	31° 12'	114° 27'
Isla San Jorge ¹	31° 01'	113° 15'
Isla Lobos ¹	30° 03'	114° 29'
Isla Granito ^{1,2}	29° 34'	113° 33'
Isla Ángel de la Guarda (lobera Los Cantiles) ^{1,2}	29° 32'	113° 29'
Isla Ángel de la Guarda (lobera Los Machos) ^{1,2}	29° 18'	113° 31'
Islote El Partido ^{1,2}	28° 53'	113° 02'
Islote El Rasito ^{1,2}	28° 49'	113° 00'
Isla San Esteban ^{1,2}	28° 43'	112° 35'
Isla San Pedro Mártir ^{1,2}	28° 23'	112° 20'
Isla San Pedro Nolasco ^{1,2}	27° 58'	111° 23'
Los Islotes ¹	24° 35'	110° 23'
COSTA OCCIDENTAL DE LA PENINSULA DE BAJA CALIFORNIA		
Isla Los Coronados ^{3,4}	32° 29'	117° 08'
Isla San Jerónimo ⁴	29° 48'	115° 47'
Isla San Benito ⁴	28° 19'	115° 33'
Isla de Cedros ^{4,5}	28° 15'	115° 15'
Isla Natividad ⁴	27° 53'	115° 06'
Isla Asunción ⁴	27° 10'	114° 22'
Isla Margarita ⁴	24° 29'	111° 53'

1 Zavala-González, 1990; 2 Zavala-González, 1993; 3 De Anda-Delgado, 1985;
4 Lowry *et al.*, 1992; 5 Salazar-Godoy, 1989

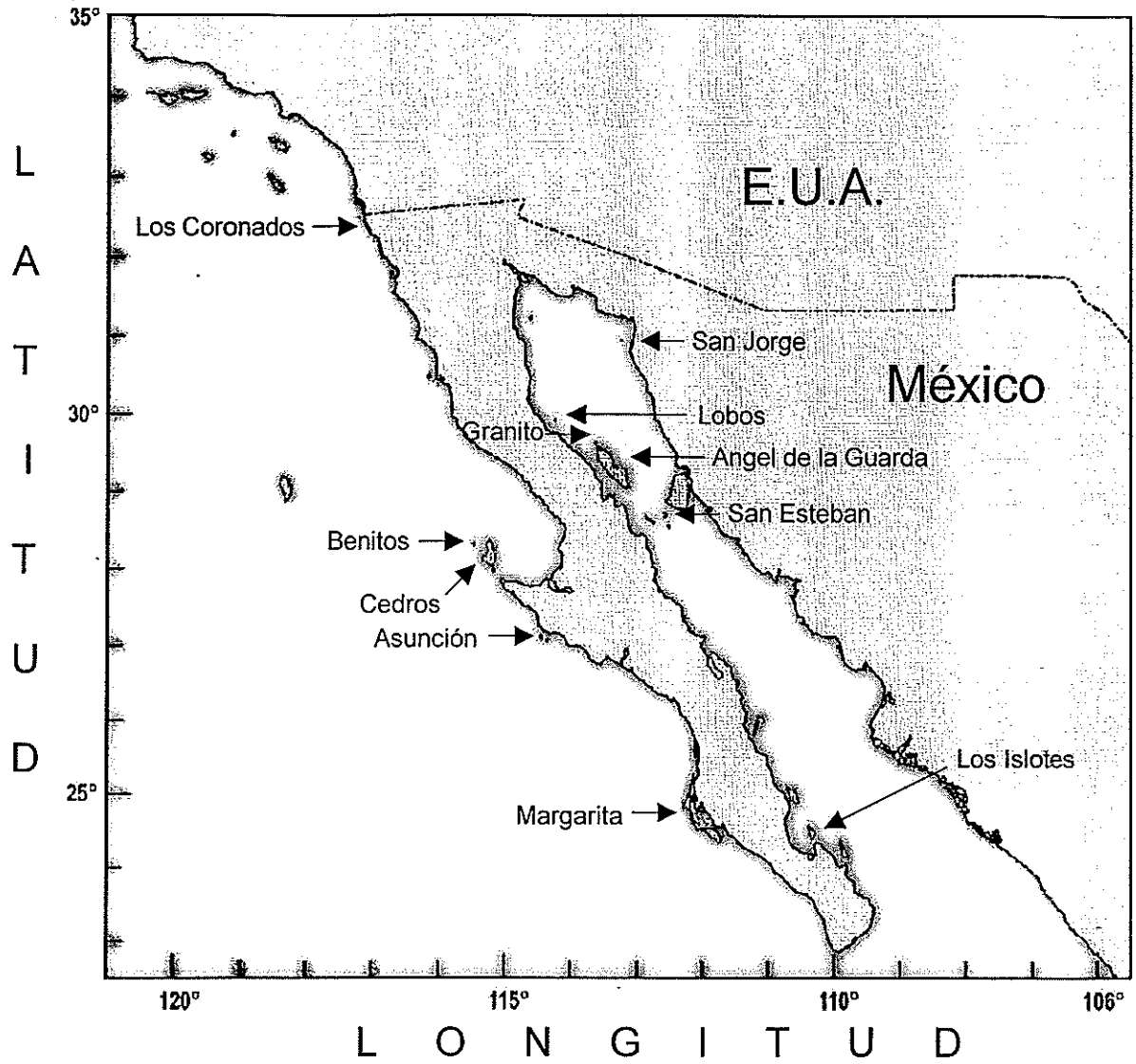


Figura 2. Localización de las islas donde se realizó la recolecta de muestras de crías de lobo marino de California.

TRABAJO DE LABORATORIO

EXTRACCIÓN DEL DNA GENÓMICO

El protocolo utilizado para la extracción y purificación del DNA genómico, se basó en el manual y guía corta de Palsbøll (no publicado), donde está incluido el corte del tejido, digestión y extracción. Dicho protocolo es una modificación al procedimiento habitual de la extracción fenol-cloroformo (Sambrook *et al.*, 1989). La extracción del DNA se realizó a partir de un promedio de 40 mg de tejido. Cada muestra se cortó, por separado, con navajas de bisturí. Posteriormente, el tejido se mantuvo durante 20 horas en digestión a temperatura ambiente y con agitación horizontal, bajo la acción de 40 μ L de proteinasa K (10 mg/mL, SIGMA o Gibco BRL), en 400 μ L de solución amortiguadora (buffer) de extracción [NaCl 0.1 M, Tris-HCl 10 mM, pH = 8, ácido etileno, diamino tetracético (EDTA) 1 mM] y 40 μ L de dodecil, sulfato de sodio (SDS) al 10%.

Se hicieron extracciones con 400 μ L de fenol equilibrado, posteriormente 200 μ L de fenol equilibrado y 200 μ L de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), y dos extracciones más con 400 μ L de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). El DNA se precipitó en frío en 50 μ L de acetato de sodio (3.0 M, pH = 4.8) y 1 mL de etanol al 100% (-20°C). Después, se lavó en 500 μ L de etanol al 70% y se secó el DNA por evaporación a temperatura ambiente. Por último, se resuspendió por una hora a 37°C en 400 μ L de solución amortiguadora 1X TE (Tris-HCl 10 mM, pH = 8.0, EDTA 1 mM).

El tamaño, concentración y calidad del DNA genómico se estimó por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio (EtBr,

10 mg/mL) e iluminados con luz ultravioleta (UV). El tamaño de los fragmentos de DNA se determinó por medio de un marcador de peso molecular de DNA de 500 pb (Gibco-BRL) y la concentración se estimó al comparar la intensidad de la banda objetivo con un electroferograma con diferentes diluciones de DNA de esperma de arenque (9.7 mg/mL, SIGMA). De las 177 muestras, se obtuvo DNA de buena calidad y con un alto peso molecular. De un promedio de 40 mg de muestra se obtuvieron de 48 a 60 μ g de DNA (120 a 150 ng/ μ L).

AMPLIFICACIÓN

Se amplificó el fragmento que comprende la región hipervariable I, de la región control del mtDNA, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se utilizaron dos cebadores (primers o iniciadores de síntesis), el "Tro" y el "Dxx". Tro se une a la cadena ligera de 5' a 3' y se localiza entre los genes de RNA de transferencia prolina y treonina (tRNA^{pro} y tRNA^{thr}). Dxx se une a la cadena pesada de 3' a 5' y se localiza en la parte central del dominio conservado del asa D (D-loop) (Figura 3). Las secuencias de los cebadores son:

Tro: 5' CCT CCC TAA GAC TCA AGG 3'

Dxx: 3' GTA GAC CAA AGA ATG AAG TCC 5'

Los cebadores fueron diseñados y proporcionados por el grupo de Ecología Molecular del Centro de Ciencia Pesquera del Suroeste (Southwest Fisheries Science Center), de La Jolla, California.

La reacción de la polimerasa en cadena se realizó en un termociclador Perkin Elmer modelo 480. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 μ L, que contenía una masa de 15 a 20 ng de DNA genómico, 1X de solución amortiguadora para Taq DNA polimerasa (Gibco-BRL), que contiene Tris-HCl

20 mM, pH = 8.4 y KCl 50 mM. Además, MgCl₂ 3 mM (Gibco-BRL), dNTP 200 μM de cada uno, cada cebador a concentración final de 0.3 μM y una unidad de Taq DNA polimerasa (Gibco BRL).

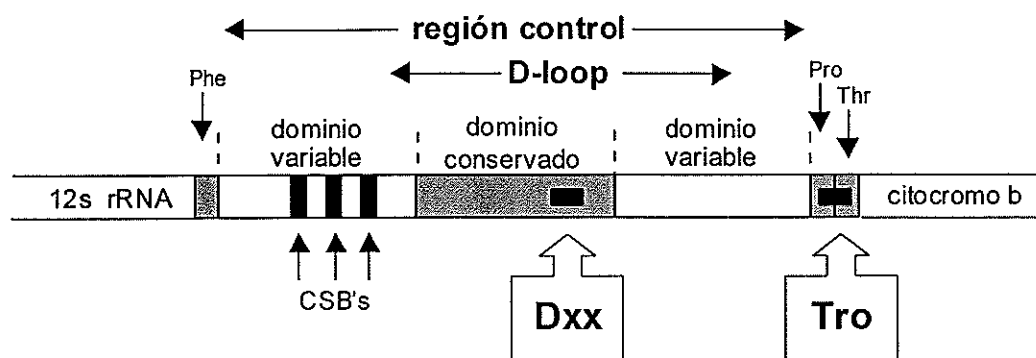


Figura 3. Parte del genoma mitocondrial donde se localizan los cebadores Tro y Dxx que se usaron para amplificar la región hipervariable I, de la región control. Modificado de Taberlet (1996; citado por Avise, 2000).

Las condiciones del termociclador para la amplificación incluyeron un ciclo de precalentamiento de 5 minutos a 94°C, seguido de 36 ciclos. Cada uno de estos ciclos consistió en 1 minuto de desnaturalización a 94°C, 1 minuto de reincorporación o acoplamiento de los cebadores a 50°C y 1 minuto y 30 segundos de extensión a 70°C. Se agregaron 2 segundos de incremento por ciclo en la extensión. Por último, un ciclo de 5 minutos de extensión final a 70°C.

La amplificación de la reacción de PCR se probó por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con EtBr (10 mg/mL) y visualizados con luz UV. Los productos de las amplificaciones exitosas se limpiaron en columnas de purificación (Concert™ Rapid PCR Purification System, Gibco-BRL) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Por último, las concentraciones de los

productos limpios de las amplificaciones, se corroboraron por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1%, antes de iniciar el ciclo de secuenciación.

SECUENCIACIÓN

Se utilizó el método de Sanger (Sanger *et al.* 1977) empleando inhibidores de terminación con marcadores fluorescentes para uso del secuenciador automático modelo ABI 377 (Applied Biosystems) del grupo de Ecología Molecular del Centro de Ciencia Pesquera del Suroeste (Southwest Fisheries Science Center), de La Jolla, California.

Para secuenciar los productos de la PCR, se amplificaron por separado la cadena pesada y la ligera de cada muestra por medio de un ciclo de secuenciación, en el termociclador. Dicho ciclo se optimizó a un volumen final de reacción de 12 μ L. Los componentes de la reacción fueron 60 a 100 ng del producto de PCR limpio de doble cadena, alguno de los cebadores antes descritos a una concentración final de 0.25 μ M y 2 μ L del reactivo de secuenciación BigDye™ (Applied Biosystems). El producto comercial BigDye™, contiene dNTP's marcados con fluorescencia y Ampli Taq® DNA polimerasa.

Las condiciones del termociclador para el ciclo de secuenciación incluyó un ciclo de precalentamiento de 5 minutos a 95°C, seguido de 25 ciclos. Cada uno de estos ciclos consistió en 30 segundos de desnaturalización a 95°C, 15 segundos de reincorporación o acoplamiento del cebador a 50°C y 4 minutos de extensión a 60°C. Por último, un ciclo de 2 minutos de extensión final a 60°C.

El producto del ciclo de secuenciación se purificó por medio de una precipitación en frío en 1.2 μ L de acetato de sodio (3.0 M, pH = 4.8) y 28 μ L de

etanol al 95%. Se colocó a -20°C durante 30 minutos. Después, se lavó en 250 μL de etanol al 70% y se secó el DNA por evaporación a 50°C . El producto seco se transportó al laboratorio de Ecología Molecular del Centro de Ciencia Pesquera del Suroeste; éste se resuspendió en 3 μL de solución amortiguadora de carga 5:1 de formamida-dextrano. Se desnaturalizó a 95°C por 4 minutos y se colocó en hielo antes de cargar 0.5 μL de muestra en el gel.

La secuencia es un fragmento de aproximadamente 350 pb. En el Anexo II se reportan las secuencias originales, las cuales se incluirán en la base de datos del GenBank.

ANÁLISIS DE DATOS

ALINEACIÓN DE SECUENCIAS

Del secuenciador automático se obtuvieron las secuencias nucleotídicas de ambas cadenas (cadenas complementarias), de cada muestra y sus respectivos cromatogramas.

Por medio del programa de cómputo SequencherTM 3.0.1., se alinearon los cromatogramas de las cadenas complementarias de cada muestra. Esto permitió corroborar cada una, y obtener una secuencia consenso. Se eliminaron aquellas muestras en las que la falta de claridad de alguno de los dos cromatogramas impidió la construcción de una secuencia consenso sin bases ambiguas (bases no determinadas).

Posteriormente, se alinearon sólo las secuencias consenso de todas las muestras. Aquellos sitios donde se presentó un cambio de base en alguna

secuencia con respecto al resto, fueron revisados nuevamente en sus respectivos cromatogramas, para evitar errores. Una vez alineadas todas las secuencias, se utilizó el programa UltraEdit-32, para editarlas a una misma longitud, con el criterio de máxima parsimonia (menor número de cambios).

Como referencia, y para corroborar que se haya amplificado la región hipervariable I de la región control, la secuencia final se comparó con la secuencia completa del genoma mitocondrial de la foca común (*Phoca vitulina*), publicada por Árnason y Johnsson (1992); el número de acceso en la base de datos del GenBank es NC 001325.

La identificación de los sitios variables entre las secuencias se realizó por medio del programa MEGA 1.02 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Kumar *et al.*, 1993).

DIVERSIDAD GENÉTICA

Por medio del programa Arlequin v.1.1 (Schneider *et al.*, 1997) se obtuvieron la diversidad haplotípica (\hat{H}) y nucleotídica ($\hat{\pi}_n$) así como el promedio de diferencias pareadas entre haplotipos ($\hat{\pi}$). Estos estimadores se calcularon por lobera (isla) y por grupos de acuerdo a los resultados de la estructura genética obtenidos en este trabajo (ver Anexo III).

Diversidad Haplotípica

Se define como la probabilidad de que dos haplotipos elegidos al azar sean diferentes en una muestra. La diversidad haplotípica y su varianza se calcularon de acuerdo a Nei (1987), como sigue:

$$\hat{H} = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 \right)$$

$$V(\hat{H}) = \frac{2}{n(n-1)} \left\{ 2(n-2) \left[\sum_{i=1}^k p_i^3 - \left(\sum_{i=1}^k p_i^2 \right)^2 \right] + \sum_{i=1}^k p_i^2 - \left(\sum_{i=1}^k p_i^2 \right)^2 \right\}$$

donde, n es el número de copias de genes (haplotipos) en la muestra, k es el número de haplotipos diferentes y p_i es la frecuencia del haplotipo i.

Diversidad Nucleotídica

Es la probabilidad de que dos nucleótidos homólogos elegidos al azar sean diferentes. Es equivalente a la diversidad haplotípica a nivel nucleotídico. La diversidad nucleotídica y su varianza se calcularon de acuerdo a Tajima (1983) y Nei (1987), como sigue:

$$\hat{\pi}_n = \frac{\sum_{i=1}^k \sum_{j<i} p_i p_j \hat{d}_{ij}}{L} \quad V(\hat{\pi}_n) = \frac{n+1}{3(n-1)L} \hat{d} + \frac{2(n^2+n+3)}{9n(n-1)} \hat{d}^2$$

donde \hat{d}_{ij} es el número de mutaciones por nucleótido estimadas que han ocurrido desde la divergencia de los haplotipos i y j, k es número de haplotipos y p_i es la frecuencia del haplotipo i. L es el número de nucleótidos en la secuencia.

Promedio de Diferencias Pareadas entre Haplotipos

El número promedio de diferencias entre todos los pares de haplotipos en la muestra, está dado por:

$$\hat{\pi} = \sum_{i=1}^k \sum_{j<i} p_i p_j \hat{d}_{ij}$$

donde \hat{d}_{ij} es el número de mutaciones estimadas que han ocurrido desde la divergencia de los haplotipos i y j , K es número de haplotipos y p_i es la frecuencia del haplotipo i . Este estimador es similar al anterior (diversidad nucleotídica) sin normalizar la longitud de la secuencia.

La varianza total de los procesos estocásticos y de muestreo, suponiendo que no hubo recombinación entre sitios y neutralidad selectiva, se obtuvo por medio de:

$$V(\hat{\pi}) = \frac{3n(n+1)\hat{\pi} + 2(n^2 + n + 3)\hat{\pi}^2}{11(n^2 - 7n + 6)}$$

El promedio de las diferencias pareadas entre haplotipos y su varianza se calcularon de acuerdo a Tajima (1983).

NEUTRALIDAD

El estadístico D de Tajima se utilizó para evaluar la hipótesis nula de neutralidad en el proceso de mutación (Tajima, 1989), para ello se utilizó el programa Arlequin v.1.1 (Schneider *et al.*, 1997). Este estadístico compara dos estimadores del parámetro poblacional θ ; uno se basa en el número de sitios segregantes en la muestra y el otro, en el número promedio de las diferencias pareadas entre haplotipos. La prueba supone que, bajo el modelo

del alelo infinito (sin recombinación), ambos estimadores deberían obtener el mismo valor. Una diferencia entre ambos se interpreta como una población no neutra (Schneider *et al.*, 1997). Aunque las diferencias entre los estimadores usualmente se atribuyen a efectos de selección, también pueden deberse a efectos de cuellos de botella, poblaciones en expansión (no estacionarias) o heterogeneidad en las tasas de mutación entre sitios (Tajima, 1993). El estadístico D de Tajima se define como:

$$D = \frac{\hat{\theta}_{\pi} - \hat{\theta}_S}{\sqrt{\text{Var}(\hat{\theta}_{\pi} - \hat{\theta}_S)}}$$

donde $\hat{\theta}_{\pi} = \pi$, $\hat{\theta}_S = S / \sum_{i=1}^{n-1} (1/i)$ y S es el número de sitios segregantes en la muestra. El valor P de la D observada, según la hipótesis de equilibrio poblacional y neutralidad selectiva, se calculó bajo el supuesto de una distribución beta, limitada por los posibles valores máximos y mínimos de D (Tajima 1989).

ESTRUCTURA POBLACIONAL

Para determinar la posible subdivisión de la población se realizó un análisis molecular de varianza (AMOVA) jerárquico, por medio del programa Arlequin v.1.1 (Schneider *et al.*, 1997). Dicho análisis se realizó por medio del índice de fijación de Wright, F-estadístico (Fst, Wright, 1965; Weir y Cockerham, 1984) y su análogo, Φ -estadístico (Φ st, Excoffier *et al.*, 1992). El índice Φ st, calcula la estructura genética con información del contenido alélico de los haplotipos (el número de mutaciones o cambios entre haplotipos) y sus frecuencias (Excoffier *et al.*, 1992). El índice de fijación de Wright (Fst), sólo considera la frecuencia de los haplotipos (Wright, 1965; Weir y Cockerham, 1984).

El nivel de significancia de los componentes de la varianza asociados a los diferentes niveles de estructura genética, se calculó por medio de procedimientos de permutación no-paramétricos (Excoffier *et al.*, 1992), por medio de 16,000 permutaciones. Esto garantiza menos del 1% de diferencia con la probabilidad exacta, en el 99% de los casos (Guo y Thomson, 1992). El tipo de permutaciones es diferente para cada componente de la varianza (ver algoritmos para el AMOVA). El resultado se consideró significativo a un valor de $\alpha = 0.05$. Es decir, bajo la hipótesis nula de panmixia, cuando $P < 0.05$ se considera que la población está estructurada.

Para obtener el índice Φ_{st} se utiliza la información del contenido alélico de los haplotipos para diseñar una matriz Euclidiana de distancias cuadradas, que se calcula antes de iniciar las permutaciones. Para el índice F_{st} , en cambio, esta matriz se ignora. Por lo tanto, los algoritmos para el AMOVA jerárquico de ambos índices (F_{st} y Φ_{st}), son los mismos. La matriz de distancias que se utilizó fue la de diferencias pareadas (pairwise difference), que estima el número de nucleótidos diferentes entre dos haplotipos y se define como:

$$\hat{d} = n_d \qquad V(\hat{d}) = \hat{d}(1 - \hat{d})/L$$

donde, n_d es el número de sustituciones entre dos secuencias de DNA y L es el número de nucleótidos.

El AMOVA jerárquico, para datos haplotípicos, considera tres niveles de estructura genética (entre grupos, entre poblaciones dentro de grupos, dentro de poblaciones), y se calcula como sigue:

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados (SSD)	Componentes de la varianza
Entre grupos	G-1	SSD (AG)	$n' \sigma_a^2 + n' \sigma_b^2 + \sigma_c^2$
Entre poblaciones dentro de grupos	P-G	SSD (AP/WG)	$n \sigma_b^2 + \sigma_c^2$
Dentro de poblaciones	N-P	SSD (WP)	σ_c^2
Total	N-1	SSD (T)	σ_T^2

donde G es el número de grupos en la estructura, P es el número total de poblaciones, N es el número total de copias de haplotipos. SSD es la desviación de la suma de cuadrados de las frecuencias, AG es entre grupos de poblaciones, AP/WG es entre poblaciones dentro de grupos, WP es dentro de las poblaciones y SSD (T) es el total de las desviaciones de la suma de cuadrados. Las n's y los índices (F_{st}, Φ_{st}) se definen como:

$$S_G = \sum_{g \in G} \sum_{p \in g} \frac{N_p^2}{N_g}, \quad n = \frac{N - S_G}{P - G}, \quad n' = \frac{S_G - \sum_{p \in P} \frac{N_p^2}{N}}{G - 1}, \quad n'' = \frac{N - \sum_{g \in G} \frac{N_g^2}{N}}{G - 1}$$

donde, G es el número de grupos en la estructura, P es número total de poblaciones, N es el número total de copias de haplotipos, N_p es el número de copias de haplotipos en la población p, N_g es el número de copias de haplotipos en el grupo g.

$$(\Phi_{CT}) \text{ ó } F_{CT} = \frac{\sigma_a^2}{\sigma_T^2}, \quad (\Phi_{SC}) \text{ ó } F_{SC} = \frac{\sigma_b^2}{\sigma_b^2 + \sigma_c^2}, \quad (\Phi_{ST}) \text{ ó } F_{ST} = \frac{\sigma_a^2 + \sigma_b^2}{\sigma_T^2}$$

(Φ_{ST}) ó F_{ST} y σ_c^2 se calcularon por medio de la permutación de haplotipos entre poblaciones, entre grupos. (Φ_{SC}) ó F_{SC} y σ_b^2 por la permutación de haplotipos entre poblaciones dentro de grupos. (Φ_{CT}) ó F_{CT} y σ_a^2 se calcularon a partir de la permutación de poblaciones entre grupos.

Las distancias genéticas para todos los pares de islas, se calcularon con los mismos índices (F_{st} , Φ_{st}), por medio del programa Arlequin v.1.1 (Schneider *et al.*, 1997). Según la hipótesis de no diferencia (panmixia) entre las poblaciones (islas o grupos de islas), la distribución nula de valores de F_{st} ó Φ_{st} de las distancias genéticas se obtuvieron al permutar los haplotipos entre las poblaciones (o islas). El valor de P de la prueba está dado por la proporción de permutaciones que llevan a un valor de F_{st} ó Φ_{st} igual o mayor al observado (Schneider *et al.*, 1997). El nivel de significancia se obtuvo por medio de 16,000 permutaciones.

La distancia genética entre pares de islas para ambos índices se calculó de la siguiente forma:

$$(\Phi_{ST}) \text{ ó } F_{ST} = \frac{\sigma_a^2}{\sigma_T^2}$$

Los valores de F_{st} y Φ_{st} de las comparaciones pareadas entre las 11 loberas se utilizaron como criterio para agrupar aquellas islas en las que no se encontró diferencia; es decir, en los casos en que no se rechazó la hipótesis nula de panmixia o no estructura, a un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$.

ANÁLISIS FILOGENÉTICO

En la reconstrucción de las relaciones filogenéticas entre los haplotipos se utilizaron tres métodos diferentes: Máxima Parsimonia, Grupos Pareados no Ponderados usando Medias Aritméticas (UPGMA, Unweighted Pair-Group Method using arithmetic Averages) y el método del Vecino más Cercano (Neighbor-Joining o NJ). En todos los métodos se incluyeron tres grupos externos para la construcción de los árboles: el lobo marino de Australia (*Neophoca cinerea*), el lobo marino de Steller (*Eumetopias jubatus*) y el lobo marino de Galápagos (*Zalophus c. wollebaeki*). Sin embargo, sólo el primero se utilizó para enraizar los árboles, ya que se le considera genéticamente más alejado de *Z. c. californianus* que el lobo marino de Steller (Wynen *et al.*, 2001). Las secuencias del lobo marino de Australia y del lobo marino de Steller se obtuvieron de la base de datos del GenBank, con números de acceso AF384408 (Wynen *et al.*, 2001) y L37027 (Maldonado *et al.*, 1995), respectivamente. La secuencia del lobo marino de Galápagos fue proporcionada por la Dra. Sarah Mesnick⁶.

Máxima Parsimonia

El árbol filogenético con el método de Máxima Parsimonia se construyó por medio del paquete de programas Phylip (Phylogeny Inference Package) versión 3.57c (Felsenstein, 1993). Primero se utilizó el programa Seqboot, con el que se obtuvieron 100 submuestras a partir de la muestra original y del mismo tamaño que ésta, por medio de un remuestreo aleatorio (bootstrap). En el programa DNAPars se generaron 100 árboles y en el programa Consense se construyó el árbol consenso.

⁶ Sarah L. Mesnick. National Marine Fisheries Service. Southwest Fisheries Science Center. La Jolla, California, USA.

El programa DNAPars construye un árbol parsimonioso no enraizado para secuencias de DNA. El algoritmo corresponde al de Eck y Dayhoff (1966; Kluge y Farris, 1969; citados por Felsenstein, 1993), análogo al árbol de Wagner. Además, utiliza el método de Fitch (1971; citados por Felsenstein, 1993), para contar el número de cambios de bases necesarios en un árbol dado. El método del programa DNAPars supone que: (1) cada sitio evoluciona independientemente, (2) linajes diferentes evolucionan independientemente, (3) la probabilidad de sustitución de una base en un sitio dado es pequeña, comparada con el tiempo involucrado en la longitud de una rama de la filogenia, (4) la cantidad de cambios esperada en diferentes ramas de la filogenia no varía tanto como para que dos cambios en una rama de tasa alta sean más probables que un cambio en una rama de tasa baja, (5) la cantidad esperada de cambios no varían suficiente entre sitios, de manera que dos cambios en un sitio sean más probables que un cambio en otro.

El programa Consense incluye grupos que se presentan en frecuencias menores al 50% de los casos hasta que termina de resolver el árbol, sin contradecir los grupos más frecuentes (Felsenstein, 1993). Por lo tanto, los árboles consenso que aquí se presentan no son equivalentes a un árbol consenso construido bajo el criterio de consenso estricto (strict consensus) o la regla de mayoría al 50% (50% majority rule).

UPGMA y NJ

El método de grupos pareados no ponderados usando medias aritméticas (UPGMA, Unweighted Pair-Group Method using arithmetic Averages) y el del Vecino más Cercano (Neighbor-Joining o NJ), utilizan matrices de distancia para generar los árboles filogenéticos. Ambos árboles se obtuvieron por medio

del paquete de programas Phylip (Phylogeny Inference Package) versión 3.57c (Felsenstein, 1993). Primero se utilizó el programa Seqboot para obtener 1000 submuestras, por medio de un remuestreo aleatorio (bootstrap). El programa DNAdist calculó 1000 matrices de distancia con el modelo de Jukes y Cantor (1969). Este modelo supone cambios independientes en todos los sitios y la misma probabilidad de que un sitio cambie a cualquiera de los tres nucleótidos alternativos. Con el programa Neighbor se generaron 1000 árboles, a partir de las matrices y en el programa Consense se construyó el árbol consenso.

UPGMA y NJ utilizan la matriz de distancia entre todos los pares de haplotipos, para formar conglomerados. Estos conglomerados se pueden interpretar como el proceso de identificación de grupos formados por haplotipos "ceranos" (Weir, 1996). UPGMA define la distancia entre conglomerados como el promedio de todas las distancias pareadas de los miembros de dos conglomerados (Weir, 1996). El algoritmo para NJ que utiliza el programa corresponde al método de Nei y Saitou (1987; citados por Felsenstein, 1993). NJ construye un árbol a partir de la identificación de las parejas de haplotipos más relacionados (Weir, 1996).

FILOGEOGRAFÍA

La filogeografía se determinó por medio de la reconstrucción de las relaciones filogenéticas entre los haplotipos y el sitio de origen de cada muestra. Para ello, se utilizó la Red de la Mínima Separación (Minimum Spanning Network).

Red de la Mínima Separación

La red de la mínima separación (MSN, Minimum Spanning Network), se obtuvo por medio del programa MINSPNET (Excoffier y Smouse, 1994). Este programa produce una lista de las conexiones entre los haplotipos, que se infieren de las mutaciones entre éstos, a partir de una matriz de distancia. Dicha matriz se calculó por medio del programa MEGA 1.02 (Kumar *et al.*, 1993) con base en el número de diferencias nucleotídicas, en comparaciones pareadas. Las conexiones entre los haplotipos se utilizaron para producir una gráfica. El resultado es una red, donde los haplotipos están unidos por vías parsimoniosas, y éstos se colocan como nodos y como puntas de las ramas de un árbol (Excoffier *et al.*, 1992).

RESULTADOS

ALINEACIÓN Y VARIACIÓN DE SECUENCIAS

Se obtuvieron un total de 170 secuencias sin bases ambiguas, a partir de 177 muestras. Estas secuencias correspondieron a la región hipervariable I de la región control del mtDNA. El primer residuo de la secuencia final de *Z. c. californianus* en este trabajo correspondió al sitio 16,325 de la secuencia de *Phoca vitulina* (Árnason y Johnsson, 1992; número de acceso en el GenBank es NC 001325).

Las secuencias se editaron a una longitud aproximada de 318 pb, de acuerdo al tamaño de las más cortas. Posteriormente, se encontró una zona altamente variable de 17 pb entre los sitios 105 a 121, donde las bases de timina (T) y citosina (C) se repitieron en cantidades diferentes (variantes en longitud), en las muestras (Cuadro 2). La edición de esta zona, por medio de la inserción de espacios, podría llevar a resultados diferentes dependiendo de la colocación de los mismos. Por lo tanto, se eliminó el segmento, y la longitud final de las secuencias fue de 301 pb (Cuadro 3).

Se encontró un posible caso de heteroplasmia en la secuencia de 9 muestras (As5, As8, Be7, Ca6, Cd3, Cd5, Cd6, Cd7, Cd10), en el sitio 19. Ésta se detectó al encontrar bases diferentes en el mismo sitio de las cadenas complementarias, pero se eliminó al cambiar la base de guanina (G) a citosina (C), ya que esta última corresponde a la base que presentaron las secuencias consenso del resto de las muestras.

Cuadro 2. Ejemplo de algunas secuencias entre los sitios 105 a 121, donde se encontró la zona variable de timinas (T) y citosinas (C). Nótese la cantidad de espacios (--) necesarios para editar las secuencias a la misma longitud, con respecto a la secuencia más larga (Gr10).

MUESTRA	5'	SECUENCIAS				3'
Gr10		TAGTATCTTTTTTTTTT	CCCCCCCC	CATGTAC		
Be7		TAGTATCTTTTTTT	--	CCCCCCCC	CATGTAC	
Es3		TAGTATCTTTT	-----	CCCCCC	CATGTAC	
Ls5		TAGTATCTTTTTTTTTT	--	CCCCCCCC	CATGTAC	
Sj20		TAGTATCTTTTTTT	-----	CCCCTA	TGTAC	
As4		TAGTATCTTTTT	-----	CCCCCTA	TGTAC	
As11		TAGTATCTTTCTCT	-----	CCCCCTA	TGTAC	
	0	1	1	1		3
SITIO	0	0	1	2		1
	1	5	1	1		8

Se encontraron un total de 33 haplotipos (Cuadro 4) a partir de 19 sitios variables. El 100% de las sustituciones fueron transiciones. En el Anexo I se puede ver el haplotipo asignado a cada muestra.

Cuadro 3. Ejemplo de una secuencia completa de la región hipervariable I de la región control del DNA mitocondrial de *Z. c. californianus*. Dirección 5' a 3' de la muestra Co7 (Isla Coronados), que corresponde al haplotipo H01. El sitio 1 equivale al 16,325 de *Phoca vitulina* (Árnason y Johnsson, 1992).

Secuencia de la Muestra Co7				
1	CACCATCAAC	ACCCAAAGCT	GACATTCTAA	TTAAACTATT
41	CCCTGACATG	ATTAAACTCC	CCACATTCAT	ATATACCACT
81	ACCCCTACTG	TGCCACCATA	GTATCTATGT	ACATCGTGCA
121	TTGATGGTTT	GCCCCATGCA	TATAAGCATG	TACATATCAT
161	GATTGATTTT	ACATGATGAC	ATAACTTCAA	ATAATTTGAC
201	TCAAATACTA	TAACTTCTTG	ATACAAATGT	AATTCACCTA
241	GTCCACGAAG	CTTGATCACC	AGGCCTCGAG	AAACCAGCAA
281	CCCTTGTAAG	AAGTGTACCT	C	

Cuadro 4. Parte de la secuencia de los 33 haplotipos, donde se presentan los 19 sitios variables; éstos están marcados con el número correspondiente dentro de la secuencia de 301 pb. Cada punto significa que no hay cambio con respecto al haplotipo H01.

HAPLOTIPO	SITIO VARIABLE																		
	2	7	9	0	1	2	2	2	9	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2
H01	C	T	G	T	A	G	A	T	T	C	T	A	T	T	A	A	T	A	G
H02	T
H03	.	.	.	C
H04	C
H05	A	C
H06	A
H07	G
H08	G	.	G
H09	A	G
H10	T	.	.	C	.	A	G
H11	.	.	.	C	.	A	G
H12	G
H13	G	A
H14	G	A	.	C
H15	T	.	.	.	G	A	.	C	C
H16	T	.	.	.	G	A	G	.	.	A
H17	T	.	.	.	G	A	A
H18	T	.	.	C	.	A	.	.	C	C	.	.
H19	T	.	.	C	.	A	.	.	C	.	.	G	C	.	.
H20	T	C	.	C	.	A	.	.	C	.	C	C	.	.
H21	T	A	.	.	C	C	.	.
H22	T	.	.	.	G	A	.	.	C	C	.	.
H23	T	.	.	C	.	A	C	.	.
H24	T	A	G	C	.	.
H25	T	.	.	.	G	A	G	C	.	.
H26	T	.	.	C	G	A	G	C	.	.
H27	T	.	.	C	.	A	G	C	.	.
H28	T	.	.	C	.	A	G	G	.	C	.	.
H29	G	A	G	.	C	C	.	.
H30	G	A	G	G	C	G	.
H31	G	A	G	G	C	.	.	.	C	G	.
H32	G	A	G	.	C	.	C	C	G	.
H33	.	.	A	.	G	A	G	C	.	.	C	.	.

DIVERSIDAD GENÉTICA Y NEUTRALIDAD

La probabilidad de que dos animales de la muestra (33 haplotipos) presenten haplotipos diferentes (diversidad haplotípica) fue de 91.83% ($s^2 = 0.82\%$). El valor más alto corresponde a Isla Lobos ($95.24\% \pm 4.03$) y el más bajo ($75\% \pm 10.71$) a Los Islotes (Cuadro 5). La diversidad nucleotídica total fue de 1.18% ($s^2 = 0.67\%$). El valor más alto corresponde a Isla Lobos ($1.45\% \pm 0.85$) y el más bajo ($0.62\% \pm 0.42$) a Los Islotes (Cuadro 5). El número promedio de diferencias entre todos los pares de haplotipos (promedio de diferencias pareadas entre haplotipos) fue de 3.57 ($s^2 = 1.82$; Cuadro 5). El valor más alto corresponde a Isla Lobos (4.36 ± 2.28) y el más bajo (1.88 ± 1.13) a Los Islotes (Cuadro 5).

Los resultados de los estimadores de diversidad genética por grupos (ver Anexo III), se presentan en el Cuadro 6. La parte norte del Golfo de California presenta los valores más altos para los tres estimadores, y la parte sur del Golfo los valores más bajos.

En todos los casos (loberas o grupos, Cuadros 5 y 6) la D de Tajima no fue significativa ($P > 0.3$). Por lo tanto, no se rechazó la hipótesis nula de neutralidad.

La distribución de los haplotipos y sus frecuencias relativas por grupos (ver Anexo III), se presentan en el Cuadro 7.

Cuadro 5. Índices de diversidad genética ($\pm s^2$) y prueba de neutralidad de Tajima de once loberas reproductivas del lobo marino de California. El orden de las loberas corresponde a su posición geográfica.

Lobera (isla)	N	Número de Haplotipos	Diversidad Haplotípica (%) H	Diversidad Nucleotídica (%) π_n	Promedio de Diferencias Pareadas π	Número de Sitios Polimórficos	D de Tajima
Coronados	12	6	81.82 \pm 9.57	0.99 \pm 0.63	2.98 \pm 1.68	7	1.1258 P = 0.853
Benitos	17	6	78.68 \pm 7.51	0.97 \pm 0.60	2.91 \pm 1.61	7	1.4036 P = 0.909
Cedros	19	7	84.21 \pm 4.73	1.10 \pm 0.66	3.32 \pm 1.78	8	1.5432 P = 0.930
Asunción	15	7	85.71 \pm 5.73	1.15 \pm 0.70	3.47 \pm 1.87	9	0.9466 P = 0.813
Margarita	16	6	85.83 \pm 4.70	0.99 \pm 0.61	2.98 \pm 1.64	7	1.4455 P = 0.915
Los Islotes	16	7	75.00 \pm 10.71	0.62 \pm 0.42	1.88 \pm 1.13	5	0.8052 P = 0.777
Esteban	15	8	83.81 \pm 8.52	0.92 \pm 0.58	2.76 \pm 1.55	10	-0.3880 P = 0.373
Cantiles	12	6	87.88 \pm 5.95	1.06 \pm 0.66	3.18 \pm 1.77	8	0.8030 P = 0.773
Granito	13	6	85.90 \pm 6.33	1.24 \pm 0.75	3.74 \pm 2.02	11	0.2268 P = 0.593
Lobos	15	11	95.24 \pm 4.03	1.45 \pm 0.85	4.36 \pm 2.28	12	0.7087 P = 0.749
San Jorge	20	10	90.00 \pm 4.28	1.23 \pm 0.72	3.69 \pm 1.95	13	0.0249 P = 0.523
Total	170	33	91.83 \pm 0.82	1.18 \pm 0.67	3.57 \pm 1.82	19	0.1933 P = 0.595

Cuadro 6. Índices de diversidad genética ($\pm s^2$) y prueba de neutralidad de Tajima por grupos. El Pacífico incluye desde Coronados hasta Margarita (ver Cuadro 5), Golfo Sur (Los Islotes), Golfo Centro (Esteban, Cantiles, Granito, Lobos) y Golfo Norte (San Jorge).

Zona (subgrupo)	N	Número de Haplotipos	Diversidad Haplotípica (%) H	Diversidad Nucleotídica (%) π_n	Promedio de Diferencias Pareadas π	Número de Sitios Polimórficos	D de Tajima
Pacífico	79	13	82.47 \pm 2.05	1.03 \pm 0.60	3.11 \pm 1.63	10	1.4257 P = 0.913
Golfo Sur	16	7	75.00 \pm 10.71	0.62 \pm 0.42	1.88 \pm 1.13	5	0.8052 P = 0.777
Golfo Centro	55	19	89.49 \pm 2.75	1.20 \pm 0.69	3.62 \pm 1.86	14	0.5431 P = 0.708
Golfo Norte	20	10	90.00 \pm 4.28	1.23 \pm 0.72	3.69 \pm 1.95	13	0.0249 P = 0.523
Total	170	33	91.83 \pm 0.82	1.18 \pm 0.67	3.57 \pm 1.82	19	0.1933 P = 0.595

Cuadro 7. Distribución de haplotipos por grupos y sus frecuencias relativas (%), valores entre paréntesis.

Haplotipo	Pacífico N=79	Golfo Sur N=16	Golfo Centro N=55	Golfo Norte N=20
H06	5 (6.33)	8 (50.00)	6 (10.90)	2 (10.00)
H01	17 (21.50)	2 (12.50)	1 (1.82)	5 (25.00)
H07	1 (1.27)	1 (6.25)	1 (1.82)	0
H24	8 (10.10)	1 (6.25)	0	0
H27	21 (26.60)	2 (12.50)	0	0
H12	1 (1.27)	0	15 (27.3)	2 (10.00)
H23	3 (3.80)	0	0	1 (5.00)
H16	1 (1.27)	0	0	0
H17	18 (22.80)	0	0	0
H25	1 (1.27)	0	0	0
H26	1 (1.27)	0	0	0
H28	1 (1.27)	0	0	0
H02	1 (1.27)	0	0	0
H09	0	1 (6.25)	0	0
H10	0	1 (6.25)	0	0
H29	0	0	5 (9.09)	0
H32	0	0	4 (7.27)	0
H30	0	0	1 (1.82)	0
H05	0	0	2 (3.64)	0
H08	0	0	1 (1.82)	0
H11	0	0	2 (3.64)	0
H13	0	0	2 (3.64)	0
H14	0	0	2 (3.64)	0
H20	0	0	1 (1.82)	0
H03	0	0	1 (1.82)	0
H15	0	0	1 (1.82)	0
H21	0	0	1 (1.82)	0
H33	0	0	6 (10.90)	2 (10.00)
H18	0	0	2 (3.64)	1 (5.00)
H22	0	0	1 (1.82)	1 (5.00)
H04	0	0	0	4 (20.00)
H19	0	0	0	1 (5.00)
H31	0	0	0	1 (5.00)

ESTRUCTURA POBLACIONAL

Con base en los valores de F_{st} y Φ_{st} de las comparaciones pareadas entre las 11 loberas (ver Anexo III) se encontraron 4 grupos bien definidos: Pacífico, Golfo Sur, Golfo Centro y Golfo Norte. El grupo del Pacífico incluye las Islas Coronados, Benitos, Cedros, Asunción y Santa Margarita; el Golfo Sur está representado por Los Islotes; Golfo Centro incluye la Isla San Esteban, lobera Los Cantiles en la Isla Ángel de la Guarda, Isla Granito e Isla Lobos. El Golfo Norte está representado por Isla San Jorge.

Las comparaciones pareadas entre los grupos resultaron significativas, en todos los casos, para ambos índices (Cuadro 8). En general los valores de F_{st} y Φ_{st} se pueden considerar relativamente altos. Existen diferencias entre los dos estimadores, en todas las comparaciones.

Cuadro 8. Valores de F_{st} y Φ_{st} en comparaciones pareadas entre los cuatro grupos (cuadrante inferior), y sus valores correspondientes de P (cuadrante superior), los cuales se calcularon por medio de 16,000 permutaciones al azar. En todos los casos se rechazó la hipótesis nula de panmixia (no estructura), a un nivel de significancia de $P < 0.05$.

	Pacífico	Golfo Sur	Golfo Centro	Golfo Norte
Pacífico		$P= 0.000$ $P= 0.016$	$P= 0.000$ $P= 0.000$	$P= 0.001$ $P= 0.001$
Golfo Sur	$F_{st} = 0.1210$ $\Phi_{st} = 0.0950$		$P= 0.000$ $P= 0.000$	$P= 0.006$ $P= 0.035$
Golfo Centro	$F_{st} = 0.1285$ $\Phi_{st} = 0.1736$	$F_{st} = 0.1187$ $\Phi_{st} = 0.1479$		$P= 0.006$ $P= 0.043$
Golfo Norte	$F_{st} = 0.0828$ $\Phi_{st} = 0.1317$	$F_{st} = 0.1001$ $\Phi_{st} = 0.0759$	$F_{st} = 0.0491$ $\Phi_{st} = 0.0427$	

El AMOVA entre los cuatro grupos preestablecidos muestra una división de la población estadísticamente significativa para ambos índices ($F_{st} = 0.1095$, $P < 0.001$; $\Phi_{st} = 0.1387$, $P < 0.001$), y el porcentaje debido a la varianza entre los cuatro grupos fue de 10.95 y 13.87%, respectivamente.

Los resultados del AMOVA jerárquico atribuyen cerca del 90% (89.02% para el estimador F_{st} , Cuadro 9 y 85.59% para Φ_{st} , Cuadro 10) del total de la varianza molecular a la variación de los haplotipos dentro de las islas.

En ambos AMOVAs (Cuadros 9 y 10), el índice de fijación F_{sc} , que se obtuvo por la permutación de haplotipos entre poblaciones dentro de grupos, resultó no significativo. La permutación de poblaciones entre grupos (F_{ct}) fueron significativos con los dos índices (Cuadros 9 y 10).

Cuadro 9. Análisis molecular de varianza (AMOVA) jerárquico entre cuatro grupos (Pacífico, Golfo Sur, Centro y Norte), por medio del índice de fijación de Wright, F_{st} . El valor P se calculó a partir de 16,000 permutaciones al azar.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación
Entre grupos	3	7.103	0.05211	10.93
Entre islas dentro de grupos	7	2.997	0.00024	0.05
Dentro de las islas	159	67.506	0.42457	89.02
Total	169	77.606	0.47691	
Índices de fijación:				
$F_{sc} = 0.0006$		$P = 0.462 \pm 0.004$		
$F_{st} = 0.1098$		$P = 0.000 \pm 0.000$		
$F_{ct} = 0.1093$		$P = 0.000 \pm 0.000$		

Cuadro 10. Análisis molecular de varianza (AMOVA) jerárquico entre cuatro grupos (Pacífico, Golfo Sur, Centro y Norte), por medio del índice de fijación Φ -estadístico (Φ_{st}). El valor P se calculó por medio de 16,000 permutaciones al azar.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación
Entre grupos	3	33.890	0.2525	13.47
Entre islas dentro de grupos	7	13.067	0.0176	0.94
Dentro de las islas	159	255.125	1.6046	85.59
Total	169	302.082	1.8747	
Indices de fijación:				
F _{sc} = 0.0109		P = 0.290 ± 0.003		
F _{st} = 0.1441		P = 0.000 ± 0.000		
F _{ct} = 0.1347		P = 0.000 ± 0.000		

ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Existe una congruencia en la relación de los haplotipos entre el árbol de Máxima Parsimonia (Figura 4) con respecto a UPGMA y NJ (Figuras 5 y 6, respectivamente) y entre ellos mismos. Es decir, con los tres métodos las grandes ramas están formadas por los mismos haplotipos; como ejemplo obsérvese la rama formada por los haplotipos H19, H18, H20, H23, H21 y H22.

La topología del árbol consenso con los tres métodos presenta niveles bajos en los valores de remuestreo (< 50%) en la mayoría de los nodos (Figuras 4, 5 y 6). Se puede observar que el haplotipo de *Z. c. wollebaeki* se agrupa junto con los haplotipos de *Z. c. californianus* (Figura 4 y 6).

Ninguno de los tres métodos (Máxima Parsimonia, UPGMA y NJ) da como resultado una marcada diferenciación geográfica. Sin embargo, algunos clados

están formados por haplotipos que corresponden en su mayoría a un grupo o zona geográfica; por ejemplo, los haplotipos H29, H30, H31, H32 y H33, corresponden al Golfo Norte y Golfo Centro; también H24, H25, H26, H27 y H28, pertenecen al Pacífico y dos de ellos (H24 y H27) los comparten con el Golfo Sur.

En las dos primeras grandes ramas de la Figura 4 (de H19 a H22 y de H15 a H12, respectivamente) se pueden encontrar haplotipos compartidos por los grupos Golfo Centro, Golfo Norte y Pacífico, mientras que en la siguiente rama (de H02 a H10) existen haplotipos de todas las zonas. Dichas ramas también se pueden observar en las Figuras 5 y 6.

En la Figura 6, se observa que los haplotipos que corresponden al Golfo Centro (H29, H30, H32, H33) y Golfo Norte (H31 y H33), son ramas basales o ancestrales.

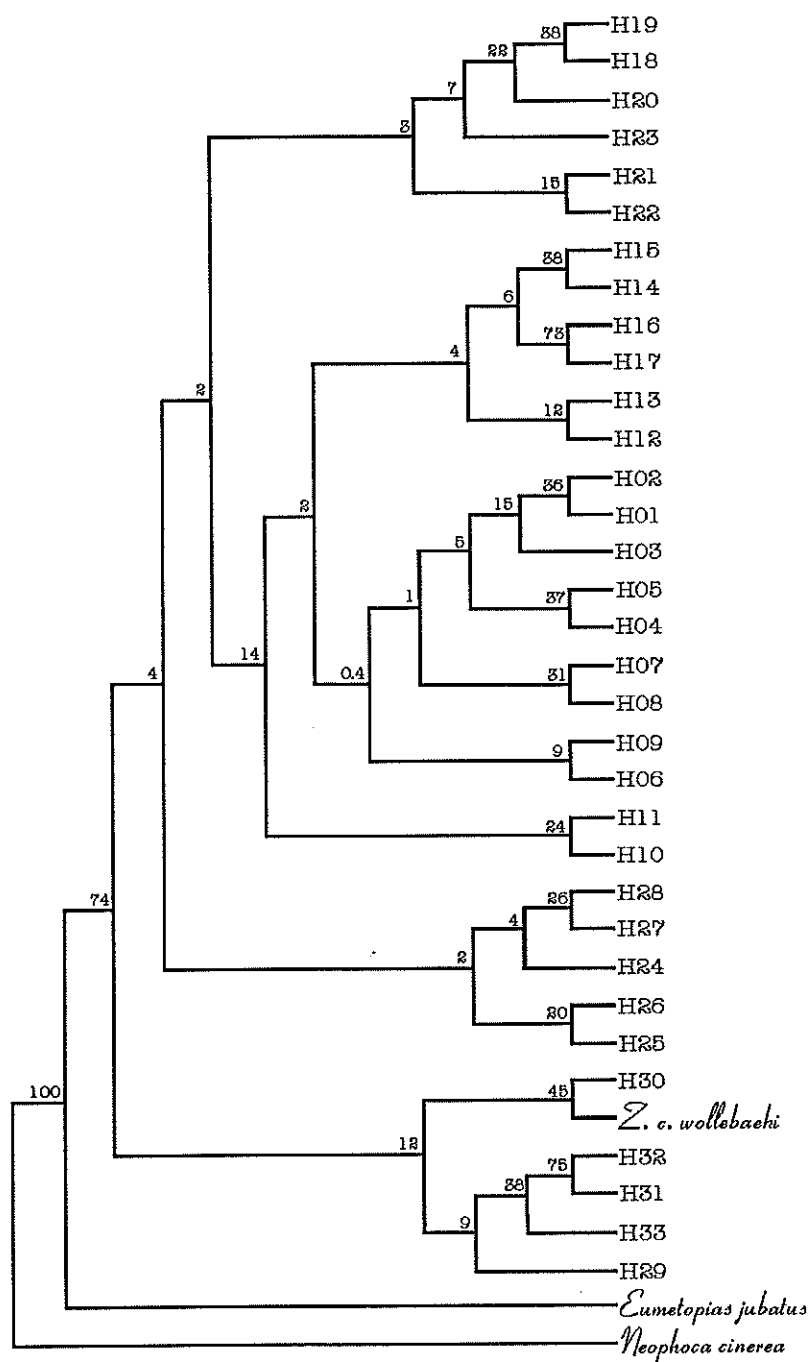


Figura 4. Árbol consenso de 33 haplotipos de *Z. c. californianus*, por medio del método de Máxima Parsimonia, a partir de 100 árboles. Los números en los nodos indican los valores de robustez del remuestreo. El sitio de origen de cada haplotipo se puede ver en el Cuadro 7.

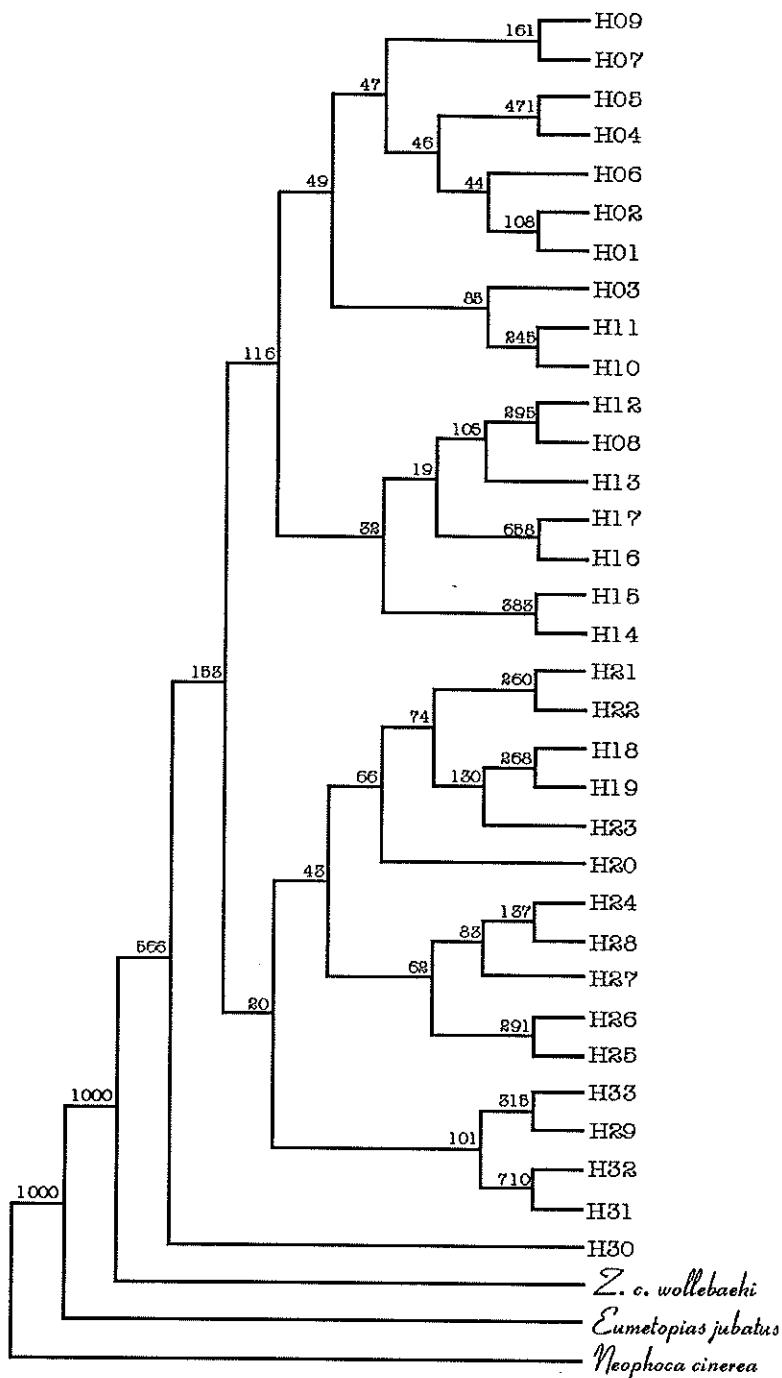


Figura 5. Relación genética entre 33 haplotipos de *Z. c. californianus*, por medio del método UPGMA. La distancia genética se calculó a partir del método Jukes-Cantor, entre todos los pares de haplotipos. La ubicación de los nodos es proporcional a la distancia genética entre los haplotipos. Los valores del remuestreo, en cada nodo, son resultado de 1000 réplicas. El sitio de origen de cada haplotipo se puede ver en el Cuadro 7.

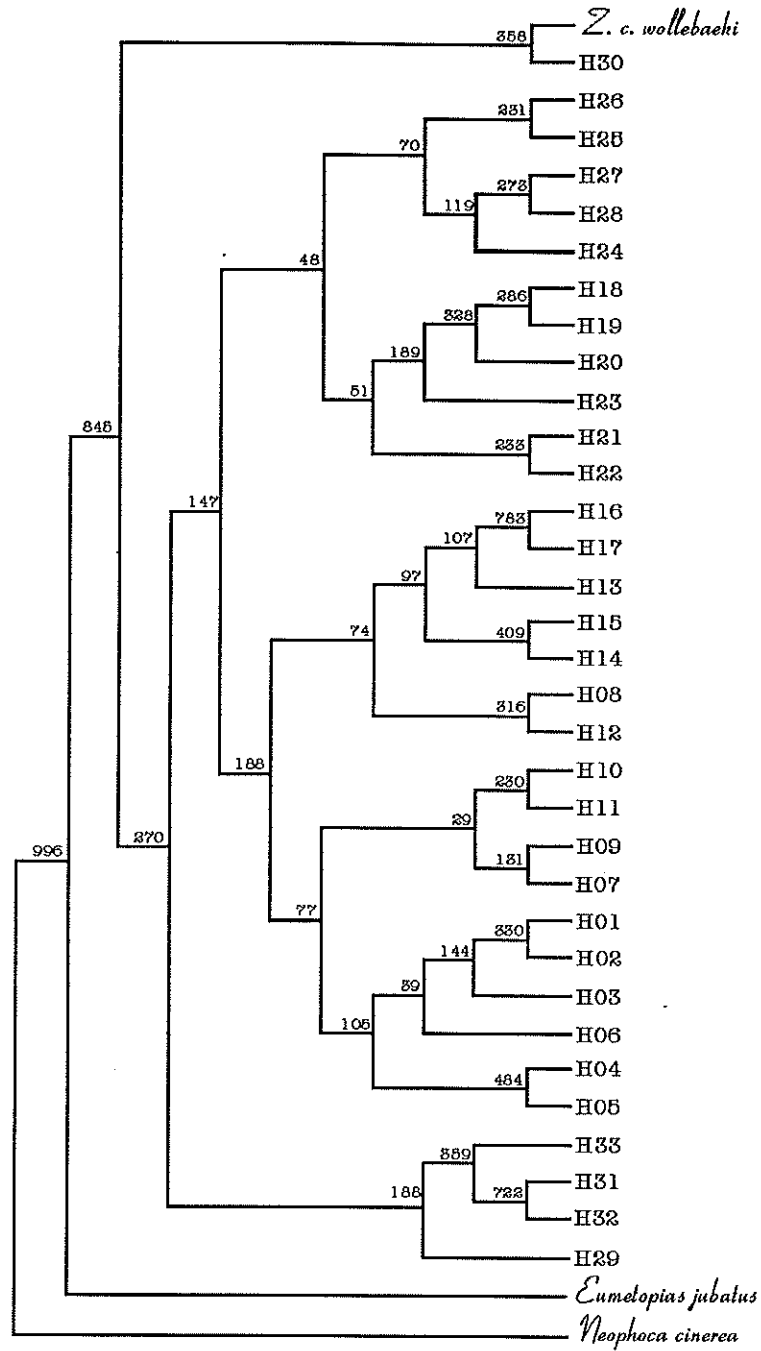


Figura 6. Relación genética entre 33 haplotipos de *Z. c. californianus*, por medio del método Neighbor-Joining. La distancia genética se calculó a partir del método Jukes-Cantor, entre todos los pares de haplotipos. La ubicación de los nodos es proporcional a la distancia genética entre los haplotipos y al orden de aparición de los mismos. Los valores del remuestreo, en cada nodo, son resultado de 1000 réplicas. El sitio de origen de cada haplotipo se puede ver en el Cuadro 7.

FILOGEOGRAFÍA

Con base en la red de la mínima separación (MSN, Minimum Spanning Network), se graficó la relación entre los haplotipos a través del número de cambios entre ellos, así como la frecuencia de los mismos (Figura 7). En esta red se puede observar que los haplotipos H1, H6, H27, H12 y H17 son los que presentan las frecuencias más altas. En la mayoría de los casos, la diferencia entre los haplotipos está dada por una sola mutación, excepto en la parte inferior izquierda de la red, donde el número de cambios entre haplotipos está dado por dos o tres mutaciones. Los haplotipos de los grupos externos están separados de los de *Z. c. californianus* por 30 ó 35 cambios, cuando se trata de diferentes especies (*Eumetopias jubatus* y *Neophoca cinerea*, respectivamente) y sólo por 6 cambios o mutaciones, cuando se refiere a una subespecie (*Z. c. wollebaeki*).

En la Figura 8 se presenta el mismo gráfico, donde cada haplotipo está marcado con colores que indican el sitio de recolecta de la muestra, con base en los cuatro grupos que se encontraron en el análisis de la estructura poblacional. En este caso, cada color tiende a agruparse en sitios diferentes dentro del gráfico. Sin embargo, los mismos colores muestran una división de la red en la parte media, donde la agrupación de los colores es más clara en la parte izquierda del gráfico que en la parte derecha. Es decir, se puede observar un grupo más estructurado a partir del origen del haplotipo (color) en la parte izquierda del gráfico que en la parte derecha. También se puede observar que los grupos externos se encuentran asociados a haplotipos que pertenecen al Golfo Centro y Golfo Norte exclusivamente.

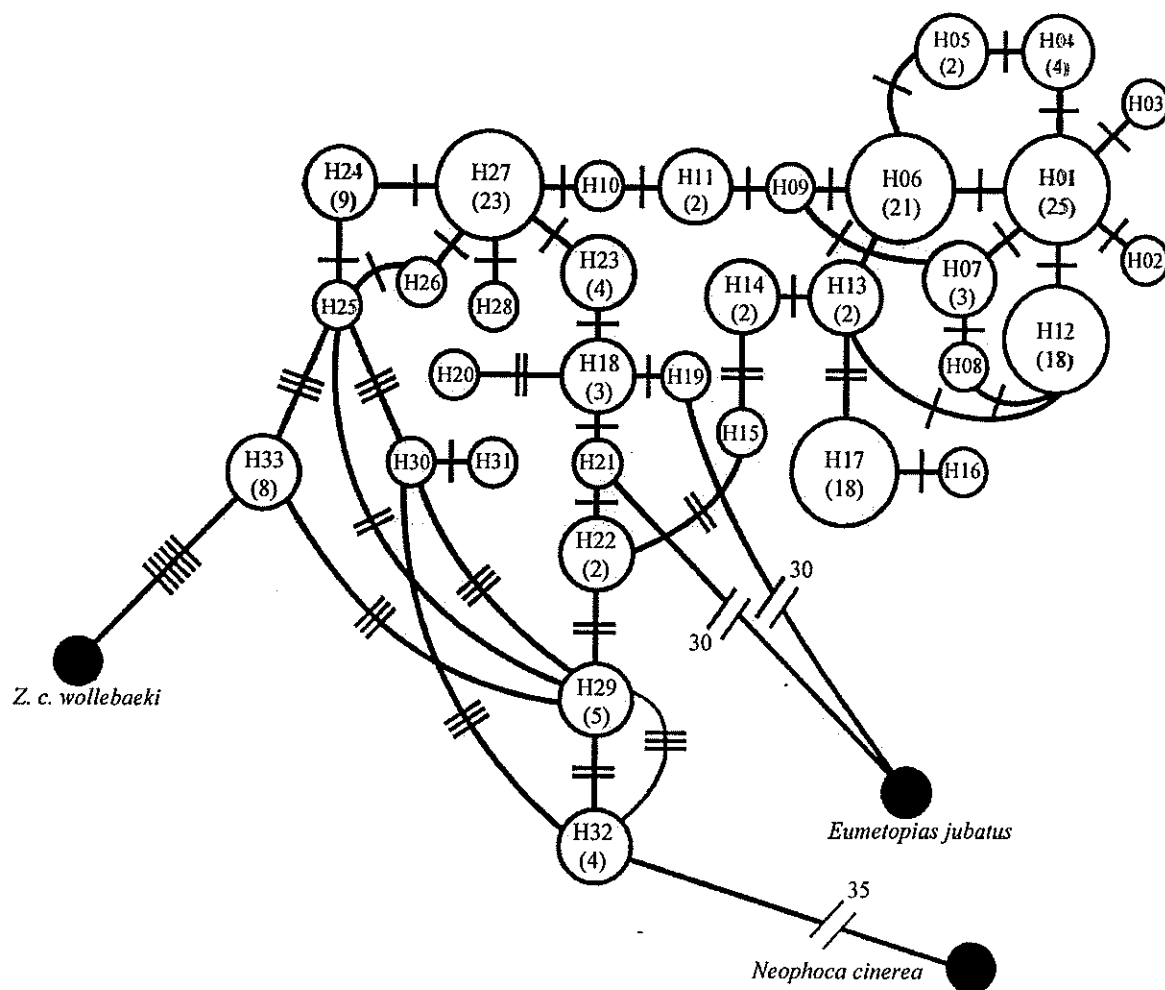


Figura 7. Red de la mínima separación (Minimum Spanning Network), donde se muestran los 33 haplotipos de la muestra de *Z. c. californianus* (170 individuos). Cada círculo representa un haplotipo; dentro de cada uno está marcado el número y su frecuencia, entre paréntesis. Los círculos pequeños representan a un individuo. Las marcas transversales entre los haplotipos indican el número de mutaciones entre ellos. Las líneas rectas se originaron por relaciones directas y las líneas curvas son relaciones alternativas. Los círculos negros representan a los grupos externos y en la discontinuidad está marcado el número de mutaciones entre éstos y el haplotipo más cercano de *Z. c. californianus*. Los grupos externos incluyen al lobo marino de Galápagos (*Z. c. wollebaeki*), el lobo marino de Steller (*Eumetopias jubatus*) y el lobo marino de Australia (*Neophoca cinerea*).

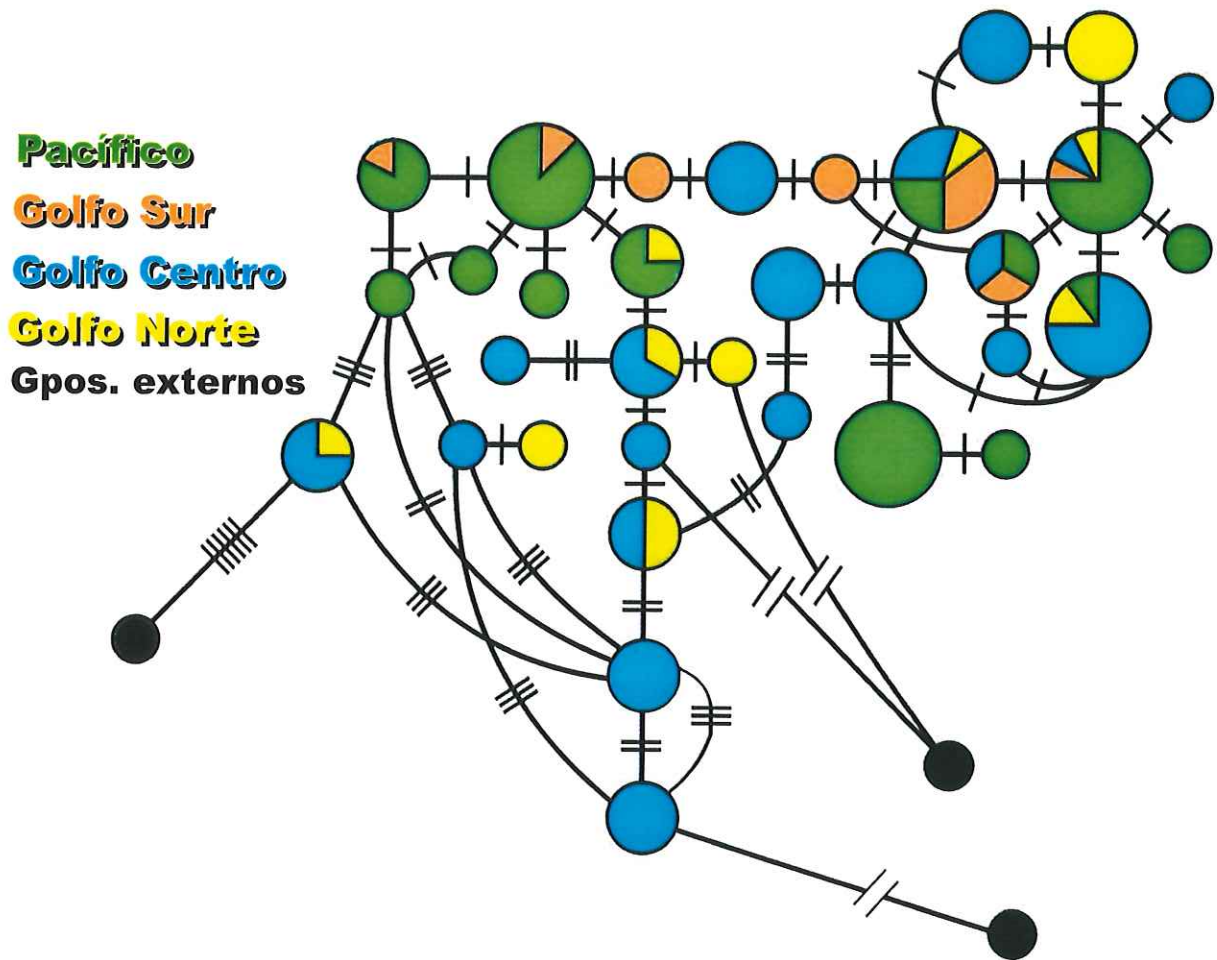


Figura 8. Red de la mínima separación (Minimum Spanning Network), donde se muestran los 33 haplotipos de la muestra de *Z. c. californianus* (170 individuos). Cada círculo representa un haplotipo y el tamaño su frecuencia. Los círculos grandes son 10 ó más individuos, los medianos de dos a nueve individuos y los pequeños un individuo. Los círculos negros representan los grupos externos (ver Figura 7). Las marcas transversales entre los haplotipos indican el número de mutaciones entre ellos. Las líneas rectas se originaron por relaciones directas y las líneas curvas son relaciones alternativas. Los colores indican el lugar de colecta de la muestra. El Pacífico incluye las islas Coronados, Benitos, Cedros, Asunción y Santa Margarita; el Golfo Sur está representado por Los Islotes; el Golfo Centro por la Isla San Esteban, Iobera Los Cantiles en la Isla Ángel de la Guarda, Isla Granito e Isla Lobos; el Golfo Norte está representado por Isla San Jorge.

En la Figura 9, se puede observar un patrón filogeográfico claro, cuando el MSN se utiliza para presentar la diversidad haplotípica por zona, donde la presencia del haplotipo en cada zona está marcado con negro, y la ausencia con círculos vacíos. Los haplotipos H1 y H6 están presentes en todas las zonas y son los que presentan las frecuencias más altas. En todas las zonas hay representantes de los dos grupos de haplotipos (izquierda y derecha del gráfico). El Golfo Centro presenta la mayor diversidad de haplotipos y el Golfo Sur la menor. La parte inferior izquierda del MSN está presente sólo en el Golfo Centro y Golfo Norte.

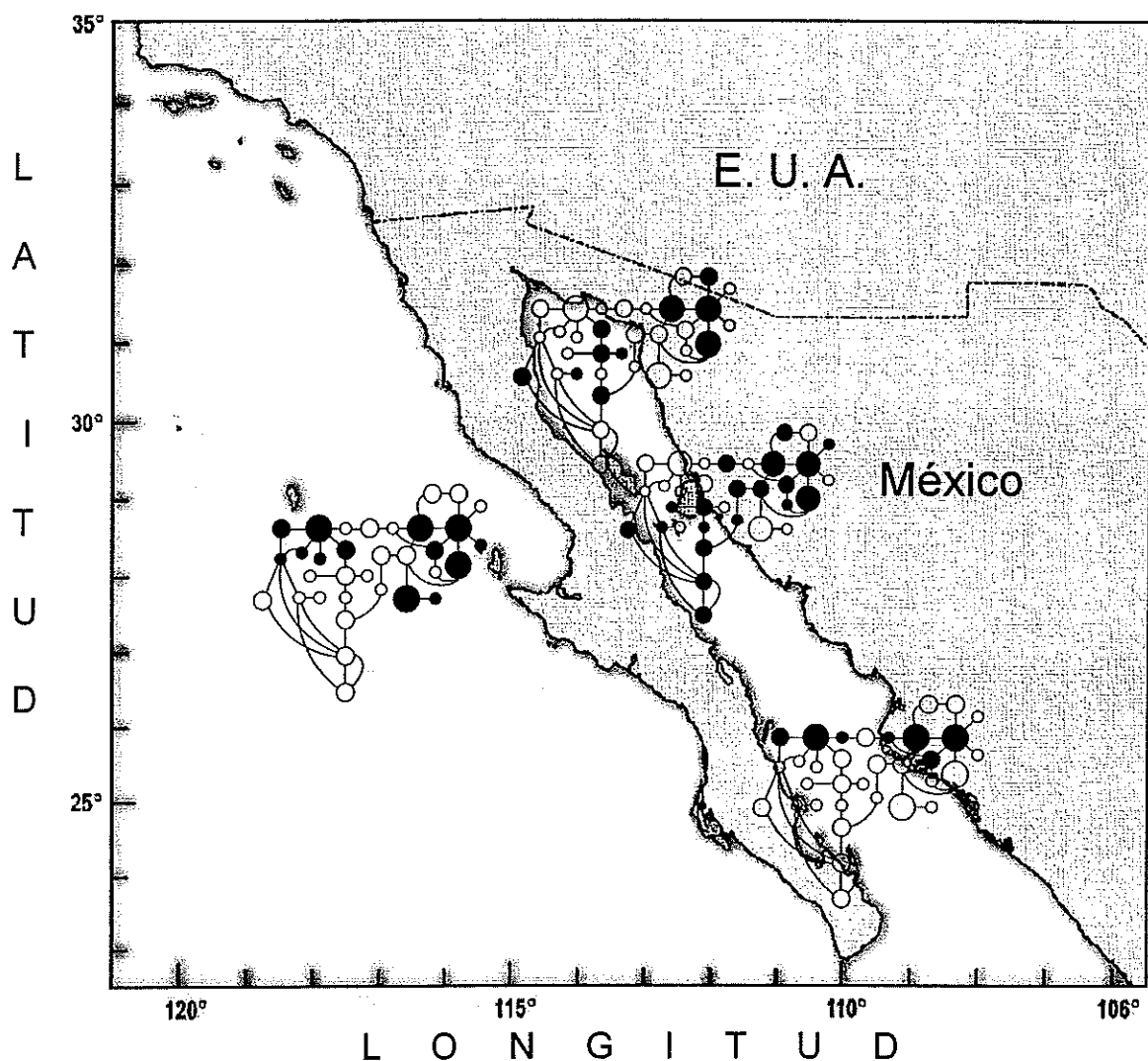


Figura 9. Las gráficas en el mapa muestran la red de la mínima separación (Minimum Spanning Network), por zona. El arreglo de los haplotipos es similar a los de las Figuras 7 y 8. Cada gráfica tiene marcados en negro los haplotipos que se encontraron en dicha zona. El Pacífico incluye las islas Coronados, Benitos, Cedros, Asunción y Santa Margarita; el Golfo Sur está representado por Los Islotes; el Golfo Centro por la Isla San Esteban, Iobera Los Cantiles en la Isla Ángel de la Guarda, Isla Granito e Isla Lobos; el Golfo Norte está representado por Isla San Jorge.

DISCUSIÓN

ALINEACIÓN DE SECUENCIAS

Cuando existe variación en longitud entre las secuencias (individuos), éstas se editan por medio de la inserción de espacios (Cuadro 2), hasta conseguir la misma longitud en todas las secuencias con respecto a la secuencia más larga (Gr10). Sin embargo, en el fragmento altamente variable que se encontró entre los sitios 105 y 121 de todas las secuencias, la colocación de los espacios no es fácil de decidir. En algunas secuencias, la mutación se puede interpretar como una inserción, una eliminación o una sustitución; si los espacios se colocan de una u otra forma. Si se toma como ejemplo la secuencia de la muestra As11 (Cuadro 2), se puede observar que el sitio 111 no presenta cambio con respecto a la primera secuencia (Gr10). Si los cuatro espacios (que hay en la secuencia de As11) se colocaran entre los sitios 109 y 110, para alinear la C (sitio 110 de As11) con la C de la primera secuencia (sitio 115 de Gr10), entonces la T de As11 correspondería a una transición con respecto a la secuencia de Gr10. Lo anterior se interpretaría como una diferencia entre Gr10 y As11, cuando tal vez no existe. Además, se sabe que la evolución extremadamente rápida de algunos genes mitocondriales puede resultar en convergencia, lo que crea confusión en las relaciones filogenéticas (Dowling *et al.*, 1990). Este problema parece ser particularmente complejo en la variación en el número de copias de las secuencias repetidas en tandem (Dowling *et al.*, 1990), como es el caso del fragmento que se encontró entre los sitios 105 y 121. Por lo anterior, se eliminó dicho fragmento, ya que ésta se considera la medida más conservadora.

Es importante mencionar que las repeticiones de citosinas y timinas no se pueden atribuir a problemas durante la amplificación o a la falta de resolución de los cromatogramas. En todos los casos, las cadenas complementarias de cada muestra empataron al 100%. Esta misma zona ha sido detectada en diferentes especies de pinnípedos (Lento, com. pers.)⁷.

Por otra parte, se encontró que el 100% de las sustituciones fueron transiciones. Esto no concuerda con lo reportado para *Z. c. californianus* (71% de transiciones, Maldonado *et al.*, 1995). Sin embargo, en estudios intraespecíficos, cuando se analizan secuencias de la región control del mtDNA, la proporción de transiciones con respecto a las transversiones, es muy alta (> 90%, Greenberg *et al.*, 1983; Thomas *et al.*, 1990). De la misma forma, Wynen *et al.* (2001) reportan valores de 90 a 100% de transiciones en secuencias de la región control, cuando realizaron comparaciones intraespecíficas de 13 especies de pinnípedos (familia Otariidae, a la que pertenece *Z. c. californianus*), y de 33.3% sólo en una especie de la misma familia. Además, se han reportado valores diferentes en cuanto al porcentaje de transiciones en secuencias del lobo marino de Steller (*Eumetopias jubatus*), tal vez la especie más cercana a *Z. c. californianus*. Wynen *et al.* (2001) encontraron que el 100% de las sustituciones fueron transiciones; mientras que Bickham *et al.* (1996) reportaron una proporción de 25:4 transiciones por transversiones; es decir, 84% de las sustituciones fueron transiciones. Estas diferencias son similares a las diferencias reportadas entre el trabajo de Maldonado *et al.* (1995) y este estudio.

⁷ Gina M. Lento. School of Biological Sciences, University of Auckland. Auckland, New Zealand.

DIVERSIDAD GENÉTICA Y NEUTRALIDAD

La diversidad haplotípica global (0.9183) sugiere que los linajes mitocondriales han tenido suficiente tiempo para evolucionar y diferenciarse. Lo anterior resulta en una proporción alta de haplotipos exclusivos para cada zona (Cuadro 7), que difieren entre ellos por muy pocas bases ($\pi_n = 0.0185 \pm 0.0067$).

La diversidad haplotípica global del presente estudio ($\hat{H} = 0.9183 \pm 0.0082$), es similar al valor reportado por Bickham *et al.* (1996) para el lobo marino de Steller (0.927). Aunque este estimador no fue reportado por Maldonado *et al.* (1995) para el lobo marino de California, la diversidad nucleotídica concuerda con el resultado de este trabajo. Para las loberas del Pacífico se reportó una diversidad nucleotídica de entre 0.405 y 1.708 (Maldonado *et al.*, 1995), que corresponde a $\pi_n = 1.03 \pm 0.60$ (Cuadro 6). Los mismos autores reportaron una diversidad nucleotídica de 1.021 para Bahía de Los Angeles, en el Golfo de California; en este estudio la zona más cercana corresponde a las islas del grupo Golfo Centro ($\pi_n = 1.20 \pm 0.69$, Cuadro 6).

La diversidad genética es más alta en el Golfo Norte, seguida del Golfo Centro, Pacífico y Golfo Sur (Cuadro 6). Esta gran diversidad en el Golfo Norte y Golfo Centro, puede estar asociada a la permanencia de los individuos en esta zona durante mucho tiempo, debido a que el Golfo puede funcionar como una trampa para especies templadas que mantienen poblaciones aisladas subtropicales (Norris y McFarland, 1958; Barnes, 1985; ambos citados por Rosel y Rojas-Bracho, 1999). Además de dicho aislamiento, pudo haber ocurrido más de una incursión de lobos hacia el golfo, durante diferentes eventos.

Por otro lado, cuando existen niveles bajos de diversidad haplotípica, éstos pueden ser resultado de un efecto fundador o de una reducción de la población,

aunque después se recupere demográficamente. Un ejemplo claro es el de la foca elefante del norte (*Mirounga angustirostris*), la cual se cazó durante el siglo XIX; en 1884 los coleccionistas encontraron y extrajeron 153 focas, por lo que la población se consideró casi extinta (Bartholomew y Hubbs, 1960; Hoelzel *et al.*, 1993). El mismo autor estimó, por medio de un modelo de simulación, la cantidad de individuos a partir de los cuales se recuperó demográficamente la población y reportó un total de 10 a 30 individuos (Hoelzel *et al.*, 1993). Actualmente, existen aproximadamente 127,000 focas (LeBoeuf y Laws, 1994; citados por Hoelzel, 1997), pero la diversidad haplotípica es de 0.420 (Hoelzel *et al.*, 1993).

Con base en la diversidad genética que se encontró en este estudio, se sugiere que la caza y aprovechamiento del lobo marino de California, tanto en el golfo como la costa occidental de la península, durante los siglos XIX y XX, no parece haber afectado de manera importante a la población.

Aunque no existe una prueba específica para establecer si una población experimentó un cuello de botella, a partir de un análisis del mtDNA es posible detectarlo indirectamente por medio de la variabilidad. Es decir, el nivel de variabilidad en el mtDNA durante un cuello de botella se reduce drásticamente porque el genoma mitocondrial es muy sensible a los cambios en el tamaño poblacional. Lo anterior se debe a que el número efectivo de genes en el mtDNA es una cuarta parte del nuclear (Brown *et al.*, 1979). Por esto, el tiempo de fijación de un haplotipo (mtDNA) es menor que para los genes nucleares y la pérdida de variabilidad para este genoma es mayor durante un cuello de botella (Harrison, 1989). Por lo tanto, se esperaría una reducción importante en el nivel de variabilidad de la población si ésta hubiera sido reducida drásticamente o durante un período prolongado, como ocurrió con la foca elefante del norte, la

cual se cazó hace aproximadamente el mismo tiempo que el lobo marino de California.

Otra explicación sobre la aparente ausencia de un efecto de cuello de botella, puede estar relacionada con las características del mismo marcador. Es decir, debido a que el mtDNA se hereda por vía materna, este resultado sólo se refiere a la explotación que se haya realizado sobre las hembras. Por lo tanto, si la explotación fue dirigida principalmente a los machos, es probable que el efecto de la misma no se manifieste por medio de un análisis con mtDNA. Aunque los registros sobre la explotación del lobo marino de California no son tan específicos como para confirmar esta hipótesis, tampoco se puede descartar. Algunos documentos mencionan una extracción dirigida hacia los machos (Bonnot, 1928; citado por Cass, 1985; Lluch-Belda, 1969; Cooper, 1985) y en otros se menciona que buscaban a los organismos más grandes (Scammon, 1874; Cooper, 1985), que para esta especie son generalmente los machos. La hipótesis anterior se puede apoyar en los resultados obtenidos por Hoelzel *et al.* (1993), con la foca elefante del sur (*Mirounga leonina*), por medio de secuencias de mtDNA. Estos autores reportaron que la población de foca elefante de la isla británica South Georgia, cerca de Argentina, no parece haber sufrido un cuello de botella, debido a que la población no fue intensamente explotada, en particular las hembras (McCann, 1985; citado por Lyrholm *et al.*, 1996). Por lo tanto, es importante realizar estudios con un marcador nuclear antes de asegurar que la explotación no causó un efecto de cuello de botella en la población.

Por otro lado, los resultados a partir del estadístico D de Tajima muestran que la población del lobo marino de California, en todas las loberas estudiadas, se encuentra en equilibrio. Es decir, no existen evidencias de presión de selección en la interpretación de los resultados (Tajima, 1993).

ESTRUCTURA POBLACIONAL

El valor máximo para los índices F_{st} y Φ_{st} es uno y el mínimo es cero. Aunque ambos índices se usan para determinar la estructura de una población, pueden existir diferencias en el valor de los dos estimadores, debido a la forma en que se emplean los datos para calcular cada índice, de tal manera que es factible mejorar la interpretación de los resultados.

Debido a que Φ_{st} se calcula con información nucleotídica de los haplotipos y sus frecuencias (Excoffier *et al.*, 1992), este índice detecta la estructura más fácilmente cuando ha existido suficiente tiempo para que las poblaciones diverjan y se manifiesten las diferencias (Escorza-Treviño y Dizon, 2000). De la misma forma, F_{st} sólo considera la frecuencia de los haplotipos (Wright, 1965; Weir y Cockerham, 1984), por lo que detecta diferencias más fácilmente, cuando no ha existido suficiente tiempo para que los haplotipos diverjan y cuando la distancia interhaplotípica es pequeña (Escorza-Treviño y Dizon, 2000).

Por lo tanto, una posible explicación sobre las diferencias entre los resultados significativos de los índices F_{st} y Φ_{st} en las comparaciones pareadas entre islas (ver Cuadro IIIa del Anexo III), puede ser que la estructura o diferenciación es reciente. En este caso se encuentran Los Islotes vs. Coronados y Asunción; Lobos vs. Coronados; San Jorge vs. Asunción, Esteban y Granito, marcados en gris (Cuadro IIIa), donde la diferencia es significativa con F_{st} , pero no con Φ_{st} . De la misma forma, Baker y Medrano-González (2002) mencionan que el índice F_{st} puede ser más sensible para detectar estructura cuando se trata de haplotipos cercanamente relacionados o entre algunos haplotipos divergentes introducidos por migración, particularmente cuando el número de haplotipos exclusivos es pequeño. Por lo tanto, es probable que la falta de resolución con

el índice Φ_{st} para detectar la estructura se deba al flujo génico entre las localidades antes mencionadas durante diferentes eventos históricos.

El nivel de estructura entre los cuatro grupos ($F_{st} = 0.1095$, $\Phi_{st} = 0.1387$) se puede considerar relativamente alto; es dos o tres veces mayor que el reportado para el lobo marino de Steller ($F_{st} = 0.05$, Bickham *et al.*, 1996).

Los índices de fijación F_{ct} resultaron significativos, y los índices F_{sc} fueron no significativos en el AMOVA jerárquico con ambos estimadores (F_{st} y Φ_{st} , Cuadros 9 y 10 respectivamente). La F_{ct} significativa indica que los haplotipos dentro de cada región, sin subdividir en islas, son más parecidos entre ellos, que comparados con los de cualquier otra región (Escorza-Treviño y Dizon, 2000). Otra interpretación a la F_{ct} significativa es que los grupos son reales, pero la subdivisión dentro de ellos (las islas), no (Excoffier *et al.*, 1992). En el mismo sentido, la F_{sc} no significativa indica que, al comparar los haplotipos de cada isla con los de otras islas dentro del mismo grupo, éstos no son más parecidos entre ellos mismos (Escorza-Treviño y Dizon, 2000). Según Excoffier y colaboradores (1992), el resultado no significativo de la F_{sc} apoya la existencia real de los grupos, mientras que los haplotipos dentro de cada isla no constituyen un grupo "real" si éstos se comparan con otras islas. Por lo tanto, la formación de grupos disminuye la variación de 89.02% y 85.59% (porcentaje de variación dentro de las islas, para los índices F_{st} y Φ_{st} , respectivamente) a 0.05% y 0.94% (porcentaje de variación entre islas dentro de grupos, para los índices F_{st} y Φ_{st} , respectivamente).

En general, la estructura que se encontró en este estudio, concuerda con lo publicado por Maldonado *et al.* (1995). Ellos concluyeron que los organismos del Pacífico (San Miguel y San Nicolás, California y Punta Banda, Baja

California), son filogenéticamente distintos y que existe una gran divergencia entre éstos y los lobos de Bahía de los Ángeles, en el Golfo de California.

Existen trabajos con otras especies donde se han encontrado poblaciones estructuradas dentro del Golfo de California. Aunque el límite depende de las diferencias ecológicas y la dinámica de las especies en cuestión, la mayoría de los ejemplos encuentran un límite en la región de las grandes islas (Ángel de la Guarda y Tiburón). Correa-Sandoval y Carvacho (1992) encontraron una división en la distribución de 271 especies de cangrejos braquiuros, con base en el análisis de cúmulos (cluster analysis) y el método de Peters. Ellos mencionan que las grandes islas actúan como barrera de sur a norte, con una retención de 69%, dejando pasar sólo 75 de las 263 especies que forman la taxocenosis meridional. En el sentido opuesto, el efecto de la barrera es mínimo, sin llegar al 10%. Lo anterior se atribuye a la existencia de una barrera biogeográfica producida por las constantes surgencias en la zona de las grandes islas (Correa-Sandoval y Carvacho, 1992). También se ha reportado la existencia de estructura en poblaciones de dos especies de camarón dentro del golfo, por medio de alozimas. Las muestras de ambas especies se recolectaron en el Golfo de Santa Clara (norte del golfo), Guaymas (centro del golfo) y Mazatlán (sur del golfo). En *Penaeus stylirostris* la estructura fue mayor ($F_{st} = 0.372$) que en *P. californiensis* ($F_{st} = 0.182$; De la Rosa-Vélez *et al.*, 2000).

De la misma forma, se reportó una fuerte estructura ($\Phi_{st} = 0.556$, $P < 0.001$; $F_{st} = 0.536$, $P < 0.001$) en poblaciones del pez de tres aletas *Axoclinus nigricaudus*, con base en un estudio de secuenciación de la región control del mtDNA (Riginos y Nachman, 2001). Los mismos autores mencionan que la población está dividida en tres zonas: norte del golfo (San Luis Gonzaga, Bahía de los Ángeles, Puerto Lobos y Puerto Libertad; estas dos últimas localidades

están en la costa este), este del golfo central (Bahía Kino y Caleta Venecia), y oeste del golfo central (Punta Chivato, La Paz, Bahía de los Muertos).

Un ejemplo más comparable con *Z. c. californianus*, debido a su gran capacidad de desplazamiento, es el referente a la ballena de aleta (*Balaenoptera physalus*) que a pesar de no presentar una población estructurada dentro del Golfo de California, es una población aislada de la población de la costa occidental de la Península de Baja California y California, EUA. Recientemente se reportó que las ballenas de aleta del Golfo de California constituyen una población aislada, con un evidente tamaño efectivo de la población pequeño (400 individuos, Urbán-Ramírez, 1996; citado por Bérubé *et al.*, 2002), con niveles bajos de variación nuclear y mitocondrial (Bérubé *et al.*, 2002).

Por otro lado, la presencia de estructura en una población de organismos que fácilmente pueden recorrer grandes distancias, como lo es el lobo marino de California (~2,000 Km), en una región pequeña, como el Golfo de California, se puede explicar por medio del análisis de su biología.

El lobo marino de California presenta períodos de lactancia largos, donde la demanda energética de las hembras con cría impide que éstas se alejen demasiado de la lobera para alimentarse (< 2 días, García-Rodríguez, 1999). La lactancia tiene una duración de 6 a 12 meses (Odell, 1975), aunque en algunos casos puede prolongarse (Peterson y Bartholomew, 1967; Riedman, 1990; Francis y Heath, 1991). Las hembras dan a luz una cría por temporada y la amamantan durante 4 a 5 días antes de salir al mar a alimentarse (Heath, 1989). Después, alternan viajes de alimentación con períodos de amamantamiento en tierra (Antonelis *et al.*, 1990; Heath *et al.*, 1991). Además, los partos son anuales (Riedman, 1990), lo que hace poco probable que la hembra cambie de lobera, una vez que alcanza la edad reproductiva. Lo

anterior podría resultar en un comportamiento filopátrico por parte de las hembras. Sin embargo, esto podría ser cierto sólo para las hembras en edad reproductiva y, por lo tanto, se podría tener un flujo génico por medio de las hembras jóvenes, que homogeneice el tipo y frecuencia de los haplotipos, si éstas migraran desde sus lugares de nacimiento y se reprodujeran en otras loberas.

Con base en censos realizados en diferentes épocas del año, se sabe que la abundancia y composición por edad y sexo puede variar en una misma lobera (Fry, 1939; Bartholomew y Hubbs, 1952; Cowan y Guiguet, 1956; Bartholomew y Boolootian, 1960; Orr y Poulter, 1965; Hancock, 1970; Bigg, 1973; Aurióles-Gamboa, 1982 y 1988; Aurióles-Gamboa *et al.*, 1983; Zavala-González, 1990 y 1993; Aurióles-Gamboa y Zavala-González, 1994; García-Rodríguez, 1999).

Sin embargo, es probable que el movimiento de organismos entre loberas con efectos en el intercambio genético (reproducción), sea muy bajo. Recientemente, se han reportado altos niveles de filopatía para hembras y machos, en Los Islotes, B.C.S. (Hernández-Camacho, 2001). Lo anterior se concluyó con base en un estudio donde se marcaron cinco generaciones de crías, y se registraron sus movimientos durante 14 años, por medio de censos. De 190 crías marcadas, sólo tres individuos se observaron en otras loberas reproductivas; dos de ellos (hembra y macho) regresaron a Los Islotes para reproducirse cuando alcanzaron la edad reproductiva y se les volvió a observar en años subsecuentes. El tercer individuo era una hembra que se encontró como adulto, amamantando a una cría, en la Isla San Esteban (Hernández-Camacho, 2001). El único registro previo de flujo génico es un caso reportado por Aurióles-Gamboa (1988) de una hembra marcada en Los Islotes cuando cría, y registrada como adulto amamantando a una cría en Isla Margarita. Lo anterior apoya el hecho de que el movimiento de animales entre las loberas no

siempre estará relacionado con la actividad reproductiva. De ser así, resultaría en la ausencia o disminución de la estructura de la población.

García-Rodríguez (1999) encontró diferencias en la composición del alimento de siete loberas reproductivas del Golfo de California, lo que sugiere que los individuos de cada lobera acuden a sitios distintos para alimentarse. El movimiento de los lobos entre sitios parece estar asociado a la búsqueda de alimento (García-Rodríguez, 1999) y, por lo tanto, estos lugares no deberían encontrarse muy alejados de su lugar de nacimiento. García-Rodríguez y Auriol-Gamboa (1997; citado por García-Rodríguez, 1999) estimaron un área de alimentación de los lobos en Los Islotes de aproximadamente 81 Km de radio. Sin embargo, García-Rodríguez (1999) menciona que en el centro y norte del Golfo de California estos radios de dispersión asociados a actividades alimentarias podrían ser menores (< 20 Km) debido a la cercanía de las islas, la diferencia en la composición de la dieta y la alta concentración de nutrientes en las zonas cercanas a los sitios de reproducción (Santamaría-Del Ángel *et al.*, 1995; citados por García-Rodríguez, 1999; Álvarez-Borrego, 1983, Álvarez-Borrego y Lara-Lara, 1991). Lo anterior sugiere que es poco probable que los animales jóvenes (hembras y machos) se reproduzcan en una lobera diferente a la de su nacimiento, y cuando ocurre, es probable que la nueva lobera no se encuentre muy alejada de la de origen. Esto es especialmente cierto dentro del Golfo de California (norte y centro), donde se encontró una subdivisión de la población en loberas con una cercanía geográfica mayor que entre algunas loberas de la costa occidental de la península. Por lo tanto, este comportamiento podría explicar la filopatría de las hembras y la estructura de la población que se reporta en este estudio.

Con base en la explicación anterior, parece poco probable que las loberas de la costa occidental de la península no estén estructuradas. Es decir, que desde

Coronados hasta Margarita no se hayan detectado diferencias, cuando la distancia entre estas loberas, en algunos casos, es mayor que las del Golfo de California. En este aspecto, es poco probable que las hembras del Pacífico presenten un comportamiento tan diferente a las del golfo, donde la filopatria no exista. La falta de alimento podría ser uno de los factores que las obligara a moverse. Sin embargo, las zonas donde se encuentran las loberas del Pacífico son tan productivas como algunas del golfo (Lynn y Simpson, 1987; Millán-Núñez y Lara-Lara, 1995). Además, las evidencias demuestran que en Isla San Miguel en California, que es comparable a la productividad en el Pacífico mexicano (Lynn y Simpson, 1987), el radio de alimentación de los lobos es de aproximadamente 44 Km (Bonell y Ford, 1987 y Feldkamp *et al.*, 1989; citados por García-Rodríguez, 1999), lo que indica que los animales tampoco tendrían que recorrer mucha distancia para encontrar alimento.

De acuerdo a lo anterior, hay por lo menos dos explicaciones probables acerca de la ausencia de subdivisión en la región del Pacífico. Por un lado, siempre existe la posibilidad de que haya una subdivisión en la población y que simplemente no se haya podido detectar por la falta de una muestra de tamaño adecuado, en relación a la abundancia poblacional. Es decir, la potencia del estimador para detectar estructura se puede incrementar al aumentar el tamaño de muestra, pero la potencia también depende de otros factores como la abundancia de la población y la tasa de dispersión (Taylor *et al.*, 1997). Estos autores demostraron que para un mismo tamaño de muestra, cuando la cantidad de hembras en edad reproductiva es pequeña, la potencia de los estimadores F_{st} y Φ_{st} se incrementa aún cuando la tasa de dispersión sea alta (Taylor *et al.*, 1997). Por lo tanto, si se compara la abundancia del lobo marino del California dentro del golfo (31,393 animales; Auriolles-Gamboa y Zavala-González, 1994) y el tamaño de muestra ($n = 91$), con respecto a las loberas de la costa occidental de la península con una abundancia aproximada de 71,000

lobos (Lowry y Maravilla-Chávez, 2002) y 79 muestras, se puede suponer que la potencia de los estimadores es menor para detectar estructura en la población del Pacífico que en la del Golfo de California.

Otra explicación probable sobre la no estructura de las loberas del Pacífico es que el establecimiento de éstas como las conocemos ahora, sea un evento más reciente que el establecimiento de las loberas del golfo, y el tiempo no ha sido suficiente para que existan diferencias entre los linajes maternos.

La segunda hipótesis, planteada en el párrafo anterior, se fundamenta en eventos climáticos históricos.

Existen evidencias de que el fenómeno climático ENSO (El Niño-Southern Oscillation), es capaz de provocar efectos negativos en diferentes especies de pinnípedos, entre ellos *Z. c. californianus*. Algunos de los efectos documentados son: bajos niveles de fertilidad en hembras (Arias-Schreiber y Halliday, 1999; Soto y Arias-Schreiber, 1999), aumento en la mortalidad de adultos (Arias-Schreiber y Halliday, 1999; Zagzebski *et al.*, 1999), incremento en la duración de los viajes de alimentación (Crocker *et al.*, 1999; Milette *et al.*, 1999; Soto y Arias-Schreiber, 1999), disminución del crecimiento de las crías y aumento de la mortalidad de las mismas (Arias-Schreiber y Halliday, 1999; Boness *et al.*, 1991; DeLong *et al.*, 1991; Iverson *et al.*, 1991; Morris *et al.*, 1999; Soto y Arias-Schreiber, 1999; Zagzebski *et al.*, 1999).

Sin embargo, este fenómeno también puede causar un movimiento de los animales hacia zonas más alejadas del Ecuador (hacia el norte en el hemisferio norte o hacia el sur en el hemisferio sur), por el movimiento de sus presas habituales. Ejemplo de lo anterior, son los trabajos de Allen *et al.* (1999) y Arias-Schreiber y Halliday (1999). Otros ejemplos específicos sobre el lobo marino de

California son los trabajos de Morris *et al.* (1999), y Huber (1991), que corresponden a efectos de El Niño 1997-98 y 1982-83, respectivamente. Los resultados de los primeros autores sugieren que, durante El Niño, las hembras de San Miguel, California, dieron a luz a sus crías en la Isla Año Nuevo, que se ubica a unos 400 Km al norte de la primera, en la Bahía de Monterey (Morris *et al.*, 1999). En el segundo trabajo, se realizaron censos semanales en diferentes puntos del centro de California (cerca de San Francisco) y se encontró un aumento de animales durante 1983. El incremento fue de 54% en Islas Farallón, 125% en Point Reyes, 240% en Bodega Rock, y además se observaron 116 lobos inmaduros en Double Point, una zona donde no se habían registrado animales (Huber, 1991). Este evento es raro ya que ocurrió también durante la época reproductiva, cuando normalmente esta zona es abandonada por los animales que intentarán reproducirse más al sur. Además, en los censos se encontraron animales que habían sido marcados en San Miguel y San Nicolás, en las Islas del Canal (unos 800 Km al sur). En estas islas, DeLong y colaboradores (1991) encontraron que durante la época reproductiva de 1983 y 1984 las hembras disminuyeron, mientras que aumentaron nuevamente en 1985 y 1986. Este cambio temporal en la distribución de los lobos entre las dos zonas (las Islas del Canal, la parte central de California), coincide con el fenómeno ENSO y parece ser resultado del movimiento hacia el norte de sus presas (Pearcy y Schoener, 1987; citados por Huber, 1991).

Por lo anterior, podemos hipotetizar que las lóberas de la costa occidental de la Península de Baja California, en algún momento de su historia, experimentaron un evento similar que redujo a la población y al mismo tiempo obligó a los animales a migrar hacia el norte, en busca de sus presas. Para apoyar lo anterior, se requeriría tener conocimiento de fenómenos ENSO antiguos y de larga duración, lo que obligaría a los lobos a permanecer por varias generaciones reproduciéndose en alguna zona, antes de regresar a recolonizar

las loberas que fueron abandonadas, y de esta forma evitar la estructura de la población actual.

Algunas evidencias señalan que el fenómeno ENSO se puede rastrear hasta 1,368 años atrás. Quinn (1990) sugirió que los efectos de El Niño en el Pacífico occidental se extiende hasta Etiopía, donde se puede relacionar con los registros de sequía debido a los niveles del Río Nilo. Con base en el registro de estos niveles, se hizo una reconstrucción sobre los eventos de El Niño desde el año 622.

Recientemente, la atención se ha centrado en un fenómeno parecido a El Niño, pero con un efecto más prolongado, la Oscilación Decadal del Pacífico, (PDO, Pacific Decadal Oscillation). Este fenómeno está relacionado con la ubicación del centro de baja presión de las Aleutianas, donde los registros sugieren un cambio de señal en un intervalo mayor a los 5 años. Por ejemplo, los cambios se han presentado en 1925, 1931, 1939, 1947, 1959, 1968, 1977 y 1989 (Overland *et al.*, 1998). La localización del centro de baja presión de las Aleutianas es el principal indicador del sistema climático del Pacífico norte (Overland *et al.*, 1998). La fase positiva de PDO se manifiesta de manera similar que los efectos de ENSO (Mantua, 1998), y dichos efectos se propagan hacia el sur, hasta zonas subtropicales, pero aparentemente no alcanzan el Ecuador (Miller y Schneider, 1998). Sin embargo, parece que existe una zona de transición a la altura de Vancouver, Canadá, donde los efectos negativos son opuestos. Es decir, cuando en la parte norte las condiciones son favorables, en el sur son desfavorables y viceversa. Lo anterior se ha registrado en relación a la abundancia del salmón (Mantua, 1998). En otro estudio realizado en el norte del Pacífico, se encontró otra posible zona de transición entre el este y oeste de las Islas Aleutianas. Springer (1998) reportó decrementos de camarón, aves y pinnípedos (foca común, lobo marino de

Steller, lobo fino del norte), entre 1980 y 1990, en diferentes zonas de las Islas Aleutianas y el Mar de Bering. Sin embargo, en el caso del lobo marino de Steller se observó que durante la misma década que disminuyó la población en el oeste de las Aleutianas, la población aumentó en el este del Golfo de Alaska (Springer, 1998).

El estudio de los efectos del fenómeno PDO es relativamente reciente y por lo tanto, es difícil de analizar directamente con los movimientos de la población del lobo marino de California. Sin embargo, la existencia de fenómenos climáticos como ENSO, pero de mayor duración como PDO, puede apoyar la hipótesis de una reciente recolonización de las loberas en la costa occidental de la península de Baja California, debida a la migración y permanencia de los animales en una zona diferente a su distribución actual. Por lo tanto, es una posible explicación a la falta de estructura en las islas del Pacífico.

Por otro lado, debe existir una explicación para justificar la permanencia de los lobos dentro del Golfo de California, en el tiempo hipotético en que los del Pacífico migraron a otra zona. La posible explicación es que El Niño no tiene un efecto negativo dentro del Golfo de California. Aurióles-Gamboa y Le Boeuf (1991) compararon el efecto de El Niño 1982-83 en loberas de *Z. c. californianus* en la costa occidental de la Península de Baja California (Isla Margarita), y 4 loberas dentro del Golfo de California (San Jorge, San Pedro Nolasco, Topolobampo, Los Islotes). Estos autores encontraron una reducción del 50% en la producción de crías, una reducción de hembras parturientas durante la época reproductiva y una reducción de machos subadultos durante el invierno siguiente, en Isla Margarita. Mientras que en las loberas del golfo, no se encontraron diferencias en la producción y mortalidad de crías, el número de hembras reproductivas en el verano, ni en el número de machos subadultos en invierno, cuando se comparó con años anteriores y posteriores a 1983

(Auriolles-Gamboa y Le Boeuf, 1991). Además, desde el punto de vista oceanográfico, se ha reportado un incremento en la productividad del Golfo de California durante los años ENSO (Álvarez-Borrego y Lara-Lara, 1991; Bray y Robles-Pacheco, 1991). Por lo tanto, es probable que el mismo fenómeno climático haya provocado que los lobos del Pacífico migraran, mientras que los del Golfo de California permanecieran.

Por otro lado, debido al marcador que se usó (mitocondrial) en este estudio, los resultados de una población estructurada se deben exclusivamente a la ausencia o poco intercambio genético por parte de las hembras. Es necesario utilizar un marcador nuclear que permita comparar los resultados (mitocondrial vs. nuclear) y determinar si existe o no flujo génico por parte de los machos. Otra forma para determinar si existe migración diferencial por sexos, a partir de mtDNA, es utilizar muestras de organismos adultos (O'Corry-Crowe *et al.*, 1997; Escorza-Treviño y Dizon, 2000). A pesar de esto, la población se encuentra estructurada y por lo tanto, los grupos se deben considerar como unidades distintas, para cuestiones de manejo. Moritz (1994) define a las unidades de manejo (MU, por sus siglas en inglés) como a aquellas poblaciones con una divergencia significativa en las frecuencias alélicas, en loci nucleares o mitocondriales, sin importar la diferenciación filogenética de los alelos. También menciona que el reconocimiento de dichas MUs es fundamental para un manejo apropiado a corto plazo, donde las MUs son las unidades lógicas para monitorear a una población y realizar estudios demográficos (Moritz, 1994).

Se debe prestar especial atención a la población del Golfo de California, debido a la menor abundancia de organismos (31,393 lobos; Auriolles-Gamboa y Zavala-González, 1994) y una mayor estructura, con respecto al Pacífico (71,000 lobos; Lowry y Maravilla-Chávez, 2002). Es importante mencionar que los grupos Golfo Centro y Golfo Norte pueden ser especialmente vulnerables

debido a que se ha reportado mayor frecuencia de osteoartritis y leptospirosis en estas zonas. Auriolles-Gamboa y colaboradores encontraron mayor frecuencia de osteoartritis en cráneos de lobos, en las islas ubicadas en el centro y norte del golfo, con respecto al resto de la población del golfo y Pacífico. La deformación de la mandíbula, en algunos casos, fue tan marcada que podría tener efectos negativos en la alimentación (Auriolles-Gamboa *et al.*, 2002). Además, parece existir una clina con respecto a la presencia de *Leptospira interrogans*, donde la enfermedad es más frecuente en la parte norte del Golfo de California (Acevedo-Whitehouse *et al.*, 2001). La leptospirosis es una enfermedad común en el lobo marino de California que puede causar partos prematuros, aborto y problemas renales (Acevedo-Whitehouse *et al.*, 2001). Sin embargo, estos hechos no se deben considerar como evidencia de problemas genéticos en la población, debido a la gran variabilidad genética que presentan.

Por otro lado, el grupo Golfo Sur, representado únicamente por Los Islotes, también se puede considerar vulnerable, debido al aparente aislamiento y por ser la zona con menor variabilidad genética. Además, la cantidad de organismos es pequeña (291 individuos, Auriolles-Gamboa y Zavala-González, 1994) y se han reportado altos niveles de filopatria para ambos sexos (Hernández-Camacho, 2001). Otra evidencia que puede aumentar la vulnerabilidad de esta lobera es la presencia de una menor sincronía del estro entre las hembras, con respecto a localidades al norte del golfo como la lobera Los Cantiles, en la Isla Angel de la Guarda (García-Aguilar y Auriolles-Gamboa, en preparación). Es decir, esta tendencia puede aumentar el aislamiento de los lobos de Los Islotes debido a que puede limitar el intercambio de individuos con loberas cercanas y en un caso extremo entre los organismos de la misma lobera. Dicha subdivisión llevaría a un proceso de deriva génica.

ANÁLISIS FILOGENÉTICO

El árbol de Máxima Parsimonia es el que requiere el menor número de cambios evolutivos para explicar las diferencias observadas entre los haplotipos. Es un método cualitativo, porque depende del tipo de nucleótido (A, T, G, C), en una posición dada (Avice, 1994). Se considera como un análisis exploratorio, que permite obtener un criterio de optimización con el cual se puede comparar la topología de árboles que utilizan métodos de distancia (Hillis, 1998). Según Avice (1994), siempre se debe incluir una aproximación cualitativa, debido a que la topología de un árbol aporta información sobre la distribución del estado del carácter a lo largo de las ramas y por lo tanto, le proporciona una mayor capacidad de prueba y de explicación (Avice, 1983; Baverstock *et al.*, 1979; Patton y Avice 1983; citados por Avice, 1994). En este caso, la topología del árbol de Máxima Parsimonia (Figura 4), es congruente con los árboles UPGMA y NJ (Figuras 5 y 6, respectivamente).

El método de Máxima Parsimonia utiliza los sitios variables para construir el árbol consenso. Sin embargo, cuando la cantidad de sitios parsimoniosamente informativos es insuficiente, no es posible obtener un árbol consenso. Nei y Kumar (2000) mencionan que los sitios parsimoniosamente informativos son aquellos que por lo menos presentan dos tipos diferentes de nucleótidos y cada uno está representado al menos dos veces. En este estudio se encontraron 19 sitios variables (Cuadro 4), de los cuales sólo 12 son parsimoniosamente informativos. Por lo tanto, no fue posible obtener un árbol consenso a partir de 1,000 árboles parsimoniosos. Sin embargo, se logró obtener un árbol consenso a partir de 100 árboles parsimoniosos, pero los valores de remuestreo fueron muy bajos (>50%), por la misma razón.

En los métodos de distancia, como UPGMA y NJ, los sitios filogenéticamente informativos son todos los sitios variables (19 en este estudio), e incluso los sitios invariables pueden tener información filogenética (Nei y Kumar, 2000). Por lo tanto, se pudieron obtener los árboles consenso para ambos métodos, a partir de un remuestreo de 1,000 réplicas.

La escasa resolución filogeográfica y los valores bajos de remuestreo, también se pueden explicar por la poca cantidad de sitios filogenéticamente informativos. Nei y Kumar (2000) mencionan que cuando se construyen árboles a partir de secuencias de genes polimórficos de una especie, como en este trabajo, los valores de remuestreo son generalmente bajos, aún cuando las relaciones sean confiables.

Aunque no es un objetivo de este trabajo, es pertinente mencionar que la inclusión del haplotipo del lobo marino de Galápagos (*Z. c. wollebaeki*) entre los haplotipos del lobo marino de California (*Z. c. californianus*) apoya la falta de diferenciación a nivel de especie entre ambas subespecies.

Los métodos UPGMA y NJ son métodos cuantitativos; en éstos se calculan las distancias evolutivas para todos los pares de haplotipos, y la relación entre estos valores se utiliza para construir el árbol filogenético (Nei y Kumar, 2000). El método UPGMA supone una tasa de evolución igual a lo largo de todas las ramas del dendrograma, por esto, cualquier heterogeneidad real no se puede detectar (Avice, 1994). Sin embargo, UPGMA es una buena aproximación fenética, debido a que tiende a reducir los efectos del error estocástico de la estimación de la distancia genética, al promediar la distancia (Nei, 1987). Contrario al método anterior, NJ permite tasas desiguales de cambios moleculares entre las ramas (Avice, 1994). Por lo tanto, por medio del método

NJ se puede obtener una mejor resolución del orden de aparición de los haplotipos.

En el análisis con el método NJ (Figura 6) los haplotipos distribuidos en el Golfo Centro (H29, H30, H32, H33) y Golfo Norte (H31, H33) se pueden considerar como haplotipos ancestrales, debido a que están unidos con los grupos externos. Los nodos internos de las tres grandes ramas centrales presentan poca resolución, lo que hace difícil la interpretación de la evolución de los haplotipos. Esta falta de resolución en los nodos internos se puede interpretar como una radiación rápida de haplotipos (Wynen *et al.*, 2001). Sin embargo, en este caso la falta de resolución puede deberse al flujo génico durante diferentes eventos históricos entre los grupos.

FILOGEOGRAFÍA

La red de la mínima separación (MSN, Minimum Spanning Network), se construye bajo el principio de un árbol parsimonioso de Wagner, pero ésta utiliza los haplotipos como nodos y puntas de las ramas, en lugar de únicamente como puntas de las ramas (Excoffier y Smouse, 1994). El árbol parsimonioso de Wagner y la MSN son formas alternativas de presentar los mismos datos, pero la red explica mejor la conexión entre los haplotipos (Excoffier *et al.*, 1992). Además, se puede obtener información sobre la estructura poblacional y hacer inferencias sobre la filogeografía (Donnelly y Tavaré, 1986; Takahata, 1988; Excoffier y Langaney, 1989; Excoffier *et al.*, 1992; Crandall y Templeton, 1993; Excoffier y Smouse, 1994; Wenink *et al.*, 1996; Encalada *et al.*, 1996; Redenbach y Taylor, 1999; Escorza-Treviño y Dizon, 2000). Por lo tanto, se considera una mejor aproximación para estudios a nivel intraespecífico (Excoffier y Smouse, 1994).

Es importante mencionar que gran cantidad de la información que se obtuvo de la población del lobo marino de California a partir del estudio de su estructura y diversidad genética, se puede interpretar a partir del MSN. Por lo tanto, se puede considerar como una muy buena aproximación exploratoria previa a un análisis poblacional a largo plazo.

El hecho de que la mayoría de las conexiones entre los haplotipos está dada por una sola mutación (Figuras 7 y 8) hace suponer que no hay haplotipos perdidos. Más de una mutación entre haplotipos puede indicar pérdida de los haplotipos por deriva génica, seguida de una expansión, o bien, un tamaño de muestra insuficiente donde no están representados todos los haplotipos existentes. Sin embargo, la porción de la red que conecta haplotipos mediante dobles o triples mutaciones, representa haplotipos que sólo se encuentran en el Golfo Centro y Golfo Norte (Figura 8). Si consideramos la cantidad de lobos en esa zona (no mayor de 20,000 animales; Auriolos-Gamboa y Zavala-González, 1994) y el tamaño de muestra para la misma ($n=75$); comparados con la cantidad de lobos en el Pacífico (71,000; Lowry y Maravilla-Chávez, 2002) y un tamaño de muestra casi igual ($n=79$), es poco probable que dicho problema haya sido influido por el tamaño de muestra. Es decir, se esperaría que la cantidad de haplotipos faltantes fuera mayor en el Pacífico, si se tratara de un problema de tamaño de muestra insuficiente. Sin embargo, no se puede descartar la idea de que la diversidad haplotípica sea mayor y, por lo tanto, el tamaño de muestra realmente sea insuficiente. Otra probable explicación al hecho es que la población del Alto Golfo (Golfo Centro y Golfo Norte), se haya reducido drásticamente en algún momento de su historia. Lo anterior concuerda con la observación descrita por Rosel y colaboradores (1999), sobre el arreglo lineal de los haplotipos, como se observa en la parte media del gráfico, desde el haplotipo H23 hasta H32 (Figura 7), que corresponden al Alto Golfo. Ellos mencionan que este tipo de arreglo se puede interpretar como una fuerte deriva

génica en una población demográficamente pequeña, en algún momento de su historia (Rosel *et al.*, 1999).

Por otro lado, la cantidad de mutaciones entre un haplotipo y otro puede ser una medida indirecta del tiempo de divergencia entre haplotipos (ver Figura 7 y la cantidad de mutaciones entre *Z. c. californianus* y los grupos externos). De acuerdo al registro fósil, el grupo de los lobos marinos (Subfamilia Otariinae, a la que pertenece *Zalophus*, *Eumetopias*, *Neophoca*, *Phocarctos* y *Otaria*), divergieron hace aproximadamente 3 millones de años (Ma; Kim *et al.*, 1975; Repenning, 1976; Repenning *et al.*, 1979; Miyazaki *et al.*, 1994). Sin embargo, existe una relación más cercana entre *Zalophus-Eumetopias* (Wynen *et al.*, 2001) y *Neophoca-Phocarctos* (Morejohn, 1975; Barnes *et al.*, 1985; Bininda-Emonds *et al.*, 1999; citados por Wynen *et al.*, 2001). Por lo tanto, la separación entre *Z. c. californianus* y *Z. c. wollebaeki*, debió haber ocurrido recientemente, o, de hecho, estar ocurriendo.

Desde el punto de vista de la interpretación filogeográfica, se puede considerar que los haplotipos con frecuencias altas pueden ser los más antiguos en la población, porque han tenido suficiente tiempo para acumular más copias (Donnelly y Tavaré, 1986; Excoffier y Langaney, 1989; Crandall y Templeton, 1993; Excoffier y Smouse, 1994). La mayoría de los nuevos haplotipos derivan de los haplotipos con altas frecuencias, por lo que se espera que los haplotipos antiguos presenten mayor cantidad de uniones (Donnelly y Tavaré, 1986; Crandall y Templeton, 1993; Excoffier y Smouse, 1994). Por lo tanto, se esperaría que los haplotipos más frecuentes y con mayor número de reticulaciones fueran los ancestrales y los menos frecuentes y menos reticulados serían los haplotipos derivados.

Los haplotipos con mayores frecuencias son H1, H6, H27, H12 y H17; pero sólo H1, H6 y H27 presentan la segunda característica, que es la de mayor cantidad de reticulaciones (Figuras 7 y 8). Otra característica de los haplotipos antiguos es que están presentes en la mayoría de las zonas, cuando la población se encuentra subdividida (Takahata, 1988; Excoffier y Langaney, 1989); en este caso, la característica la cumplen H1 y H6, mientras que H27 está ausente en el Alto Golfo (Figura 9). Los grupos externos también pueden ayudar en la búsqueda de los haplotipos antiguos. En este caso, los grupos externos no están asociados a ninguno de los haplotipos antes identificados (H1, H6 ó H27). Sin embargo, los tres grupos externos se encuentran en la parte izquierda del gráfico, más cerca del haplotipo H27, si se consideran como dos clados diferentes la parte izquierda y derecha del MSN. Por lo tanto, se pueden considerar como ancestrales los tres haplotipos antes mencionados (H1, H6 y H27), pero éste último podría ser el más antiguo, por encontrarse en el clado al que están asociados los grupos externos.

La existencia de dos clados dentro del MSN se apoya en la idea de Rosel *et al.* (1999), quienes mencionan que se puede distinguir entre uno o múltiples eventos de colonización, si en una zona de la población subdividida se encuentran haplotipos relacionados y polarizados en la MSN. Esto se puede observar claramente en la Figura 9, donde parece que existieron al menos dos incursiones diferentes de organismos desde el Pacífico hacia el Golfo.

Además, desde el punto de vista de la estructura poblacional, se pueden observar dos clados diferentes en la Figura 8. La parte izquierda del MSN se puede interpretar como una estructura más fuerte, debido a que los haplotipos de cada sitio ocupan zonas diferentes. En forma contraria, la separación de los colores en la parte derecha del gráfico, no es muy clara. Lo anterior se puede interpretar como un mayor tiempo de permanencia de esos haplotipos en cada

zona, que permitió la formación de una estructura más fuerte en el lado izquierdo, lo cual concuerda con la idea de que puede ser el clado más antiguo.

El hallazgo de que los tres grupos externos se encontraron asociados a haplotipos que pertenecen al Golfo Centro y Golfo Norte exclusivamente (Figura 8), concuerda con algunas características dentarias del género *Zalophus*. Recientemente, Aurióles-Gamboa y colaboradores (en preparación), estudiaron algunas características consideradas como primitivas (presencia de doble o triple raíz en los poscaninos y/o presencia del sexto poscanino en la mandíbula y el maxilar), para explorar la posible existencia de poblaciones derivadas vs. primitivas. Aunque la separación de las zonas que ellos usaron no corresponden completamente con la estructura que se presenta en este trabajo, los resultados (datos sólo para hembras) indican que Galápagos presenta las frecuencias más altas de características dentarias primitivas, seguidas por el Golfo y después el Pacífico.

En un intento por explicar la filogeografía histórica de la población del lobo marino de California, con base en la distribución de los haplotipos por zonas (Figura 9), se propone lo siguiente:

De acuerdo al registro fósil, se considera que los pinnípedos se originaron en el norte del Pacífico Oriental (Oregon), durante el Oligoceno Tardío (27 a 25 Ma; Mitchell y Tedford, 1973; Berta, 1991; citada por Berta y Sumich, 1999). El primer otárido reconocible pertenece al Mioceno medio (11-12 Ma) y se encontró en el norte del Pacífico (Berta y Deméré, 1986; citados por Berta y Sumich, 1999; Repenning, 1976; Barnes *et al.*, 1985). El grupo de los lobos marinos divergieron como un linaje distinto hace aproximadamente 3 Ma (Kim *et al.*, 1975; Repenning, 1976; Repenning *et al.*, 1979; Miyazaki *et al.*, 1994). La dispersión de los otáridos hacia el hemisferio sur ocurrió durante diferentes

eventos, hace aproximadamente 5 Ma (Repenning *et al.*, 1979) a través del Corredor del Pacífico Este. Dicho Corredor fue una corriente de aguas frías que conectó los sistemas de la Corriente de California y de Perú, formado por la migración de las isotermas hacia el Ecuador durante el Plioceno, cuando se había cerrado el Corredor Centro-Americano o Panameño (Davies, 1958; Repenning *et al.*, 1979). El Corredor del Pacífico Este probablemente persistió hasta el Pleistoceno Tardío, con avances y retrocesos durante las eras glaciares e interglaciares. Dichos períodos de expansión permitieron la dispersión de especies hacia el Ecuador y subsecuentemente se aislaron por aguas cálidas, lo que resultó en una evolución vicariante (Davies, 1958; Repenning *et al.*, 1979).

De acuerdo a lo anterior, la explicación más acertada sobre el origen del lobo marino de Galápagos, es la propuesta por Auriolles-Gamboa y colaboradores (en preparación). Ellos mencionan que el lobo marino de Galápagos se originó a partir de la población del lobo marino de California y que pudo haber ocurrido durante uno o varios períodos glaciares. Es probable que durante estos eventos, el lobo marino de California haya llegado hasta Galápagos, lo que dio origen a una nueva subespecie (*Zalophus californianus wollebaeki*; Scheffer, 1958). Sin embargo, también es probable que una vez que el período glacial terminó, el lobo marino de California regresó a su distribución anterior, pero una parte de la población permaneció en Galápagos.

Los animales provenientes de Galápagos colonizaron el Golfo de California y la costa occidental de la Península de Baja California. La población del golfo permaneció ahí hasta ahora y es por ello que es la zona con la que actualmente existe mayor relación con los lobos de Galápagos. Por su parte, la población de la costa occidental de la península experimentó un movimiento masivo de individuos, provocado por el aumento en la temperatura (ver discusión sobre la

estructura poblacional), lo que obligó a los animales a permanecer en otra zona por varias generaciones. Posteriormente, en el pasado reciente, regresaron a su distribución previa, pero la recolonización se hizo a partir de una población homogeneizada.

Una de las características de la MSN difícil de explicar al observar la distribución de los haplotipos por zonas (Figura 9), es la presencia de dos probables clados, uno con mayor estructura (izquierdo) que el otro (derecho). El clado derecho podría haber existido desde la colonización a partir de la población de Galápagos o puede tratarse de al menos un segundo evento de incursión hacia el golfo, por parte de la población del Pacífico. El establecer el tiempo de divergencia entre los haplotipos de ambos clados, podría ayudar a despejar esta incógnita. Sin embargo, la tendencia actual en los estudios filogenéticos es la de evitar este tipo de análisis, debido a que los resultados pueden ser más confusos. Lo anterior se debe a la falta de un registro fósil completo y por lo tanto, a la dificultad para establecer una tasa de mutación confiable para una especie determinada. Ovenden (1990) menciona que el grado de diferenciación en el mtDNA entre grupos aislados, se puede utilizar para estimar el tiempo desde que éstos eran una sola población. Sin embargo, estimar la divergencia de esta forma, requiere de una gran exactitud en la calibración de la tasa evolutiva del mtDNA (Ovenden, 1990). Por lo tanto, es necesario utilizar con reserva esta aproximación, debido a que en la mayoría de los taxa no existe una calibración en la tasa de cambio del mtDNA y las que se pueden encontrar en la literatura, varían en varios órdenes de magnitud (Nei, 1987).

Por último, el conocer la relación entre los haplotipos de Baja California y los de California, EUA, podría ayudar a explicar el origen del clado derecho. Si los haplotipos de California tuvieran una mayor relación con los haplotipos del clado

derecho, se podría pensar que dicho clado fue un segundo evento de incursión hacia el Golfo de California. Además, el aumentar la cantidad de muestra proveniente de Galápagos podría corroborar o refutar lo anterior. Si todos los haplotipos que se encuentren en Galápagos permanecen más cercanos al clado izquierdo, también se puede apoyar la idea de la existencia de una segunda incursión al golfo desde el Pacífico. Por lo tanto, es necesario considerar una mayor cantidad de muestras de las tres localidades (California, Baja California y Galápagos), para tener una visión más clara de la filogeografía de *Z. c. californianus*.

CONCLUSIONES

- 1.- En general, la estructura que se encontró en este estudio, concuerda con el resultado del trabajo previo y preliminar de Maldonado *et al.*, 1995, en el sentido que la población está subdividida. No obstante, gracias a la retícula muestral más cerrada aplicada en este estudio, se determinó que dicha población está subdividida en cuatro grupos bien definidos ($F_{st} = 0.1098$, $P < 0.05$; $\Phi_{st} = 0.1441$, $P < 0.05$):
 - a. Pacífico (islas Coronados, Benitos, Cedros, Asunción y Santa Margarita)
 - b. Golfo Sur (Los Islotes)
 - c. Golfo Centro (Isla San Esteban, lobera Los Cantiles, en la Isla Angel de la Guarda, Isla Granito e Isla Lobos)
 - d. Golfo Norte (Isla San Jorge)

- 2.- Los cuatro grupos en los que se encuentra dividida la población del lobo marino de California en su distribución en México, se deben considerar como Unidades de Manejo independientes, en planes de conservación a corto plazo. La población del lobo marino de California que se encuentra en el Golfo de California es la más vulnerable, debido a la menor cantidad de individuos y una mayor subdivisión de la población, con respecto a la costa occidental de la Península de Baja California.

- 3.- Los resultados no son concluyentes sobre un posible efecto de un cuello de botella, por causa de la explotación.

- 4.- La separación de los haplotipos de *Z. c. californianus* (lobo marino de California) con respecto a *Eumetopia jubatus* (lobo marino de Steller) y *Neophoca cinerea* (lobo marino de Australia), es mayor que entre el primero y *Z. c. wolfebaeki*; lo que indica que la separación de esta dos subespecies es reciente o está ocurriendo.
- 5.- El lobo marino de Galápagos (*Zalophus c. wolfebaeki*), está más relacionado con los lobos marinos de California (*Zalophus c. californianus*) del Golfo de California (Golfo Centro y Golfo Norte), que con los que pertenecen al grupo Pacífico.
- 6.- Se apoya la hipótesis del origen del lobo marino de Galápagos propuesta por Aurióles-Gamboa y colaboradores (en preparación), quienes mencionan que éste se originó a partir de una población del lobo marino de California, durante varios períodos glaciares. Posteriormente, el lobo marino de California regresó a su distribución previa. A partir de lo anterior, se propone que la población del Golfo de California ha permanecido ahí desde la primera incursión de organismos, aunque han existido una o varias incursiones posteriores de organismos desde el Pacífico; mientras que los de la costa occidental de la Península de Baja California (grupo Pacífico) experimentaron un movimiento hacia otra zona, donde permanecieron por varias generaciones antes de regresar a su distribución previa.

PERSPECTIVAS

Para un mejor entendimiento de la estructura poblacional del lobo marino de California (*Z. c. californianus*) en su distribución en México, se propone continuar el estudio de secuencias de mtDNA a partir de una mayor cantidad de muestras por lobera, especialmente en la región de la costa occidental de la Península de Baja California. Lo anterior puede permitir corroborar la ausencia de estructura o rechazarla. Además, es importante realizar un estudio que incluya muestras de loberas localizadas en Estados Unidos, para conocer la posible relación entre las zonas. También es necesario aumentar el número de loberas que se encuentran en el Golfo de California, para delimitar mejor las subpoblaciones dentro del golfo.

Aunque la subdivisión de la población a partir del mtDNA es congruente con los resultados obtenidos a partir de diferentes aproximaciones no genéticas, es importante considerar un marcador nuclear que permita mejor la interpretación de la estructura de la población. Un marcador nuclear (microsatélites) también podría proporcionar más información acerca de un posible cuello de botella en la población.

En estudios posteriores se podrían incluir muestras de organismos adultos, que permitieran establecer si existe migración diferencial por sexos o utilizar un marcador nuclear para compararlo con los resultados del mitocondrial.

La filogeografía histórica de la subespecie se podría interpretar mejor al comparar haplotipos de California, Baja California, Galápagos y Japón (a partir de muestras de museos y/o colecciones particulares). También es necesario aumentar la cantidad de muestras provenientes del Golfo de California, que permitan establecer si la diferencia de más de una mutación entre algunos

haplotipos, se debe a la pérdida de los mismos en la población, o la falta de un tamaño de muestra suficiente en este trabajo.

LITERATURA CITADA

- Acevedo-Whitehouse, K.A., H. de la Cueva-Salcedo, M.D. Frances G. y D. Auriolles-Gamboa. 2001. Leptospirosis in California sea lion pups from the Gulf of California. *En: 14th Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals*. 28 de noviembre a 3 diciembre. Vancouver, British Columbia, Canada.
- Aguayo-Lobo, A. 1989. Los mamíferos marinos y las pesquerías. *En: Memorias del VI Simposio sobre Fauna Silvestre*. Fac. Med. Vet. UNAM. México, D.F., pp. 59-64.
- Álvarez-Borrego, S. 1983. Gulf of California. *En: B.H. Ketchum (ed.). Ecosystems of the World. Estuaries and enclosed seas*. Elsevier Scientific Publishing. New York, New York, USA., pp. 427-449.
- Álvarez-Borrego, S. y J.R. Lara-Lara. 1991. The physical environment and primary productivity of the Gulf of California. *En: J.P. Dauphin y B. Simoneit (eds.). The Gulf and Peninsular Province of the Californias. Amer. Assoc. of Petrol. Geol. Memoir 47*, pp. 555-567.
- Álvarez-Borrego, S. y R.A. Schwartzlose. 1979. Masas de agua del Golfo de California. *Ciencias Marinas*. 6: 43-63.
- Allen, S., W. Sydeman, J. Nusbaum y H. Nevins. 1999. ENSO effects on pinnipeds in the Gulf of the Farallones, California. *En: 13th Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals*. 28 de noviembre a 3 de diciembre. Wailea, Hawaii.
- Antonelis, G.A., B.S., Stewart, W.F. Perryman. 1990. Foraging characteristics of female northern fur seals (*Callorhinus ursinus*) and California sea lions (*Zalophus californianus*). *Canadian Journal of Zoology*. 68(1): 150-158.
- Antonelis, G.A. Jr. y C.H. Fiscus. 1980. The pinnipeds of the California current. *California Cooperative Fish Investigation (CalCOFI) Report*. 21: 68-78.
- Arias-Schreiber, M.E. y A.J. Halliday. 1999. Effects of the 1997/98 "El Niño" on the abundance and distribution of south American fur seals in Perú. *En: 13th Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals*. 28 de noviembre a 3 de diciembre. Wailea, Hawaii.

- Árnason, U. y E. Johnsson. 1992. The Complete Mitochondrial DNA Sequence of the Harbor Seal, *Phoca vitulina*. *Journal of Molecular Evolution*. **34**: 493-505.
- Aurioles-Gamboa G., D. 1982. Contribución al conocimiento de la conducta migratoria del lobo marino de California *Zalophus californianus*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur. La Paz, B.C.S. 74 pp.
- Aurioles-Gamboa, D. 1988. Behavioral Ecology of California Sea Lions in the Gulf of California. Ph. D. Thesis. University of California, Santa Cruz. 174 pp.
- Aurioles-Gamboa, D. y A. Zavala-González G. 1994. Algunos factores ecológicos que determinan la distribución y abundancia del lobo marino *Zalophus californianus*, en el Golfo de California. *Ciencias Marinas*. **20**(4): 535-553.
- Aurioles-Gamboa, D., F. Sinsel, C. Fox, E. Alvarado y O. Maravilla-Chávez. 1983. Winter migration of subadult male California sea lions *Zalophus californianus* in the Southern part of Baja California. *Journal of Mammalogy*. **64**(3): 513-518.
- Aurioles-Gamboa, D., S. Salazar-Pico, I. Contreras y L.G. Barnes. (En preparación). Differences in the frequency of tooth characters among California sea lion populations.
- Aurioles-Gamboa G., D. y B.J. Le Boeuf. 1991. Effects of the El Niño 1982-83 on California Sea Lions in México. *En*: Trillmich, F. y K.A. Ono (eds.). Pinnipeds and El Niño. Responses to Environmental Stress. Springer-Verlag. Ecological Studies, Vol. 88. Berlín, Alemania, pp. 112-118.
- Aurioles-Gamboa G., D., S. Luque, F. García R., D. Brousset, A. Parás, J. Montaña, R. Rosiles, S. Aguíñiga A. K. Acevedo-Whitehouse y F. Elorriaga V. 2002. Exploración de variables biológicas y ecológicas de las poblaciones de lobo marino (*Zalophus californianus*) del Golfo de California: Regionalización para el manejo. *En*: XXVII Reunión Internacional para el Estudio de los Mamíferos Marinos. Mayo. Veracruz, Ver. México.
- Avise, J.C. 1986. Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals. *Philosophic Transactions of the Royal Society of London B*. **312**: 325-342.

- Avise, J.C. 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman & Hall. New York, New York, USA. 511 pp.
- Avise, J.C. 2000. *Phylogeography. The history and formation of species*. Harvard University Press. London, England. 447 pp.
- Avise, J.C., J. Arnold, R.M. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, J.E. Neigel, C.A. Reeb y N.C. Saunders. 1987. Intraespecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*. **18**: 489-522.
- Barnes, L.G., D.P. Domning y C.E. Ray. 1985. Status of studies on fossil marine mammals. *Marine Mammal Science*. **1**(1): 15-53.
- Bartholomew, G.A. y C.L. Hubbs. 1952. Winter populations of pinnipeds about Guadalupe, San Benito, and Cedros Islands, Baja California. *Journal of Mammalogy*. **33**: 160-171.
- Bartholomew, G.A. y R.A. Booloosian. 1960. Numbers and population structure of the pinnipeds on the California Channel Islands. *Journal of Mammalogy*. **41**(3): 366-375.
- Berta, A. y J.L. Sumich. 1999. *Marine Mammals: Evolutionary Biology*. Academic Press. San Diego, California, USA. 494 pp.
- Bérubé, M., J. Urbán-Ramírez, A.E. Dizon, R.L. Brownell y P.J. Palsbøll. 2002. Genetic identification of a small and highly isolated population of fin whales (*Balaenoptera physalus*) in the Sea of Cortez, México. *Conservation Genetics*. **3**: 183-190.
- Bickham, J.W., J.C. Patton y T.R. Loughlin. 1996. High variability for control-region sequences in a marine mammal: implications for conservation and biogeography of Steller sea lion (*Eumetopias jubatus*). *Journal of Mammalogy*. **77**: 95-108.
- Bigg, M.A. 1973. Census of California sea lion on southern Vancouver Island, British Columbia. *Journal of Mammalogy*. **54**(1): 285-287.
- Boness, D.J., O.T. Oftedal y K.A. Ono. 1991. The Effect of El Niño on Pup Development in the California Sea Lion (*Zalophus californianus*) I. Early Postnatal Growth. *En*: Trillmich, F. y K.A. Ono (eds.). *Pinnipeds and El Niño. Responses to Environmental Stress*. Springer-Verlag. Ecological Studies, Vol. 88. Berlin, Alemania, pp. 171-179.

- Bonnot, P. 1931. The California sea lion census for 1946. *California Fish and Game*. **17**(2): 150-155.
- Bray, N.A. y J.M. Robles-Pacheco. 1991. Physical oceanography of the Gulf of California. *En*: J.P. Dauphin y B. Simoneit (eds.). The Gulf and Peninsular Province of the Californias. *American Association of Petrologists and Geologists Memoir* 47, pp. 511-554.
- Brown, W.M., M. George, Jr. y A.C. Wilson. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. **76**(4): 1967-1971.
- Brownell, R.L., R.L. DeLong and R.W. Schreiber. 1974. Pinniped populations at islas de Guadalupe, San Benito, Cedros and Natividad, Baja California in 1968. *Journal of Mammalogy*. **55**(2): 469-472.
- Brunner, S. 2000. Cranial morphometrics of fur seals and sea lions (Family: Otariidae). Systematics, geographic variation and growth. Ph. D. thesis. Department of Veterinary Anatomy & Pathology. University of Sydney, Australia. 336 pp.
- Cass, V.L. 1985. Exploitation of California sea lions, *Zalophus californianus*, prior to 1972. *Marine Fisheries Review*. **47**(1): 36-38.
- Cooper B., B. 1985. The War Against The Seals. A history of the North American Seal Fishery. McGill-Queen's University Press. Québec, Canada. 374 pp.
- Correa-Sandoval, F. y A. Carvacho B. 1992. Efecto de la "barrera de las islas" en la distribución de los braquiuros (Crustacea: Decapoda) en el Golfo de California. *Proceedings of the San Diego Society of Natural History*. **26**: 1-4.
- Cowan, I. McT. y C.J. Guiguet. 1956. The mammals of British Columbia. Handbook 11, British Columbia Provincial Museum. British Columbia, Canada.
- Crandall, K.A. y A.R. Templeton. 1993. Empirical tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction. *Genetics*. **134**: 959-969.

- Crocker, D., D. Costa, B. Le Boeuf, P. Webb y D. Houser. 1999. Impact of the 1997-98 El Niño on the foraging behavior of northern elephant seals. *En: 13th Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals*. 28 de noviembre a 3 de diciembre. Wailea, Hawaii.
- Davies, J.L. 1958. The Pinnipedia: an essay in zoogeography. *Geographical Review*. **48**: 474-493.
- De Anda-Delgado, M.H. 1985. Hábitos alimenticios del lobo marino *Zalophus californianus* en las Islas Los Coronados, Baja California, México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada, B.C. 63 pp.
- De la Lanza-Espino, G. 1991. Oceanografía de mares mexicanos. AGT Editor, S.A. México, D.F. 569 pp.
- De la Rosa-Vélez, J., R. Escobar-Fernández, F. Correa-Sandoval, M. Maqueda-Cornejo y J. de la Torre-Cueto. 2000. Genetic structure of two commercial penaeids (*Panaeus californiensis* and *P. stylirostris*) from the Gulf of California, as revealed by allozyme variation. *Fishery Bulletin*. **98**: 674-683.
- Delgado-Estrella, A., J.G. Ortega-Ortíz y A. Sánchez-Ríos. 1994. Varamientos de mamíferos marinos durante la primavera y el otoño, y su relación con la actividad humana en el norte del Golfo de California. *Anales del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México, Zoología*. **65**(2):287-295.
- DeLong, R.L., G.A. Antonelis, C.W. Oliver, B.S. Stewart, M.C. Lowry y P.K. Yochem. 1991. Effects of the 1982-83 El Niño on Several Population Parameters and Diet of California Sea Lions on the California Channel Islands. *En: Trillmich, F. y K.A. Ono (eds.). Pinnipeds and El Niño. Responses to Environmental Stress*. Springer-Verlag. Ecological Studies, Vol. 88. Berlín, Alemania, pp. 166-172.
- Donnelly, P. y S. Tavaré. 1986. The ages of alleles and a coalescent. *Advances in Applied Probability*. **18**: 1-19.
- Dowling, T., C. Moritz y J. Palmer. 1990. Nucleic Acids II: Restriction Site Analysis. *En: D. Hillis y C. Moritz (eds.). Molecular Systematics* Sinauer Assoc., Inc. Sunderland, Massachusetts, USA, pp. 250-317.

- Escorza-Treviño, S. y A.E. Dizon. 2000. Phylogeography, intraspecific structure and sex-biased dispersal of Dall's porpoise, *Phocoenoides dalli*, revealed by mitochondrial and microsatellite DNA analyses. *Molecular Ecology*. **9**: 1049-1060.
- Encalada, S.E., P.N. Lahanas, K.A. Bjorndal, A.B. Bolten, M.M. Miyamoto y B.W. Bowen. 1996. Phylogeography and population structure of the Atlantic and Mediterranean green turtle *Chelonia mydas*: a mitochondrial DNA control region sequence assessment. *Molecular Ecology*. **5**: 473-483.
- Excoffier, L. y P. Smouse. 1994. Using allele frequencies and geographic subdivision to reconstruct gene genealogies within a species. *Molecular variance parsimony*. *Genetics*. **136**: 343-359.
- Excoffier, L. y A. Langaney. 1989. Origin and differentiation of human mitochondrial DNA. *American Journal of Human Genetics*. **44**: 73-85.
- Excoffier, L., P. Smouse y J. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*. **131**: 479-491.
- Fleischer A., L. y F. Cervantes-Fonseca. 1990. Abundancia de lobos marinos (*Zalophus californianus*) en la región de Guaymas, Sonora México y su impacto en la pesca ribereña. *En: Estudios sobre el lobo marino en el noroeste de México. Instituto Nacional de la Pesca*, pp. 41-59.
- Felsenstein, J. 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c. Distribuido por el autor. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, USA.
- Francis, J.M. y C.B. Heath. 1991. The effects of El Niño on the frequency and sex ratio of suckling yearlings in the California sea lion. *En: Trillmich, F. y K.A. Ono (eds.). Pinnipeds and El Niño. Responses to Environmental Stress. Springer-Verlag. Ecological Studies, Vol. 88. Berlín, Alemania*, pp. 193-201.
- Fry, Jr., D.H. 1939. A winter influx of sea lions from Lower California. *California Fish and Game Bulletin*. **25**: 245-250.
- Gallo-Reynoso R., J.P. 1986. Sobre los mamíferos marinos mexicanos. *Técnica Pesquera*. Año XIX, abril. 10-16.

- Gallo-Reynoso, J.P. y J.L. Solórzano-Velasco. 1991. Two new sightings of California sea lions on the Southern coast of México. *Marine Mammal Science*. **7**(1): 96.
- García-Aguilar, M.C. y D. Aurióles-Gamboa. 2001. Período reproductivo del lobo marino de California (*Zalophus c. californianus*) en el Golfo de California, México. En: XXVI Reunión Internacional para el Estudio de los Mamíferos Marinos. Mayo. Ensenada, Baja California, México.
- García-Aguilar, M.C. y D. Aurióles-Gamboa. (En preparación). Breeding season of the California sea lion (*Zalophus californianus*) in the Gulf of California, México.
- García-Rodríguez, F.J. 1999. Cambios espaciales y estacionales en la estructura trófica y consumo del lobo marino de California, *Zalophus californianus*, en la región de las grandes islas, Golfo de California. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. La Paz, Baja California Sur, México. 88 pp.
- Gill, T. 1866. Prodrôme of a monograph of the pinnipedes. *Proceedings of Essex Institute, Salem, Communications*. **5**:3-13.
- Guo, S. y E. Thomson. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*. **48**: 361-372.
- Greenberg, B.D., J.E. Newbold y A. Sugino. 1983. Intraspecific nucleotide sequence variability surrounding the origin of replication in human mitochondrial DNA. *Gene*. **21**: 33-49.
- Hanan, D.A., L.M. Jones y R.B. Read. 1989. California sea lion interaction and depredation rates with the commercial passenger fishing vessel fleet near San Diego. *Calcofi Reports*. **30**:122-126.
- Hancock, D. 1970. California sea lion as a regular visitant off the British Columbia Coast. *Journal of Mammalogy*. **51**(3): 614.
- Harcourt, R., D. Aurióles-Gamboa G. y J. Sánchez. 1994. Entanglement of California sea lions at Los Islotes, Baja California Sur, México. *Marine Mammal Science*. **10**(1):122-125.
- Harrison, R.G. 1989. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends in Ecology and Evolutionary Biology*. *Trends in Ecology and Evolution*. **4**: 6-11.

- Heath, C.B. 1989. The behavioral ecology of the California sea lion. Ph.D. dissertation. University of California, Santa Cruz, California, USA. 255 pp.
- Heath, C.B., K.A. Ono, D.J. Boness y J.M. Francis. 1991. The influence of El Niño on female attendance patterns in the California sea lion. *En: Trillmich, F. y K.A. Ono (eds.). Pinnipeds and El Niño. Responses to Environmental Stress. Springer-Verlag. Ecological Studies, Vol. 88. Berlín, Alemania, pp. 138-145.*
- Hernández-Camacho, C.J. 2001. Tabla de vida del lobo marino de California *Zalophus californianus californianus* en la lobera Los Islotes, B.C.S., México. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Ciencia Marinas. La Paz, Baja California Sur, México. 66 pp.
- Hillis, D.M. 1998. Phylogenetic analysis of frequency data in molecular ecological studies. *En: G.R. Carvalho (ed.). Advances in Molecular Ecology. IOS Press. NATO Science Series. Series A: Life Sciences. Vol. 306, pp. 25-38.*
- Hoelzel, A.R. 1997. Molecular ecology of pinnipeds. Págs. 147-157. *En: A.E. Dizon, S.J. Chivers y W.F. Perrin (eds.). Molecular Genetics of Marine Mammals. Special Publication 3. The Society for Marine Mammalogy. Allen Press, Inc. Lawrence, KS, USA.*
- Hoelzel, A.R., J. Halley, S.J. O'Brien, C. Campagna, T. Arnborn, B.J. Le Boeuf, K. Ralls y G.A. Dover. 1993. Elephant seal genetic variation and the use of simulation models to investigate historical population bottlenecks. *Journal of Heredity. 84: 443-449.*
- Huber, H.R. 1991. Changes in the distribution of California sea lions North of the breeding rookeries during the 1982-83 El Niño. *En: Trillmich, F. y K.A. Ono (eds.). Pinnipeds and El Niño. Responses to Environmental Stress. Springer-Verlag. Ecological Studies, Vol. 88. Berlín, Alemania, pp. 129-137.*
- Ito, T. 1985. New cranial materials of the Japanese sea lion *Zalophus californianus japonicus* (peters, 1866). *Journal of the Mammal Society of Japan. 10: 135-148.*

- Iverson, S.J., O.T. Oftedal y D.J. Boness. 1991. The Effect of El Niño on Pup Development in the California Sea Lion (*Zalophus californianus*) II. Milk intake. *En: Trillmich, F. y K.A. Ono (eds.). Pinnipeds and El Niño. Responses to Environmental Stress. Springer-Verlag. Ecological Studies, Vol. 88. Berlín, Alemania.*
- Jones, R.E. 1981. Food habits of smaller marine mammals from northern California. *Proceedings of the California Academy of Sciences. 42(16): 409-433.*
- Jukes, T.H. y C.R. Cantor. 1969. Evolution of protein molecules. Págs. 21-132. *En: H.N. Munro (ed.). Mammalian Protein Metabolism. Academic Press. New York, USA.*
- Keith, E.O., R.S. Condit y B.J. Le Boeuf. 1984. California sea lions breeding at Año Nuevo Island, California. *Journal of Mammalogy. 65(4): 695.*
- Kim, K.C., C.A. Repenning y G.V. Morejohn. 1975. Specific antiquity of the sucking lice and evolution of otariid seals. *Rapp. P.v. Reun. Con. Internat. Explor. Mer. 169: 544-549.*
- King, J.E. 1983. Seals of the World. British Museum (Nat. History). 2nd. edition. Cornell University Press. Ithaca, New York, New York, USA. 240 pp.
- Kumar, S., K. Tamura y M. Nei. 1993. MEGA. Molecular Evolutionary Genetics Analysis. Version 1.02. Institute of Molecular Evolutionary Genetics, Pennsylvania State University. Pennsylvania, USA.
- Lavín-Peregrina, M.F. y S. Organista. 1988. Surface heat flux in the northern Gulf of California. *J. Geophy. Res. 93: 14033-14038.*
- Le Boeuf B., J., D. Aurióles-Gamboa, R. Condit, C. Fox, R. Gisiner, R. Romero y F. Sinsel. 1983. Size and distribution of the California sea lion in México. *Proceedings of the California Academy of Sciences. 43(7):77-85.*
- Lesson, R.P. 1828. Phoque. *En: J.B.G.M. Bory de Sanint-Vicent (ed.). Dictionaire Classique d'Histoire Naturelle. Paris, Rey et Gravier. Paris, Francia.*
- Ley Federal de Pesca. 1986. Diario Oficial de la Federación. Noviembre 26 de 1986.

- Lluch-Belda B., D. 1969. El lobo marino de California, *Zalophus californianus* (Lesson, 1828). Allen 1880. Observaciones sobre su ecología y explotación. *Instituto Mexicano de Recursos Naturales Renovables*. México, D.F. 69 pp.
- Lowry, M.S., 1985. Movements of California sea lions (*Zalophus californianus*) from tag resights. *En: X Reunión Internacional para el Estudio de los Mamíferos Marinos*. Marzo. La Paz, B.C.S. México, pp. 167-172.
- Lowry, M.S. y M.O. Maravilla-Chávez. 2002. Abundancia de lobos marinos de California (*Zalophus californianus*) en Baja California, México y Estados Unidos de América durante julio y agosto del 2000. *En: XXVII Reunión Internacional para el estudio de los Mamíferos Marinos*. Mayo. Veracruz, Ver. México.
- Lowry, M.S., P. Boveng, R.J. DeLong, C.W. Oliver, B.S. Stewart, H. De Anda-Delgado y J. Barlow. 1992. Status of the California sea lion (*Zalophus californianus californianus*) population in 1992. Administrative Report LJ-92-32. *National Marine Fisheries Service*. Southwest Fisheries Center. La Jolla, California. 24 pp.
- Lowry, M.S. y R.L. Folk. 1987. Feeding habits of California sea lions from stranded carcasses collected at San Diego County and Santa Catalina Island, California. Administrative Report LJ-87-15. *National Marine Fisheries Service*. Southwest Fisheries Science Center, La Jolla, California. 33 pp.
- Lynn, R.J. y J.J. Simpson. 1987. The California Current System: The seasonal variability of its physical characteristics. *Journal of Geophysical Research*. **92** (C12): 12948-12966.
- Lyrholm, T., O. Leimar y U. Gyllensten. 1996. Low Diversity and Biased Substitution Patterns in the Mitochondrial DNA Control Region of Sperm Whales: Implications for Estimates of Time Since Common Ancestry. *Molecular Biology and Evolution*. **13**(10): 1318-1326.
- Mantua, N. 1998. The Pacific Decadal Oscillation and Pacific Salmon Production. *En: G. Holloway, P. Müller y D. Henderson (eds.)*. Biotic impacts of extratropical climate variability in the Pacific. Proceedings Aha Huliko'a. Hawaiian Winter Workshop. University of Hawaii at Manoa. SOEST Special Publication, pp. 1-4.

- Maldonado E., J., F. Orta-Dávila, B.S. Stewart, E. Geffen, R.K. Wayne. 1995. Intraspecific genetic differentiation in California sea lions (*Zalophus californianus*) from Southern California and the Gulf of California. *Marine Mammal Science*. **11**(1):46-58.
- Marine Mammal Commission. 1994. The Marine Mammal Protection Act of 1972 As Amended. Washington, D.C. 144 pp.
- Martien, K.K. 2000. Conservation of spatially structured populations: Lessons from population genetics. Ph. D. thesis. University of California, San Diego.
- Martien, K.K. y B.L. Taylor (en revisión). A new method for using genetic data to define management stocks for marine mammals. En revisión en: *Journal of Cetacean Research and Management*.
- Millette, L.L., A.W. Trites y D. Calkins. 1999. Behaviour of lactating Steller sea lions in Alaska: Are they nutritionally stressed? En: 13th Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals. 28 de noviembre a 3 de diciembre. Wailea, Hawaii.
- Millán-Núñez., R. y J.R. Lara-Lara. 1995. Productividad primaria del fitoplancton del Pacífico mexicano: un diagnóstico. En: González-Farías, F. y J. de la Rosa-Vélez (eds.). Temas de oceanografía biológica en México II. Universidad Autónoma de Baja California. Mexicali, B.C., México, pp. 31-60.
- Miller, D.J., M.J. Herder y J.P. Scholl. 1983. California marine mammal-fishery interaction study, 1979-1981. Administrative Report LJ-83-13C. *National Marine Fisheries Service*. Southwest Fisheries Center, La Jolla, California. 233 pp.
- Miller, A.J. y N. Schneider. 1998. Interpreting the observed patterns of Pacific Ocean Decadal Variations. En: G. Holloway, P. Müller y D. Henderson (eds.). Biotic impacts of extratropical climate variability in the Pacific. Proceedings Aha Huliko'a. Hawaiian Winter Workshop. University of Hawaii at Manoa. SOEST Special Publication, pp. 19-27.
- Mitchell, E.D. y R.H. Tedford. 1973. The Enaliarctinae: a new group of extinct aquatic Carnivora and a consideration of the origin of the Otariidae. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. **151**: 201-284.

- Miyazaki, S., H. Horikawa y N. Kohno. 1994. Summary of the fossil record of pinnipeds of Japan, and comparisons with that from the eastern North Pacific. *Island Archives*. **3**: 361-372.
- Morales-Vela, B. 1985. Aspectos del ciclo de vida del lobo marino *Zalophus californianus* en el Islote El Rasito, Golfo de California, México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. 75 pp.
- Morales-Vela, B. 1990. Parámetros reproductivos del lobo marino en la Isla Angel de la Guarda, Golfo de California, México. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM. 110 pp.
- Morales-Vela, B. y A. Aguayo-Lobo. 1992. Nacimientos y modelos de crecimiento de las crías de lobo marino y su aplicación en el manejo de este recurso. *Ciencias Marinas*. **18** (1): 109-123.
- Moritz, C. 1994. Defining "Evolutionarily Significant Units" for conservation. *Trends in Ecology and Evolution*. **9**: 373-375.
- Moritz, C., T.E. Dowling y W.M. Brown. 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*. **18**: 269-292.
- Morris, P.A. G.W. Oliver, J. Elliott, S.R. Melin y R.L. DeLong. 1999. El Niño 1998 and changes in California sea lion, *Zalophus californianus*, use of Año Nuevo island. *En*: 13th Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals. 28 de noviembre a 3 de diciembre. Wailea, Hawaii.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. New York. USA. 512 pp.
- Nei, M y S. Kumar. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press. New York, USA. 333 pp.
- O'Corry-Crowe, G.M., R.S. Suydam, A. Rosenberg, K.J. Frost y A.E. Dizon. 1997. Phylogeography, population structure and dispersal patterns of the beluga whale *Delphinapterus leucas* in the western Nearctic revealed by mitochondrial DNA. *Molecular Ecology*. **6**: 955-970.
- Odell, D.K. 1971. Censuses of pinnipeds breeding on the California Channel Islands. *Journal of Mammalogy*. **52**(1):187-190.
- Odell, D.K. 1975. Breeding biology of the California sea lion, *Zalophus californianus*. *Rapp. P.v. Reun. Cons. Int. Explor. Mer*. **169**: 374-378.

- Ogden, A. 1933. Russian sea otter and seal hunting on the California coast. *Californian History Society*. **12**: 29-51.
- Orr, R.T., J. Schonewald y K.W. Kenyon. 1970. The California sea lion: skull growth comparison of two populations. *Proceedings of the California Academy of Sciences*. **37**(11): 381-394.
- Orr, R.T. y Poulter, T.C. 1965. The pinniped population of Año Nuevo Island, California. *Proceedings of the California Academy of Sciences*. 4th ser. **32**(13): 377-404.
- Osuna-López, I. y G. Izaguirre-Fierro. 2000. El Golfo de California: Hidrología y Contaminación. En: L.E. Medina G. Y J. Castillo N. (eds.). Bermejo Mar de Cortés. Universidad Autónoma de Baja California y Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán, Sinaloa, México, pp. 12-44.
- Ovenden, J.R. 1990. Mitochondrial DNA and marine stock assessment: a review. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*. **41**: 835-853.
- Overland, J.E., J.M. Adams y N.A. Bond. 1998. Decadal variability of the Aleutian Low. En: G. Holloway, P. Müller y D. Henderson (eds.). Biotic impacts of extratropical climate variability in the Pacific. Proceedings Aha Huliko'a. Hawaiian Winter Workshop. University of Hawaii at Manoa. SOEST Special Publication, pp. 15-18.
- Paden, C.A., M.R. Abbott y C.D. Winant. 1991. Tidal and atmospheric forcing of the upper ocean in the Gulf of California 1. Sea Surface temperature variability. *Journal of Geophysical Research*. **96**: 18337-18359.
- Parés-Sierra, A, M. López y E.G. Pavía. 1997. Oceanografía física del Océano Pacífico Nororiental. En: M.F. Lavín-Peregrina (ed.). Contribuciones a la Oceanografía Física en México. Monografía No. 3. Unión Geofísica Mexicana. Ensenada, Baja California, México, pp. 1-24.
- Palsbøll, P.J. (No publicado). From skin biopsy to DNA sequence. A short guide & manual. Department of Population Biology, Zoological Institute, University of Copenhagen. Copenhagen, Denmark. 1991.
- Peters, W.C.H. 1866. Über die Ohrnrobber (Seelöwen und Seebären), Otariae insbesondere über die in den Sammlungen zu Berlin befindlichen Arten. *Monatsber. K. P. Akad. Wissensch. Berlin*. **1866**: 261-281.

- Peterson, R.S. y G.A. Bartholomew. 1967. The natural history and behavior of the California sea lion. Special Publication No. 1. *The American Society of Mammalogists*. 79 pp.
- Pierotti, R.J., D.G. Ainley, T.J. Lewis y M.C. Coulter. 1977. Birth of a California sea lion on southeast Farallon Island. *California Fish and Game Bulletin*. **63**: 64-66.
- Quinn, W.H. 1990. A preliminary record of Southern Oscillation-related activity extending about 1,368 years into the past. En: H.F. Díaz y V. Markgraf (eds.). Workshop on Paleoclimatic Aspects of El Niño/Southern Oscillation, Boulder Co. NOAA & Inst. Arctic Alpine Res.
- Redenbach, Z. y E.B. Taylor. 1999. Zoogeographical implications of variation in mitochondrial DNA of Arctic grayling (*Thymallus arcticus*). *Molecular Ecology*. **8**: 23-35.
- Repenning, C.A. 1976. Adaptative evolution of sea lions and walruses. *Systematic Zoology*. **25**: 375-390.
- Repenning, C.A., C.E. Ray y D. Grigourescu. 1979. Pinniped biogeography. En: J.Gray y A.J. Boucot (eds.). Historical Biogeography, Plate Tectonics, and the Changing Environment. Oregon State University Press. Carvellis, OR, USA, pp. 357-369.
- Rice, D.W. 1998. Marine Mammals of the World: Systematics and Distribution. Society for Marine Mammalogy. Special Publication No. 4. Lawrence, KS, USA.
- Riedman, M. 1990. The Pinnipeds. Seals, sea lions, and walruses. University of California Press. Berkeley and Los Angeles, USA. 439 pp.
- Riginos, C. y M.W. Nachman. 2001. Population subdivision in marine environments: the contributions of biogeography, geographical distance, and discontinuous habitat to genetic differentiation in a blennioid fish, *Axoclinus nigricaudus*. *Molecular Ecology*. **10** (6): 1439-1453.
- Ripa-Alsina, P. y S.G. Marinone-Moscetto. 1989. Seasonal variability of temperature, salinity, velocity, vorticity and sea level in the Central Gulf of California, as inferred from historical data. *Q.J.R. Meteorel. Soc.* **115**: 887-913.

- Roden, G.I. 1964. Oceanographic aspects of the Gulf of California. *En*: T.J.H. Van Andel and G.G. Shor (eds.). *Marine geology of the Gulf of California: a symposium*. AAPG Memoir 3, pp. 30-58.
- Roden, G.I. y G.W. Groves. 1959. Recent oceanographic observations in the Gulf of California. *Journal of Marine Research*. **18**: 10-35.
- Roff, D.A. y P. Bentzen. 1989. The statistical analysis of mitochondrial DNA polymorphisms: χ^2 and the problem of small samples. *Molecular Biology and Evolution*. **6**: 539-545.
- Rosel, P.E. y L. Rojas-Bracho. 1999. Mitochondrial DNA variation in the critically endangered vaquita *Phocoena sinus* Norris and MacFarland, 1958. *Marine Mammal Science*. **15**(4): 990-1003.
- Rosel, P.E., R. Tiedemann y M. Walton. 1999. Genetic evidence for limited trans-Atlantic movements of the harbor porpoise *Phocoena phocoena*. *Marine Biology*. **133**: 583-591.
- Salazar-Godoy, A.B. 1989. Hábitos alimenticios, distribución y tamaño de población del lobo marino *Zalophus californianus* en Isla de Cedros, B.C., México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Marinas. Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada, B.C. 74 pp.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch y T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Harbor, New York, New York, USA.
- Sanger, F., S. Nicklen y A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. **74**: 5463-5467.
- Santamaría-Del Angel, S. Álvarez-Borrego y F.E. Müller-Karger. 1994. Gulf of California biogeographic regions based on coastal zone color scanner imagery. *Journal of Geophysical Research*. **99** (C4): 7411-7421.
- Scammon, C.M. 1874. *The marine mammals of the northwestern coast of North America*. Reimpreso en 1968 por Dover Publications, Inc. 322 pp.
- Scheffer, V.B. 1958. *Seals, Sea Lions and Walruses. A review of the pinnipedia*. Stanford University Press. Stanford, California, USA. 179 pp.
- Sequencher™ 3.0.1. 1995. Gene Codes Corporation, Inc.

- Schneider, S., J.M. Kueffer, D. Roessli y L. Excoffier. 1997. Arlequin v.1.1: A software for population genetic data analysis. Genetic and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- Sivertsen, E., 1953. A new species of sea lion, *Zalophus wollebaeki* from the Galapagos Islands. *Det. Kong. Norske Vid. Selsk. Forh.* **26** (1): 1-3.
- Soto, K. y M. Arias-Schreiber. 1999. Effects of the 1997/98 "El Niño" on the reproductive biology of the south American sea lions (*Otaria byronia*) at the Ballestas Islands, Perú. *En: 13th Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals.* 28 de noviembre a 3 de diciembre. Wailea, Hawaii.
- Springer, A.M. 1998. Is it all climate change? Why marine birds and mammal populations fluctuate in the North Pacific. *En: G. Holloway, P. Müller y D. Henderson (eds.). Biotic impacts of extratropical climate variability in the Pacific. Proceedings Aha Huliko'a. Hawaiian Winter Workshop. University of Hawaii at Manoa. SOEST Special Publication,* pp. 109-119.
- Stewart, B.S. y P.K. Yochem. 1987. Entanglement of pinnipeds in synthetic debris and fishing net and line fragments at San Nicolas and San Miguel Islands, California, 1978-1986. *Marine Pollution Bulletin.* **18**(6B): 336-339.
- Stroud, R.K. y T.J. Roffe. 1979. Causes of death in marine mammals stranded along the Oregon coast. *Journal of Wildlife Diseases.* **15**: 91-97.
- Tajima, F. 1983. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics.* **105**: 437-460.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics.* **123**: 585-595.
- Tajima, F. 1993. Measurement of DNA polymorphism. *En: N. Takahata y A.G. Clark (eds.). Mechanisms of Molecular Evolution. Introduction to Molecular Paleopopulation Biology.* Japan Scientific Societies Press, Sinauer Associates, Inc. Tokyo, Japan, pp. 37-59.
- Takahata, N. 1988. The coalescent in two partially isolated diffusion populations. *Genetics Research, Cambridge.* **52**: 213-222.

- Taylor, B.L., S.J. Chivers y A.E. Dizon. 1997. Using statistical power to interpret genetic data to define management units for marine mammals. *En: A.E. Dizon, S.J. Chivers y W.F. Perrin (eds.). Molecular Genetics of Marine Mammals. Special Publication 3. The Society for Marine Mammalogy. Allen Press, Inc. Lawrence, KS, USA, pp. 347-363.*
- Thomas, W.K., S Pääbo, F.X. Villablanca y A.C. Wilson. 1990. Spatial and temporal continuity of kangaroo rat populations shown by sequencing mitochondrial DNA from museum specimens. *Journal of Molecular Evolution. 31: 101-112.*
- Townsend, C. 1918. Sea lions and Fishery Industry. *New York Zoological Society Bulletin. 12: 1679-1682.*
- Townsend, C. 1919. The utilization of the sea lion. *New York Zoological Society Bulletin. 10:32-33.*
- UltraEdit-32. Professional Text/HEX Editor. Version 6.10a. 1994-1999. IDM Computer Solutions, Inc.
- Weir, B.S. 1996. Genetic Data Analysis II: Methods for discrete population genetic data. Sinauer Assoc., Inc. Sunderland, Massachusetts, USA. 445 pp.
- Weir, B.S. y C.C. Cockerham. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution. 38: 1358-1370.*
- Wright, S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution. 19: 395-420.*
- Wynen, L.P., S.D. Goldsworthy, S.J. Insley, M. Adams, J.W. Bickham, J. Francis, J.P. Gallo-Reynoso, A.R. Hoelzel, P. Majluf, R.W.G. White y R. Slade. 2001. Phylogenetic relationships within the eared seals (Otariidae: Carnivora): Implications for the historical biogeography of the Family. *Molecular Phylogenetics and Evolution. 21 (2): 270-284.*
- Zagzebski, K.A., A. Phillips y F.D. Frances. 1999. The impact of the 1998 El Niño on pinniped strandings in central California. *En: 13th Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals. 28 de noviembre a 3 de diciembre. Wailea, Hawaii.*

- Zavala-González G., A. 1990. La población del lobo marino común *Zalophus californianus californianus* (Lesson, 1828) en las islas del Golfo de California, México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. 253 pp.
- Zavala-González G., A. 1993. Biología poblacional del lobo marino de California *Zalophus californianus californianus* (Lesson, 1828) en la región de las grandes islas del Golfo de California, México. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM. 79 pp.
- Zavala-González G., A. y A. Aguayo-Lobo. 1988. La población del lobo marino común *Zalophus californianus*, en la región de las grandes islas, Golfo de California, México. *En: I Congreso Nacional de la Asociación de Investigadores del Mar de Cortés, A.C. Hermosillo, Son.*
- Zavala-González G., A. y C. Esquivel-Macías. 1991. Observaciones y comentarios sobre la interacción de mamíferos marinos con pesquerías litorales en aguas mexicanas. *En: XVI Reunión Internacional para el Estudio de los Mamíferos Marinos. Abril. Nuevo Vallarta, Nay., México.*
- Zavala-González G., A. y E. Mellink-Bijtel. 1997. Entanglement of California sea lions, *Zalophus californianus californianus*, in fishing gear in the central-northern part of the Gulf of California, México. *Fishery Bulletin. 95(1): 180-184.*
- Zavala-González G., A. y E. Mellink-Bijtel. 2000. Historical exploitation of the California sea lion, *Zalophus californianus*, in México. *Marine Fisheries Review. 62(1): 35-40.*
- Zavala-González, G.A., P. Illoldi R., M.A. Linaje E., A. Mejía O., M. T. Saavedra S. y A. Aguayo-Lobo. 1992. Pesquerías ribereñas y su interacción con el lobo marino común (*Zalophus californianus californianus*) en las inmediaciones de la Isla Angel de la Guarda, Golfo de California, México. *En: XVII Reunión Internacional para el Estudio de los Mamíferos Marinos. Abril. La Paz, B.C.S. México.*

ANEXO I.

Datos de la recolecta de muestras por lugar y en orden cronológico de visita. Se indican las coordenadas de la zona de recolecta en cada isla, el sexo y el haplotipo.

Isla Granito			Isla Angel de la Guarda (Los Cantiles)		
Fecha: 16/VII/97			Fecha: 16/VII/97		
Zona: 29°34' N, 113°32' W			Zona: 29°30' N, 113°26' W		
Muestra	Sexo	Haplotipo	Muestra	Sexo	Haplotipo
Gr1	H	5	Ca1	M	33
Gr2	M	12	---	---	---
Gr3	H	32	Ca3	H	12
Gr4	H	32	Ca4	M	12
Gr5	H	---	Ca5	M	---
Gr6	M	12	Ca6	H	7
Gr7	M	5	Ca7	H	14
Gr8	H	---	Ca8	M	14
Gr9	M	6	Ca9	M	29
Gr10	M	20	Ca10	M	12
Gr11	M	12	Ca11	M	29
Gr12	H	12	Ca12	M	29
Gr13	M	30	Ca13	M	6
Gr14	H	6	Ca14	M	33
Gr15	H	6			

Isla San Jorge		
Fecha: 17/VII/97		
Zona: 31°01' N, 113°14.6' W		
Muestra	Sexo	Haplotipo
Sj1	H	31
Sj2	H	23
Sj3	H	22
Sj4	H	4
Sj5	H	4
Sj6	H	4
Sj7	H	1
SjJ8	H	1
SjJ9	H	12
S10	H	1
Sj11	H	6
Sj12	H	4
Sj13	M	33
Sj14	M	1
Sj15	H	1
Sj16	H	6
Sj17	M	19
Sj18	H	18
Sj19	H	33
Sj20	M	12

Isla Lobos		
Fecha: 18/VII/97		
Zona: 30°02.9' N, 114°29.3' W		
Muestra	Sexo	Haplotipo
Ls1	H	33
Ls2	M	33
Ls3	M	18
Ls4	M	12
Ls5	H	18
Ls6	H	33
Ls7	H	12
Ls8	H	1
Ls9	H	22
Ls10	M	21
Ls11	H	---
Ls12	M	32
Ls13	H	6
Ls14	M	15
Ls15	M	29
Ls16	H	3

Isla San Esteban			Los Islotes		
Fecha: 21/VII/97			Fecha: 24/VII/97		
Zona: 28°41' N, 112°34.5' W			Zona: *		
Muestra	Sexo	Haplotipo	Muestra	Sexo	Haplotipo
Es1	M	13	Is1	M	6
Es2	M	13	Is2	H	27
Es3	M	11	Is3	M	6
Es4	M	11	Is4	M	6
Es5	H	12	Is5	H	24
Es6	M	29	Is6	M	6
Es7	M	32	Is7	M	6
Es8	H	12	Is8	M	1
Es9	H	33	Is9	M	10
Es10	M	12	Is10	M	6
Es11	H	12	Is11	M	1
Es12	H	8	Is12	M	7
Es13	M	12	Is13	M	9
Es14	M	12	Is14	H	6
Es15	M	6	Is15	M	6
			Is16	H	27

(*) No se tomaron las coordenadas exactas. La captura se realizó en la única zona con crías.

Isla Coronados (sur)
 Fecha: 29/VII/97
 Zona: 32°23.49' N, 117°14.61' W

Muestra	Sexo	Haplotipo
Co1	M	24
Co2	H	---
Co3	M	25
Co4	M	24
Co5	M	---
Co6	H	7
Co7	M	1
Co8	H	1
Co9	H	27
Co10	H	1
Co11	M	1
Co12	H	---
Co13	H	1
Co14	M	17
Co15	M	17

Isla Benitos (centro)
 Fecha: 1/VIII/97
 Zona: 28°18.62' N, 115°34.31' W

Muestra	Sexo	Haplotipo
Be1	M	27
Be2	M	17
Be3	H	24
Be4	H	27
Be5	H	17
Be6	M	17
Be7	M	27
Be8	M	1
Be9	H	27
Be10	H	26
Be11	M	27
Be12	M	6
Be13	M	27
Be14	M	1
Be15	M	17
Be16	no identificado	24
Be17	no identificado	27

Isla Cedros
 Fecha: 2/VIII/97
 Zona: 28°22.19' N, 115°12.20' W

Muestra	Sexo	Haplotipo
Cd1	H	17
Cd2	M	17
Cd3	H	27
Cd4	M	1
Cd5	H	1
Cd6	H	28
Cd7	H	27
Cd8	M	17
Cd9	H	17
Cd10	H	23
Cd11	H	27
Cd12	M	27
Cd13	H	1
Cd14	M	27
Cd15	M	24
Cd16	M	12
Cd17	M	1
Cd18	H	23
Cd19	H	17

Isla Asunción
 Fecha: 4/VIII/97
 Zona: 27°06.61' N, 114°17.64' W

Muestra	Sexo	Haplotipo
As1	H	2
As2	H	16
As3	H	27
As4	H	24
As5	H	17
As6	H	6
As7	H	1
As8	H	27
As9	H	17
As10	M	1
As11	M	17
As12	M	27
As13	M	1
As14	M	27
As15	M	1

Isla Margarita
Fecha: 6/VIII/97
Zona: *

Muestra	Sexo	Haplotipo
Mg1	H	23
Mg2	H	1
Mg3	M	27
Mg4	M	24
Mg5	H	27
Mg6	H	17
Mg7	H	17
Mg8	M	1
Mg9	H	24
Mg10	H	6
Mg11	M	6
Mg12	M	17
Mg13	M	27
Mg14	M	17
Mg15	M	27
Mg16	H	6

(*) No se tomaron las coordenadas exactas. La captura se realizó en Bahía Almejas.

ANEXO II.

Secuencias originales de los 170 individuos. El nombre indica el origen de la muestra (isla o lobera) en orden alfabético y el número de organismo. Ejemplo: As1 es la muestra uno de Isla Asunción.

001 As1

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
 CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATGTACATCG
 TGCATTGATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
 CATAACTTCAAATAATTTGACTTAAATACTATAAECTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTAGT
 CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

002 As2

CACCATCAACACCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
 CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTCTCTCCCCTATGTACGTCG
 TGCATTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
 CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAECTTCTTGATACAAAGTGAATTCACCTAGT
 CCACGAAGCTTAATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

003 As3

CACCATCAACACCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
 CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTCCCCCATGTACATCG
 TGCATTAGTGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
 CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAECTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTAGT
 CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

004 As4

CACCATCAACACCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
 CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTCCCCCATGTACATCG
 TGCATTAGTGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
 CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAECTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTAGT
 CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

005 As5

CACCATCAACACCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
 CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTCTCTCCCCTATGTACGTCG
 TGCATTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
 CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAECTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTAGT
 CCACGAAGCTTAATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

006 As6

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
 CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATGTACATCG
 TGCATTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
 CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAECTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTAGT
 CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

007 As7

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
 CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATGTACATCG
 TGCATTGATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
 CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAECTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTAGT
 CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

008 As8

CACCATCAACACCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTCCCCCATGTACATCG
TGCATTAGTGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAATTCTTGATACAAATGTAACCTACTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

009 As9

CACCATCAACACCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTCTCTCCCTATGTACGTCG
TGCATTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAATTCTTGATACAAATGTAATTCACTTAGT
CCACGAAGCTTAATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

010 As10

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTTCCCTATGTACATCG
TGCATTGATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAATTCTTGATACAAATGTAATTCACTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

011 As11

CACCATCAACACCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTCTCTCCCTATGTACGTCG
TGCATTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAATTCTTGATACAAATGTAATTCACTTAGT
CCACGAAGCTTAATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

012 As12

CACCATCAACACCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTCCCCCATGTACATCG
TGCATTAGTGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAATTCTTGATACAAATGTAACCTACTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

013 As13

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTTCCCTATGTACATCG
TGCATTGATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAATTCTTGATACAAATGTAATTCACTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

014 As14

CACCATCAACACCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTCCCCCATGTACATCG
TGCATTAGTGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAATTCTTGATACAAATGTAACCTACTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

015 As15

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTTCCCTATGTACATCG
TGCATTGATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAATTCTTGATACAAATGTAATTCACTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

016 Be1

CACCATCAACACCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTTCATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTCCCCCCCATGTACATCG
TGCATTAGTGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAACCTCACTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

017 Be2

CACCATCAACACCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTTCATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTCTCTCCCCTATGTACGTGCG
TGCATTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTTAGT
CCACGAAGCTTAATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

018 Be3

CACCATCAACACCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTTCATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTCCCCCCCCTATGTACATC
GTGCATTAGTGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATG
ACATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAACCTCACTTAG
TCCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

019 Be4

CACCATCAACACCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTTCATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTCCCCCCCATGTACATCG
TGCATTAGTGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAACCTCACTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

020 Be5

CACCATCAACACCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTTCATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTCTCTCCCCTATGTACGTGCG
TGCATTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTTAGT
CCACGAAGCTTAATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

021 Be6

CACCATCAACACCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTTCATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTCTCTCCCCTATGTACGTGCG
TGCATTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTTAGT
CCACGAAGCTTAATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

022 Be7

CACCATCAACACCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTTCATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTTCCCCCCCCTATGTAC
ATCGTGCATTAGTGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATG
ATGACATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAACCTCACT
TAGTCCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCT
C

023 Be8

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTTCATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTTCCCCTATGTACATCG
TGCATTGATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

024 Be9

CACCATCAACACCCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTCCCCCCCATGTACATCG
TGCATTAGTGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAACCTACTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

025 Be10

CACCATCAACACCCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTCCCCCCCATGTACGTCGT
GCATTAGTGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGAC
ATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAACCTACTTAGTC
CACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

026 Be11

CACCATCAACACCCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTTCCCCCATGTACATCG
TGCATTAGTGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAACCTACTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

027 Be12

CACCATCAACACCCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTTCCCCTATGTACATCG
TGCATTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAATTCACTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

028 Be13

CACCATCAACACCCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTTCCCCCATGTACATCGT
GCATTAGTGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGAC
ATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAACCTACTTAGTC
CACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

029 Be14

CACCATCAACACCCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTTCCCCTATGTACATCG
TGCATTGATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAATTCACTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

030 Be15

CACCATCAACACCCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTCTCTCCCCTATGTACGTCG
TGCATTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAATTCACTTAGT
CCACGAAGCTTAATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

031 Be16

CACCATCAACACCCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTCCCCCCTATGTACATCG
TGCATTAGTGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAACCTACTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

032 Be17

CACCATCAACACCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTCCCCCATGTACATCG
TGCATTAGTGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAATTCTTGATACAAATGTAACCTACTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

033 Ca1

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTCCCCCATGTACGTCTG
GCATTAGTGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGAC
ATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAATTCTTGACACAAATGTAACCTACTTAGT
CACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

034 Ca3

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTCCCCCATGTACGTCTG
TGCATTGATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAATTCTTGATACAAATGTAATTCACTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

035 Ca4

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTCCCCCATGTACGTCTG
TGCATTGATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAATTCTTGATACAAATGTAATTCACTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

036 Ca6

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTCCCCCATGTACATCG
TGCATTGGTGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAATTCTTGATACAAATGTAATTCACTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

037 Ca7

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTCCCCCATGTACGTCTG
TGCATTAATGGCTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAATTCTTGATACAAATGTAATTCACTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

038 Ca8

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTCCCCCATGTACGTCTG
TGCATTAATGGCTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAATTCTTGATACAAATGTAATTCACTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

039 Ca9

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTCCCCCATGTACGTCTG
TGCATTAGTGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAACTTGACTCAAATACTATAAATTCTTGATACAAATGTAACCTACTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

040 Ca10

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATGTACGTCCG
TGCATTGATGGTTTGGCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

041 Ca11

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATGTACGTCCG
TGCATTAGTGGTTTGGCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAACTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAACTCACCTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

042 Ca12

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATGTACGTCCG
GCATTAGTGGTTTGGCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGAC
ATAACTTCAAATAACTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAACTCACCTAGTC
CACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

043 Ca13

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATGTACATCG
TGCATTAATGGTTTGGCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

044 Ca14

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTACCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATGTACGTCCG
GCATTAGTGGTTTGGCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGAC
ATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGACACAAATGTAACTCACCTAGTC
CACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

045 Cd1

CACCATCAACACCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTCTCTCCCCTATGTACGTCCG
TGCATTAATGGTTTGGCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTAGT
CCACGAAGCTTAATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

046 Cd2

CACCATCAACACCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTCTCTCCCCTATGTACGTCCG
TGCATTAATGGTTTGGCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTAGT
CCACGAAGCTTAATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

047 Cd3

CACCATCAACACCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCCATGTACATCG
TGCATTAGTGGTTTGGCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAACTCACCTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

048 Cd4

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTCATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATGTACATCG
TGCATTGATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAECTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

049 Cd5

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTCATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATGTACATCG
TGCATTGATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAECTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

050 Cd6

CACCATCAACACCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTCATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCCATGTACATCG
TGCATTAGTGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAECTTCTTGATACGAATGTAACCTCCTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

051 Cd7

CACCATCAACACCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTCATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCCATGTACATCG
TGCATTAGTGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAECTTCTTGATACAAATGTAACCTCCTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

052 Cd8

CACCATCAACACCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTCATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTCTCTCCCCTATGTACGTGCG
TGCATTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAECTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTAGT
CCACGAAGCTTAATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

053 Cd9

CACCATCAACACCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTCATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTCTCTCCCCTATGTACGTGCG
TGCATTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAECTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTAGT
CCACGAAGCTTAATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

054 Cd10

CACCATCAACACCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTCATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCCATGTACATCG
TGCATTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAECTTCTTGATACAAATGTAACCTCCTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

055 Cd11

CACCATCAACACCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTCATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCCATGTACATCG
TGCATTAGTGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAECTTCTTGATACAAATGTAACCTCCTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

056 Cd12

CACCATCAACACCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTCCCCCATGTACATCG
TGCATTAGTGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAECTTCTTGATACAAATGTAACCTCACTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

057 Cd13

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCTATGTACATCG
TGCATTGATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAECTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

058 Cd14

CACCATCAACACCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCCATGTACATCG
TGCATTAGTGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAECTTCTTGATACAAATGTAACCTCACTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

059 Cd15

CACCATCAACACCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCCATGTACATCG
TGCATTAGTGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAECTTCTTGATACAAATGTAACCTCACTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

060 Cd16

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCTATGTACGTCG
TGCATTGATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAECTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

061 Cd17

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCTATGTACATCG
TGCATTGATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAECTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

062 Cd18

CACCATCAACACCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCCATGTACATCG
TGCATTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAECTTCTTGATACAAATGTAACCTCACTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

063 Cd19

CACCATCAACACCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTCTCTCCCTATGTACGTCG
TGCATTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAECTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTTAGT
CCACGAAGCTTAATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

064 Co1

CACCATCAACACCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTCCCCCCTATGTACATC
GTGCATTAGTGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATG
ACATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAATTCTTGATACAAATGTAACCTACTTAG
TCCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

065 Co3

CACCATCAACACCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTCCCCCCTATGTACGTCG
TGCATTAGTGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAATTCTTGATACAAATGTAACCTACTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

066 Co4

CACCATCAACACCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTCCCCCCTATGTACATCG
TGCATTAGTGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAATTCTTGATACAAATGTAACCTACTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

067 Co6

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTTCCCTATGTACATCG
TGCATTGGTGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAATTCTTGATACAAATGTAATTCACTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

068 Co7

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTTCCCTATGTACATCG
TGCATTGATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAATTCTTGATACAAATGTAATTCACTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

069 Co8

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTTCCCTATGTACATCG
TGCATTGATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAATTCTTGATACAAATGTAATTCACTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

070 Co9

CACCATCAACACCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTCCCCCCTATGTACATCG
TGCATTAGTGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAATTCTTGATACAAATGTAACCTACTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

071 Co10

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTTCCCTATGTACATCG
TGCATTGATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAATTCTTGATACAAATGTAATTCACTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

072 Co11

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTTCCCTATGTACATCG
TGCATTGATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAECTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

073 Co13

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTTCCCTATGTACATCG
TGCATTGATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAECTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

074 Co14

CACCATCAACACCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTCTCTCCCTATGTACGTGCG
TGCATTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAECTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTAGT
CCACGAAGCTTAATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

075 Co15

CACCATCAACACCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTCTCTCCCTATGTACGTGCG
TGCATTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAECTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTAGT
CCACGAAGCTTAATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

076 Es1

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTTCCCTATGTACGTGCG
TGCATTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAECTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

077 Es2

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTTCCCTATGTACGTGCG
TGCATTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAECTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

078 Es3

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTCCCCCATGTACATCGT
GCATTAGTGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGAC
ATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAECTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTAGTC
CACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

079 Es4

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTCCCCCATGTACATCGT
GCATTAGTGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGAC
ATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAECTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTAGTC
CACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

080 Es5

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCTGACATGATTAAACTCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATGTACGTCG
GCATTGATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGAC
ATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAATTCCTTAGTC
CACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

081 Es6

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCTGACATGATTAAACTCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATGTACGTCG
TGCATTAGTGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAACTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAACTCACTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

082 Es7

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCTGACATGATTAAACTCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATGTACGTCG
TGCATTAGTGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAACTTGACTCAAACACTATAACTTCTTGATACAAATGTAACTCACTTAGT
CCGCGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

083 Es8

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCTGACATGATTAAACTCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATGTACGTCG
TGCATTGATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAATTCCTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

084 Es9

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCTGACATGATTAAACTCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTACCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATGTACGTCG
GCATTAGTGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGAC
ATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGACACAAATGTAACTCACTTAGTC
CACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

085 Es10

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCTGACATGATTAAACTCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATGTACGTCG
TGCATTGATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAATTCCTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

086 Es11

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCTGACATGATTAAACTCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATGTACGTCG
TGCATTGATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAATTCCTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

087 Es12

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCTGACATGATTAAACTCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATGTACGTCG
TGCATTGGTGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAATTCCTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

088 Es13

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTTCCCCTATGTACGTCG
TGCATTGATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

089 Es14

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTTCCCCTATGTACGTCG
TGCATTGATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

090 Es15

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTTCCCCTATGTACATCG
TGCATTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

091 Gr1

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTTCCCCTATGTACATCG
TGCATTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAACACTATAACTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

092 Gr2

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTTCCCCTATGTACGTCG
TGCATTGATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

093 Gr3

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTTCCCCTATGTACGTCG
TGCATTAGTGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAACTTGACTCAAACACTATAACTTCTTGATACAAATGTAACTCACTTAGT
CCGCGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

094 Gr4

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTTCCCCTATGTACGTCG
TGCATTAGTGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAACTTGACTCAAACACTATAACTTCTTGATACAAATGTAACTCACTTAGT
CCGCGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

095 Gr6

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTTCCCCTATGTACGTCG
TGCATTGATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

096 Gr7

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTCATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATGTACATCG
TGCATTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAACACTATAACTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

097 Gr9

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTCATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATGTACATCG
TGCATTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

098 Gr10

CACCATCAACACCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTCATACATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTTTTTCCCCCCCATGT
ACATCGTGCATTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACA
TGATGACATAACTTCAAATAACTTGACTCAAACACTATAACTTCTTGATACAAATGTAACTCA
CTTAGTCCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTAC
CTC

099 Gr11

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTCATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATGTACGTCG
TGCATTGATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

100 Gr12

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTCATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATGTACGTCG
TGCATTGATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

101 Gr13

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTCATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATGTACGTCG
GCATTAGTGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGAC
ATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATGACTTCTTGATACAAATGTAACTCACTTAGTC
CGCGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

102 Gr14

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTCATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATGTACATCG
TGCATTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

103 Gr15

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTCATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATGTACATCG
TGCATTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

104 Is1

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATT CATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATGTACATCG
TGCATTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAA ACTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

105 Is2

CACCATCAACACCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATT CATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCCATGTACATCG
TGCATTAGTGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAA ACTTCTTGATACAAATGTA ACTCACCTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

106 Is3

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATT CATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATGTACATCG
TGCATTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAA ACTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

107 Is4

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATT CATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATGTACATCG
TGCATTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAA ACTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

108 Is5

CACCATCAACACCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATT CATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCCTATGTACATCG
TGCATTAGTGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAA ACTTCTTGATACAAATGTA ACTCACCTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

109 Is6

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATT CATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATGTACATCG
TGCATTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAA ACTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

110 Is7

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATT CATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATGTACATCG
TGCATTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAA ACTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

111 Is8

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATT CATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATGTACATCG
TGCATTGATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAA ACTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

112 Is9

CACCATCAACACCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCCATGTACATCG
TGCATTAGTGGTTTGGCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAATTCTTGATACAAATGTAATTCACCTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

113 Is10

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCCATGTACATCG
TGCATTAATGGTTTGGCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAATTCTTGATACAAATGTAATTCACCTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

114 Is11

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCCATGTACATCG
TGCATTGATGGTTTGGCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAATTCTTGATACAAATGTAATTCACCTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

115 Is12

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCCATGTACATCG
TGCATTGGTGGTTTGGCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAATTCTTGATACAAATGTAATTCACCTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

116 Is13

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCCATGTACATCG
TGCATTAGTGGTTTGGCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAATTCTTGATACAAATGTAATTCACCTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

117 Is14

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCCATGTACATCG
TGCATTAATGGTTTGGCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAATTCTTGATACAAATGTAATTCACCTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

118 Is15

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCCATGTACATCG
TGCATTAATGGTTTGGCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAATTCTTGATACAAATGTAATTCACCTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

119 Is16

CACCATCAACACCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCCATGTACATCG
TGCATTAGTGGTTTGGCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAATTCTTGATACAAATGTAATTCACCTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

120 Ls1

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTACCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATGTACGTCGT
GCATTAGTGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGAC
ATAACTTCAAATAAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGACACAAATGTAACCTCACTTAGTC
CACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

121 Ls2

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTACCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATGTACGTCGT
GCATTAGTGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGAC
ATAACTTCAAATAAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGACACAAATGTAACCTCACTTAGTC
CACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

122 Ls3

CACCATCAACACCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCCATGTACATCG
TGCATTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAACCTCACTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

123 Ls4

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATGTACGTCG
TGCATTGATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

124 Ls5

CACCATCAACACCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTTTTCCCCCCCCATGTA
CATCGTGCATTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACAT
GATGACATAACTTCAAATAAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAACCTCAC
TTAGTCCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACC
TC

125 Ls6

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTACCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATGTACGTCGT
GCATTAGTGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGAC
ATAACTTCAAATAAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGACACAAATGTAACCTCACTTAGTC
CACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

126 Ls7

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATGTACGTCG
TGCATTGATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

127 Ls8

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATGTACATCG
TGCATTGATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

128 Ls9

CACCATCAACACCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCCTATGTACGTCG
TGCATTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAACTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAACCTCACTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

129 Ls10

CACCATCAACACCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCCTATGTACATC
GTGCATTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATG
ACATAACTTCAAATAACTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAACCTCACTTAG
TCCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

130 Ls12

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATGTACGTCG
TGCATTAGTGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAACTTGACTCAAAACTATAACTTCTTGATACAAATGTAACCTCACTTAGT
CCGCGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

131 Ls13

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATGTACATCG
TGCATTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAATTCCTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

132 Ls14

CACCATCAACACCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCCTATGTACGTCG
TGCATTAATGGCTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAACTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAATTCCTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

133 Ls15

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATGTACGTCG
TGCATTAGTGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAACTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAACCTCACTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

134 Ls16

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCCATGTACATCG
TGCATTGATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAATTCCTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

135 Mg1

CACCATCAACACCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTCCCCCCCCATGTACATCG
TGCATTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAACCTCACTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

136 Mg2

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATGTACATCG
TGCATTGATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAATTCTTGATACAAATGTAATTCACCTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

137 Mg3

CACCATCAACACCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCCATGTACATCG
TGCATTAGTGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAATTCTTGATACAAATGTAACCTCACTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

138 Mg4

CACCATCAACACCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCCATGTACATCG
TGCATTAGTGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAATTCTTGATACAAATGTAACCTCACTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

139 Mg5

CACCATCAACACCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCCATGTACA
TCGTGCATTAGTGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGA
TGACATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAATTCTTGATACAAATGTAACCTCACTT
AGTCCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

140 Mg6

CACCATCAACACCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTCTCTCCCTATGTACGTCG
TGCATTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAATTCTTGATACAAATGTAATTCACCTTAGT
CCACGAAGCTTAATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

141 Mg7

CACCATCAACACCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTCTCTCCCTATGTACGTCG
TGCATTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAATTCTTGATACAAATGTAATTCACCTTAGT
CCACGAAGCTTAATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

142 Mg8

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATGTACATC
GTGCATTGATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATG
ACATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAATTCTTGATACAAATGTAATTCACCTTAG
TCCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

143 Mg9

CACCATCAACACCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCCATGTACATCG
TGCATTAGTGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAAATTCTTGATACAAATGTAACCTCACTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

144 Mg10

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
 CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTTCCCCTATGTACATCG
 TGCATTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
 CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTTAGT
 CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

145 Mg11

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
 CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTTCCCCTATGTACATCG
 TGCATTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
 CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTTAGT
 CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

146 Mg12

CACCATCAACACCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
 CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTCTCTCCCCTATGTACGTGCG
 TGCATTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
 CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTTAGT
 CCACGAAGCTTAATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

147 Mg13

CACCATCAACACCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
 CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTCCCCCCCCATGTACATCG
 TGCATTAGTGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
 CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAACTCACTTAGT
 CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

148 Mg14

CACCATCAACACCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
 CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTCTCTCCCCTATGTACGTGCG
 TGCATTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
 CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTTAGT
 CCACGAAGCTTAATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

149 Mg15

CACCATCAACACCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
 CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTCCCCCCCCATGTACATCG
 TGCATTAGTGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
 CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAACTCACTTAGT
 CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

150 Mg16

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
 CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTTCCCCTATGTACATCG
 TGCATTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
 CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTTAGT
 CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

151 Sjl

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
 CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTTCCCCTATGTACGTGCGT
 GCATTAGTGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGAC
 ATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATGACTTCTTGATACAAATGTAACTCACTTAGTC
 CGCGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

152 Sj2

CACCATCAACACCCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCCATGTACATCGT
GCATTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTACATGATGAC
ATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAACCTCACTTAGTC
CACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

153 Sj3

CACCATCAACACCCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCCATGTACGTCGT
GCATTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTACATGATGAC
ATAACTTCAAATAACTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAACCTCACTTAGTC
CACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

154 Sj4

CACCATCAACACCCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATGTACATCG
TGCATTGATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAACACTATAACTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

155 Sj5

CACCATCAACACCCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATGTACATCG
TGCATTGATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAACACTATAACTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

156 Sj6

CACCATCAACACCCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATGTACATCG
TGCATTGATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAACACTATAACTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

157 Sj7

CACCATCAACACCCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATGTACATCG
TGCATTGATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

158 Sj8

CACCATCAACACCCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATGTACATCG
TGCATTGATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

159 Sj9

CACCATCAACACCCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATGTACGTCG
TGCATTGATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

160 Sj10

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTTCCCCTATGTACATCG
TGCATTGATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

161 Sj11

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTTCCCCTATGTACATCG
TGCATTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

162 Sj12

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTTCCCCTATGTACATCG
TGCATTGATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAACACTATAACTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

163 Sj13

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTACCACCATAGTATCTTTTTTTCCCCTATGTACGTGCGT
GCATTAGTGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGAC
ATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGACACAAATGTAACCTCCTTAGTC
CACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

164 Sj14

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTTCCCCTATGTACATCG
TGCATTGATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

165 Sj15

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTTCCCCTATGTACATCG
TGCATTGATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

166 Sj16

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTTCCCCTATGTACATCG
TGCATTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAATTTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

167 Sj17

CACCATCAACACCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTTCCCCCATGTACATCG
TGCATTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTTCAAATAACTTGACTCAAATACTATGACTTCTTGATACAAATGTAACCTCCTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

168 Sj18

CACCATCAACACCCAAAGCTGATATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCCATGTACATCG
TGCATTAATGGTTTGTCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTCAAATAAATTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAACCTCACTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

169 Sj19

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTACCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATGTACGTCGT
GCATTAGTGGTTTGTCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGAC
ATAACTTCAAATAAATTGACTCAAATACTATAACTTCTTGACACAAATGTAACCTCACTTAGTC
CACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

170 Sj20

CACCATCAACACCCAAAGCTGACATTCTAATTAAACTATTCCCTGACATGATTAAACTCCCCA
CATTATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATGTACGTCG
TGCATTGATGGTTTGTCCCATGCATATAAGCATGTACATATCATGATTGATTTTACATGATGA
CATAACTCAAATAAATTGACTCAAATACTATAACTTCTTGATACAAATGTAATTCACCTTAGT
CCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAAACCAGCAACCCTTGTGAAAAGTGTACCTC

ANEXO III.

JUSTIFICACIÓN DE LA AGRUPACIÓN DE LAS ISLAS

De acuerdo a los resultados de las comparaciones pareadas de F_{st} y Φ_{st} entre las 11 loberas (Cuadro IIIa), se agruparon aquellas islas (o loberas) en las que el valor de P , en alguno de los dos índices (F_{st} , Φ_{st}), no fuera estadísticamente significativo bajo la hipótesis nula de panmixia ($P < 0.05$, en donde se considera que la población está estructurada). En este caso se puede observar que las islas que bajo este criterio permanecen agrupadas, generalmente también presentan una mayor cercanía geográfica. En el Cuadro IIIa, se pueden distinguir fácilmente los grupos, donde las loberas están colocadas de acuerdo a su ubicación geográfica; desde el norte de la costa occidental de la península, hacia el sur, seguido de la parte sur del golfo y hasta el norte del golfo.

El único resultado que no cumple el criterio de agrupación propuesto, es la comparación entre Coronados y San Jorge (marcado con líneas diagonales en el Cuadro IIIa), ya que para ambos índices los resultados fueron no significativos. Sin embargo, al agrupar a San Jorge con el resto de los integrantes del grupo del Pacífico (desde Coronados hasta Margarita), el resultado fue significativo ($P_{F_{st}} = 0.001$; $P_{\Phi_{st}} = 0.001$). Por lo tanto, se mantuvieron separados. Además, el agruparlos no tendría significado biológico, porque se encuentran en los extremos de la distribución. Es poco probable que la ausencia de diferenciación entre estas loberas, se deba a la migración de hembras entre las mismas, debido a los resultados significativos entre San Jorge y las ocho islas (Granito, Cantiles, Esteban, Los Islotes, Margarita, Asunción, Cedros y Benitos), localizadas geográficamente antes de Coronados.

El resultado no significativo entre Coronados y San Jorge, puede deberse a la falta de potencia en los estimadores, debido a un tamaño de muestra pequeño o a eventos históricos; ambas hipótesis se tratan en la discusión.

El resultado de las comparaciones pareadas, donde alguno de los dos índices no resultó significativo, están marcados con gris en el Cuadro IIIa. Estas diferencias en la significancia pueden deberse a diferencias en la forma de calcular los índices, que se tratan en la discusión. Sin embargo, para justificar el criterio de agrupación de las islas, se probaron otras posibilidades en la asignación de grupos.

Debido a que Los Islotes resultó no significativo para el índice Φ_{st} , tanto con Coronados como con Asunción (Cuadro IIIa, marcados en gris), podría incluirse en el grupo Pacífico; pero el cálculo resultó significativo (Cuadro IIIc). De la misma forma, Isla Lobos podría incluirse en el grupo Pacífico, debido al resultado de la comparación con Coronados (Cuadro IIIa, marcados en gris); pero el cálculo resultó significativo ($P_{Fst} = 0.001$; $P_{\Phi_{st}} = 0.002$). También San Jorge podría incluirse en el grupo Pacífico, debido al resultado de la comparación con Asunción (resultado no significativo para el índice Φ_{st} ; Cuadro IIIa, marcado en gris), pero el resultado fue significativo ($P_{Fst} = 0.001$; $P_{\Phi_{st}} = 0.001$, Cuadro 8).

San Jorge también podría incluirse en el grupo del Golfo (todas las islas del golfo, excepto Los Islotes), por el resultado de la comparación con Esteban y Granito (Cuadro IIIa). Sin embargo, el resultado fue significativo ($P_{Fst} = 0.006$; $P_{\Phi_{st}} = 0.043$), cuando se probó esta posibilidad (Cuadro IIIb).

Cuadro IIIa. Valores de F_{st} y Φ_{st} en comparaciones pareadas entre las 11 loberas (cuadrante inferior), y sus valores correspondientes de P (cuadrante superior), los cuales se calcularon por medio de 16,000 permutaciones al azar. Los valores significativos ($P < 0.05$), bajo la hipótesis nula de panmixia (no estructura), están marcados en negritas. Nótese que el orden de las loberas corresponde con su distancia geográfica.

	Coronados	Benitos	Cedros	Asunción	Margarita	Islotes	Esteban	Cantiles	Granito	Lobos	San Jorge
Coronados	Fst Φ_{ST}	P 0.092 P 0.084	P 0.315 P 0.290	P 0.550 P 0.746	P 0.205 P 0.313	P 0.007 P 0.165	P 0.000 P 0.018	P 0.000 P 0.016	P 0.000 P 0.042	P 0.008 P 0.050	P 0.090 P 0.226
Benitos	0.0652 0.0905		P 0.647 P 0.598	P 0.716 P 0.231	P 0.792 P 0.540	P 0.004 P 0.007	P 0.000 P 0.000	P 0.000 P 0.000	P 0.000 P 0.000	P 0.000 P 0.005	P 0.000 P 0.001
Cedros	0.0086 0.0147	-0.0198 -0.0255		P 0.948 P 0.727	P 0.744 P 0.880	P 0.001 P 0.022	P 0.000 P 0.001	P 0.000 P 0.001	P 0.000 P 0.004	P 0.002 P 0.013	P 0.009 P 0.008
Asunción	-0.0191 -0.0472	-0.0272 0.0245	-0.0392 -0.0366		P 0.813 P 0.776	P 0.019 P 0.124	P 0.000 P 0.005	P 0.000 P 0.003	P 0.000 P 0.017	P 0.007 P 0.030	P 0.040 P 0.068
Margarita	0.0299 0.0102	-0.0809 -0.0224	-0.0286 -0.0464	-0.0848 -0.0429		P 0.096 P 0.063	P 0.000 P 0.000	P 0.000 P 0.000	P 0.005 P 0.004	P 0.003 P 0.013	P 0.010 P 0.010
Islotes	0.1510 0.0461	0.1433 0.2035	0.1498 0.1299	0.1034 0.0549	0.1887 0.0924		P 0.001 P 0.000	P 0.003 P 0.000	P 0.023 P 0.007	P 0.004 P 0.001	P 0.006 P 0.037
Esteban	0.1715 0.1289	0.1849 0.3086	0.1418 0.2266	0.1486 0.1638	0.1410 0.2373	0.1790 0.2256		P 0.336 P 0.577	P 0.374 P 0.240	P 0.170 P 0.069	P 0.008 P 0.053
Cantiles	0.1456 0.1527	0.1655 0.2944	0.1292 0.2359	0.1275 0.1857	0.1180 0.2377	0.1483 0.2594	0.0099 -0.0198		P 0.145 P 0.118	P 0.514 P 0.309	P 0.025 P 0.030
Granito	0.1612 0.0957	0.1673 0.2543	0.1359 0.1796	0.1286 0.1186	0.1025 0.1702	0.0921 0.1452	0.0034 0.0214	0.0388 0.0550		P 0.140 P 0.157	P 0.019 P 0.375
Lobos	0.0876 0.0860	0.1214 0.1505	0.0848 0.1102	0.0747 0.0911	0.0757 0.1093	0.1126 0.1762	0.0269 0.0714	0.0056 0.0132	0.0290 0.0399		P 0.330 P 0.103
San Jorge	0.0390 0.0191	0.1247 0.2123	0.0701 0.1239	0.0513 0.0585	0.0711 0.1236	0.1001 0.0759	0.0811 0.0634	0.0633 0.0999	0.0696 0.0030	0.0082 0.0502	

Otro problema a resolver es el caso de Isla Lobos, donde no se encontró diferencia con San Jorge ni con el resto de las loberas del Golfo Centro (Esteban, Cantiles, Granito); en el Cuadro IIIa está marcado con líneas verticales. Un análisis posterior muestra resultados similares cuando Isla Lobos se agrupa con San Jorge, o con el resto de las loberas del Golfo Centro (Cuadro IIIb). Por lo tanto, Isla Lobos podría incluirse en los dos grupos; sin embargo, se optó por colocarlo en el grupo Golfo Centro, por las siguientes razones:

- 1) Desde el punto de vista biológico, existe mayor probabilidad de que Isla Lobos se encuentre más relacionada con las loberas del Golfo Centro, dada la cercanía geográfica (ver Figura 2). Además, existen evidencias de una estructura trófica (ver Discusión), donde se encontró una similitud en la composición alimentaria entre Isla Lobos, Granito y Cantiles (García-Rodríguez, 1999). Dicha estructura trófica está sustentada en diferencias oceanográficas en las zonas.
- 2) Desde el punto de vista genético, debido a que no se detectó una estructura entre Isla Lobos y el grupo Golfo Centro (Cuadro IIIb), pero sí al agruparlo con San Jorge (Cuadro IIIb), es probable que la gran diferencia entre San Jorge y Golfo Centro, sea lo que de cómo resultado una diferencia significativa. Por lo tanto, se justifica la permanencia de Isla San Jorge como un grupo aislado del Golfo Centro.

Cuadro IIIb. Valores de F_{st} y Φ_{st} , con sus valores de P correspondientes; cuando se agrupa Isla Lobos con San Jorge o con las loberas del Golfo Centro (Esteban, Cantiles, Granito). Los valores de P se calcularon por medio de 16,000 permutaciones al azar. Los valores significativos ($P < 0.05$), bajo la hipótesis nula de panmixia (no estructura), están marcados en negritas.

Comparaciones	Índices	Valores de P
San Jorge + Lobos vs. Granito + Cantiles + Esteban	$F_{st} = 0.0430$ $\Phi_{st} = 0.0330$	$P = 0.004$ $P = 0.044$
San Jorge vs. Lobos + Granito + Cantiles + Esteban	$F_{st} = 0.0491$ $\Phi_{st} = 0.0427$	$P = 0.006$ $P = 0.043$
Lobos vs. Granito + Cantiles + Esteban	$F_{st} = 0.0155$ $\Phi_{st} = 0.0482$	$P = 0.188$ $P = 0.063$

Un caso similar a isla Lobos, es isla Margarita; ésta no es estadísticamente diferente al resto de las islas del Pacífico (Coronados, Benitos, Cedros, Asunción), pero tampoco se detectó diferencia con Los Islotes (Cuadro IIIa, líneas horizontales). Por lo tanto, Margarita se puede agrupar tanto con Los Islotes, como con las loberas del resto del Pacífico. Sin embargo, cuando se compararon Los Islotes vs. el Pacífico (Cuadro IIIc), se encontró una estructura estadísticamente significativa, y cuando se compararon Los Islotes + Margarita vs. el resto del Pacífico, uno de los dos índices no detectó estructura ($\Phi_{st} = 0.0195$, $P = 0.14004$, Cuadro IIIc). La no detección de estructura entre Margarita y el resto de las loberas del Pacífico, con valores de P no significativos (Cuadro IIIc), puede ser la causa de que no se detecte estructura en el índice Φ_{st} , cuando Margarita se agrupa con Los Islotes (Cuadro IIIc). Por lo tanto, la menor estructura entre Margarita y el resto del Pacífico, que entre Margarita y Los Islotes (Cuadro IIIc), justifica que se incluya a Margarita con el resto de las loberas del Pacífico y Los Islotes permanezca como otro grupo separado. Desde el punto de vista biológico, la posible explicación del aislamiento de Los Islotes está relacionado con un alto nivel de filopatria de hembras y machos (ver Discusión) y una diversidad genética baja, comparado con el resto de las loberas (ver Resultados).

Cuadro IIIc. Valores de F_{st} y Φ_{st} , con sus valores de P correspondientes; cuando isla Margarita se compara de diferentes formas. Los valores de P se calcularon por medio de 16,000 permutaciones al azar. Los valores significativos ($P < 0.05$), bajo la hipótesis nula de panmixia (no estructura), están marcados en negritas.

Comparaciones	Indices	Valores de P
Los Islotes + Margarita vs. Coronados + Benitos + Cedros + Asunción	$F_{st} = 0.0525$ $\Phi_{st} = 0.0195$	$P = 0.004$ $P = 0.140$
Los Islotes vs. Margarita + Coronados + Benitos + Cedros + Asunción	$F_{st} = 0.1210$ $\Phi_{st} = 0.0950$	$P = 0.000$ $P = 0.015$
Margarita vs. Coronados + Benitos + Cedros + Asunción	$F_{st} = -0.0142$ $\Phi_{st} = -0.0301$	$P = 0.659$ $P = 0.866$
Margarita vs. Los Islotes	$F_{st} = 0.0557$ $\Phi_{st} = 0.0924$	$P = 0.096$ $P = 0.063$

Con base en lo anterior, los grupos son:

1. Pacífico: Coronados, Cedros, Benitos, Asunción y Margarita.
2. Golfo Sur: Los Islotes.
3. Golfo Centro: Esteban, Cantiles, Granito y Lobos.
4. Golfo Norte: San Jorge.

Para corroborar la formación de los grupos, se utilizó el programa BoundaryRank (Martien, 2000; Martien y Taylor, en revisión). Dicho programa utiliza datos de secuencias de mtDNA para jerarquizar los posibles límites de diferentes localidades de donde provienen las muestras, a partir de la probabilidad de que exista flujo génico. El análisis jerárquico de cúmulos se realiza con base en similitudes genéticas y para ello se utilizan los valores P de la prueba de permutación de χ^2 (Roff y Bentzen, 1989), como medida de similitud genética entre un par de unidades putativas. El valor de P representa la probabilidad de obtener un valor mayor o igual que el valor observado de χ^2 , si las muestras de dos localidades diferentes provienen de la misma población. Por lo tanto, el valor de P es en realidad una medida de la similitud genética. La principal suposición de este método es que existe aislamiento por distancia

geográfica. No supone una dispersión igual a lo largo de la distribución o que las poblaciones o grupos sean iguales en abundancia (Martien, 2000; Martien y Taylor, en revisión).

El análisis se inicia al definir cada sitio de recolecta como una unidad hipotética y coloca límites entre cada par de unidades adyacentes. Los límites se eliminan uno por uno comenzando con el límite menos probable. En cada paso se calcula el grado de similitud genética entre todas las unidades remanentes. Por ello dicho valor disminuirá a medida que las unidades con mayor similitud genética se agrupan. El resultado de dicho análisis se presenta a continuación con un grado de similitud final de 0.002, donde los paréntesis representan el orden de agrupación:

1. (Coronados, ((Benitos, (Cedros, Asunción)), Margarita))
2. Los Islotes
3. ((Esteban, (Cantiles, Lobos)), Granito)
4. San Jorge