

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Programa de Posgrado en Ciencias
de la Vida con orientación en Biología Ambiental**

**Diversidad de *Branchinecta* (Branchipoda: Anostraca) en las
pozas temporales del norte de Baja California**

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Nayeli Escudero Castelán

Ensenada, Baja California, México

2015

Tesis defendida por

Nayeli Escudero Castelán

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. María Clara Arteaga Uribe
Director del Comité

Dra. Fabiola Lafarga de la Cruz

Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez



Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Coordinador del Programa de Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Rufina Hernández Martínez
Director de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta Nayeli Escudero Castelán como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en de la Vida con orientación en Biología Ambiental.

Diversidad de *Branchinecta* (Branchipoda: Anostraca) en las pozas temporales del norte de Baja California

Resumen aprobado por:

Dra. María Clara Arteaga Uribe

Director de Tesis

Las pozas vernaless de la región mediterránea son sistemas aislados que pueden estudiarse dentro del marco de la biogeografía de islas. La dinámica de sus poblaciones y la diversidad biológica que albergan las convierten en sistemas importantes para evaluar preguntas evolutivas y dedicar esfuerzos de conservación. Dentro de los residentes de las pozas vernaless se encuentran los crustáceos del orden Anostraca, quienes producen quistes de resistencia que les permite soportar temporadas de altas temperaturas y sequías. Su dispersión es mediada por vectores y puede llegar a ser muy restringida. Particularmente *Branchinecta sandiegonensis*, es uno de los habitantes endémicos de la región. El objetivo fue caracterizar la diversidad taxonómica y describir la variación morfológica del género *Branchinecta* en las pozas temporales, además evaluar la conectividad y diversidad genética de la especie endémica *B. sandiegonensis* en la región norte de Baja California. Se hicieron muestreos en 36 pozas de las Mesas Jesús María, El Descanso, La Misión y Colonet, y en los Valles Las Palmas y de Guadalupe. Se identificaron las especies usando claves taxonómicas y se tomaron medidas de varias longitudes del cuerpo de cada individuo. Se hizo extracción de ADN de 10 individuos por poza de *B. sandiegonensis* y se amplificaron cinco microsátélites nucleares y el gen de Citocromo Oxidasa I (COI). Se evaluó la diversidad y estructura genética en tres escalas geográficas (macro, meso y microescala). Se encontraron 260 individuos de *B. sandiegonensis* y 70 de *B. lindahli*. No se observó diferenciación morfológica dentro de cada especie en el intervalo de distribución geográfica del norte de la península. Con relación a la caracterización genética se encontró un patrón de diversidad genética baja en general, con mayores niveles de variación a nivel regional que local. Se encontró una fuerte estructuración genética a nivel macroescala con un aislamiento por distancia. Sin embargo, a meso y microescala hubo poca diferenciación genética entre las pozas. Estos resultados sugieren que a nivel regional hay flujo genético restringido, mientras que a nivel local existe un alto grado de conectividad genética entre mesas y pozas. Se encontró un solo linaje mitocondrial y una baja diversidad haplotípica y nucleotídica, así como haplotipos únicos restringidos a una región geográfica. El cambio acelerado en el uso del suelo en la región norte de Baja California, pone en riesgo la diversidad genética y morfológica de estas especies, que ya presentan niveles bajos y puede llevarse a la extinción local de las poblaciones. Se requieren esfuerzos de conservación que permitan preservar las pozas y las especies que las habitan.

Palabras Clave: ***B. lindahli*, *B. sandiegonensis*, estructura genética, linaje mitocondrial, variación morfológica.**

Abstract of the thesis presented by Nayeli Escudero Castelán as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Master in Life Sciences.

Diversity of *Branchinecta* (Branchiopoda: Anostraca) in the vernal pools from north of Baja California

Abstract by:

Dra. María Clara Arteaga Uribe

Thesis Director

Vernal pools of the Mediterranean region are isolated systems that can be studied through the island biogeography theory. The dynamics of their population and biodiversity make them important systems to evaluate evolutionary questions and devote conservation efforts. Among the residents of the vernal pools, the Anostraca one of the order of crustaceans is found, they produce resistant cysts to support high temperatures and dry seasons. Vectors mediate their dispersion and it can be quite restricted. Particularly *Branchinecta sandiegonensis* is one of the endemic residents of the region. The objective was to characterize taxonomic diversity and describe the morphological variation of the *Branchinecta* gender in the vernal pools, in addition, it was evaluated the genetic connectivity and diversity of *B. sandiegonensis* in the north of Baja California. Samples were taken from 36 pools from Jesús María, El Descanso, La Misión and Colonet Mesas, and Las Palmas and Guadalupe Valleys. The species were identified using taxonomic keys for the order and measure several body lengths were taken of each individual. DNA extraction was carried out in 10 individuals for each pool for *B. sandiegonensis* and five nuclear microsatellites and COI gen were amplified. Genetic diversity and structure were evaluated in three geographic scales (macroscale, mesoscale, and microscale). It was found 260 individuals of *B. sandiegonensis* and 70 of *B. lindahli*. Morphologic variation was not observed into each species for the geographic distribution range in the north peninsula. In general, as for the genetic characterization, a low genetic diversity pattern was found with higher variation in the regional level than in the local one. A strong genetic structure was found in macroscale isolated by distance. Nevertheless, in meso and microscale there was low genetic differentiation among pools. These results suggest that there is restricted genetic flux in the regional level, while in the local one exists a high degree of genetic connectivity between Mesas and pools. One mitochondrial lineage was found and low haplotype and nucleotide diversity, as well as unique restricted haplotypes to a geographic region. The accelerated changes in the use of lands in the north region of Baja California, puts in risk the genetic and morphologic diversity of these species, that already exhibit low levels and may lead to extinction of the local population. Conservation efforts are required to permit the preservation of the pools and the species that inhabit them.

Keywords: *B. lindahli*, *B. sandiegonensis*, genetic structure, mitochondrial lineage, morphological variation.

Dedicatoria

A la vida...

A mi ángel guardián...

A mi papá...

A mis hermanos...

Agradecimientos

A mi papá y a mis hermanos por creer en mi y apoyarme en todo momento. A mi mejor amiga Nelly por estar allí escuchándome.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por brindarme el apoyo económico para realizar mis estudios de maestría.

A Jiji Foundation por el patrocinio a este proyecto y al Dr. Matt Guilliams por su colaboración en este trabajo.

A mi directora de tesis la Dra. María Clara Arteaga Uribe por su ayuda en la elaboración de este documento, así como el apoyo brindado durante estos dos años. A mis sinodales la Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez y la Dra. Fabiola Lafarga de la Cruz, por sus consejos y su tiempo.

Al biólogo Mario Salazar Ceseña por su ayuda y compañía en las salidas a campo. Al Dr. Stephen Bullock y a todos los profesores de biología ambiental que me dieron clases. Al Dr. Andrew Bohonak y su estudiante Natalie Goddard por su hospitalidad y apoyo en el laboratorio.

A los dueños y cuidadores de los ranchos que permitieron la toma de muestras: Rancho Chichihuas Sr. José Olvera, Jason Olvera; Rancho Los Hornos Sr. Guadalupe Silva; al Comisario Ejdal, Sra. Kesia Palacios; Rancho Lomas Pelonas Sr. Miguel; Rancho de Tenora Sr. Alfonso Israel López, Sr. Nicolás “El Pisto” González; Sr. José Luis Olveros; Rancho Jatay Sr. Rodolfo Rosas y Sr. Alberto Aguilera.

A mis compañeros de generación de ciencias de la vida, especialmente a las chicas de biología ambiental y al sr. Cueva, a mis compañeros de laboratorio Astrid y Leo.

Tabla de contenido

Página

Resumen en español	iii
Resumen en inglés	iv
Dedicatoria	v
Agradecimientos	vi
Lista de figuras	ix
Lista de tablas	x
1. Introducción	1
1.1. Marco teórico	2
1.1.1. Biodiversidad y evolución	2
1.1.2. Ecología molecular y filogeografía	3
1.1.3. Pozas vernaless	5
1.1.4. Anostraca	6
1.1.4.1. <i>Branchinecta sandiegonensis</i> Fugate, 1993	7
1.1.4.2. <i>Branchinecta lindahli</i> Packard, 1883	8
1.2. Justificación	8
1.3. Antecedentes	9
1.3.1. Estudios de taxonomía y riqueza de especies del género <i>Branchinecta</i>	9
1.3.2. Estudios basados en marcadores genéticos para el género <i>Branchinecta</i>	10
1.4. Hipótesis	10
1.5. Objetivos	11
2. Materiales y métodos	12
2.1. Área de estudio	12
2.2. Obtención de muestras	14
2.3. Identificación taxonómica, riqueza de especies y análisis morfológicos	15
2.4. Extracción de ADN y amplificación de marcadores moleculares	17
2.4.1. Análisis de diversidad y estructura genética de <i>B. sandiegonensis</i>	19
2.4.1.1. Marcadores nucleares	20
2.4.1.2. Marcador mitocondrial	21
3. Resultados	22
3.1. Identificación taxonómica	22
3.2. Análisis de datos morfológicos	23
3.2.1. <i>Branchinecta lindahli</i>	23
3.2.2. <i>Branchinecta sandiegonensis</i>	24
3.3. Análisis moleculares	25
3.3.1. Análisis de diversidad genética. Microsatélites	25
3.3.1.1. Diversidad por poza	25

Tabla de contenido (continuación)

3.3.1.2.	Diversidad regional	26
3.3.1.3.	Diversidad en la región sur de la distribución de <i>B. sandiegonensis</i>	26
3.3.2.	Análisis de diversidad genética. Citocromo Oxidasa I	27
3.3.3.	Análisis de estructura genética. Microsatélites	27
3.3.3.1.	Macroescala	27
3.3.3.2.	Mesoescala	29
3.3.3.3.	Microescala	31
3.3.4.	Análisis de estructura genética. Citocromo Oxidasa I	32
4.	Discusiones	35
4.1.	Taxonomía y riqueza de especies	35
4.2.	Análisis de datos morfológicos	38
4.3.	Diversidad genética de <i>B. sandiegonensis</i>	38
4.4.	Estructura genética de <i>B. sandiegonensis</i>	41
4.5.	Citocromo Oxidasa I	43
5.	Conclusiones	45
	Lista de referencias bibliográficas	47
A.	Base de datos Microsatélites	55
B.	Secuencias COI	59

Lista de figuras

Figura		Página
1.	Pozas vernaes estudiadas en el Norte de la península de Baja California. .	13
2.	Longitudes tomadas para cada individuo para todas las especies.	15
3.	Características morfológicas en adultos de <i>B. lindahli</i>	16
4.	Características morfológicas de <i>B. sandiegonensis</i>	17
5.	Escalas para los análisis de diversidad y estructura genética.	19
6.	Especies de Anostracos encontrados.	22
7.	Localización de las especies en las pozas vernaes.	23
8.	Análisis de Componentes Principales de los datos morfológicos para ambas especies.	24
9.	Estructura de <i>B. sandiegonensis</i> a macroescala.	28
10.	Estructura de <i>B. sandiegonensis</i> a mesoescala.	30
11.	Estructura de <i>B. sandiegonensis</i> a microescala.	31
12.	Árbol de agrupamiento de los individuos de <i>B. sandiegonensis</i> secuenciados para Baja California y dos haplotipos de diferentes linajes de la especie.	33
13.	Red de haplotipos a escala región de <i>B. sandiegonensis</i> en Baja California.	34
14.	Red de haplotipos de <i>B. sandiegonensis</i> en Baja California con el clado A de San Diego.	34
15.	Registros geográficos de las dos especies en este trabajo y otros autores. .	36

Lista de tablas

Tabla		Página
1.	Ubicación geográfica y nomenclatura de las pozas con agua muestreadas para cada región.	12
2.	Loci microsatelitales nucleares caracterizados para <i>B. sandiegonensis</i> . Modificado de Andrews <i>et al.</i> (2013).	18
3.	Lista de los programas utilizados para los análisis genéticos.	21
4.	Diversidad genética por poza de <i>B. sandiegonensis</i>	26
5.	Diversidad genética regional de <i>B. sandiegonensis</i>	27
6.	AMOVA jerárquico a macroescala de <i>B. sandiegonensis</i> entre dos grupos.	28
7.	AMOVA jerárquico a mesoescala de <i>B. sandiegonensis</i> entre tres grupos.	30
8.	AMOVA jerárquico a microescala de <i>B. sandiegonensis</i> entre tres grupos.	32

Capítulo 1. Introducción

El planeta que habitamos alberga una amplia biodiversidad, entendiendo este concepto como la integración de toda la variabilidad biológica en diferentes escalas: genes, especies, ecosistemas y paisajes (Walker, 1992). Esa heterogeneidad biológica, es resultado de fuerzas evolutivas que influyen sobre la variación genética disponible en determinado momento y lugar, resultando a corto plazo en un patrón de estructura genética entre poblaciones y a largo plazo en eventos de especiación (Begon *et al.*, 2006). De manera que entre más grande sea la escala el sistema se hace más complejo en sus interacciones y a su vez mantienen su funcionamiento y equilibrio dentro de su ambiente dinámico (Loreau *et al.*, 2001).

La pérdida de biodiversidad incluye todos los cambios que llevan a la reducción o simplificación de la heterogeneidad biológica desde individuos hasta regiones resultando en la pérdida de especies y en la alteración de los ecosistemas que habitan (Walker, 1992). Para entender a las fuerzas evolutivas y la diversidad biológica que observamos surgen disciplinas como la ecología molecular que da los elementos para realizar estudios comparativos y de esta manera entender la evolución de las adaptaciones y la morfología (Eguiarte y Souza, 2007), así como también teorías que permiten explicar los patrones de diversidad que se observan, tal es el caso de la teoría de biogeografía de Islas (MacArthur y Wilson, 1963, 1967). La biogeografía de Islas explica qué factores juegan un papel crucial en el equilibrio ecológico de las islas y por extensión de los sistemas aislados (Losos y Ricklefs, 2010); como es el caso de las pozas vernaless presentes en California, EUA y el norte de Baja California, México (Baskin, 1994). Estos ecosistemas albergan una alta riqueza de especies, entre las que se encuentran los crustáceos del género *Branchinecta* (Simovich, 1996).

El camarón *Branchinecta sandiegonensis* habita estas pozas y sirve de alimento para aves y anfibios. Lamentablemente la expansión humana ha comprometido varios de los sitios donde se forman las pozas, esto debido a prácticas de agricultura, ganadería, tránsito vehicular y asentamientos humanos, lo que contribuye a la fragmentación y deterioro del hábitat (Simovich *et al.*, 2013).

1.1. Marco teórico

1.1.1. Biodiversidad y evolución

La biodiversidad o diversidad biológica engloba todos los niveles de variación natural, desde los moleculares y genéticos (Huston y Huston, 1994) que incluyen la variación genética dentro y entre especies, hasta comunidades y paisajes. Intraespecíficamente esta variación está distribuida dentro y entre poblaciones, así como dentro y entre individuos de una población (Domínguez-Domínguez y Vázquez-Domínguez, 2009). Continuando con el nivel de especie, que a su vez va creando los patrones de la naturaleza hasta llegar al nivel de paisaje (Huston y Huston, 1994). La diversidad genética es necesaria para que las poblaciones evolucionen y se adapten; en resumen la diversidad genética refleja el potencial evolutivo de las poblaciones (Frankham *et al.*, 2002).

Se considera como evolución a todos aquellos cambios que suceden en el material genético y que son heredados de una generación a la siguiente (Futuyma, 2005). La evolución abarca desde pequeños cambios en las proporciones de las variantes de un gen (alelos) dentro de una población, hasta las alteraciones que conducen a la diversificación de las especies (Futuyma, 2005). Los mecanismos que moldean la diversidad genética de las especies, son la mutación, deriva génica, flujo génico, endogamia y selección natural (Begon *et al.*, 2006).

La mutación es el mecanismo que lleva a la acumulación de variación sobre la que actuarán las demás fuerzas evolutivas (Futuyma, 2005). Entretanto la selección natural y la deriva génica son los mecanismos más importantes que causan el cambio en las frecuencias alélicas de las poblaciones (Futuyma, 2005; Eguiarte y Souza, 2007). Por un lado la selección natural resulta en adaptaciones, que se definen como características que dan una ventaja de supervivencia a los portadores en determinadas circunstancias (Begon *et al.*, 2006). Mientras que la deriva génica es un cambio al azar en las frecuencias alélicas de generación en generación debida a un error de muestreo, es un proceso estocástico el cual es imposible de predecir ya que es afectado por elementos aleatorios (Allendorf y Luikart, 2009).

La deriva génica ocurre en todas las poblaciones naturales y a diferencia de la selección natural, no resulta en adaptaciones, pero sí juega un papel importante en la evolución de los organismos a nivel genético, ya que por un lado es responsable en gran parte de las diferencias entre secuencias de ADN de las especies (Futuyma, 2005) y por otro lado se espera que cause la pérdida de diversidad genética principalmente en poblaciones de menor tamaño (Allendorf y Luikart, 2009).

El resultado de la selección natural y la deriva, se refleja en la estructura genética entre las poblaciones (Allendorf y Luikart, 2009). Entre tanto, el flujo genético, por medio del cual hay movimiento de genes de una población a otra, promueve la homogeneización genética de las poblaciones de la misma especie y las mantiene integradas (Aguirre-Planter, 2007). La interacción de las diferentes fuerzas evolutivas resulta en los niveles de diversidad y estructura genética que se observan actualmente en las poblaciones (Begon *et al.*, 2006).

Para estimar dicha diversidad genética, se utilizan marcadores moleculares, y dependiendo del tipo de marcador se infieren historias diferentes, ya que hay marcadores heredados por vía uniparental (mtADN, cpADN) y aquellos heredados biparentalmente (nucADN). La ecología molecular y filogeografía se encargan de proveer herramientas y bases teóricas para entender las interacciones entre mecanismos evolutivos que resultan en los patrones de diversidad que estimamos en la naturaleza (Eguiarte y Souza, 2007; Allendorf y Luikart, 2009; Losos y Ricklefs, 2010).

1.1.2. Ecología molecular y filogeografía

La ecología molecular es una rama de la ecología donde se usan herramientas moleculares para abordar preguntas ecológicas como lo son la definición y delimitación de las poblaciones y especies, el análisis de poblaciones híbridas, conocer cuáles fueron las especies que dieron origen a las especies actuales y dar elementos para entender y comparar la evolución de las adaptaciones y la morfología (Eguiarte y Souza, 2007). La ecología molecular a nivel de poblaciones provee las herramientas para definir a las poblaciones, conocer su historia y parámetros evolutivos (Eguiarte y Souza, 2007). Las herramientas moleculares que son utilizadas principalmente son los marcadores mole-

culares. Un marcador molecular es un simple carácter (locus) heredado con múltiples variantes (alelos), que refleja diferencias en las secuencias de ADN (Sunnucks, 2000). Los marcadores pueden ser del tipo dominante o codominante y se espera que sean polimórficos (Rentería-Alcántara, 2007). El polimorfismo genético se define como la ocurrencia simultánea de dos o más variantes discontinuas o genotipos de una característica o gen en la misma población (Kumar *et al.*, 2009).

Dentro de los marcadores nucleares tenemos a los microsatélites que son repeticiones en tándem muy cortas de nucleótidos (1-6 bases) (Queller *et al.*, 1993). Constituyen una alta fracción del ADN no codificante y son relativamente raros en regiones que codifican para proteínas (Li *et al.*, 2002). Son considerados como marcadores ideales ya que son fáciles de usar, son del tipo codominante y tienen una alta variación (Queller *et al.*, 1993). Estos marcadores han sido ampliamente usados principalmente para estudios de variación genética intra e interespecífica y análisis de linajes (Olsen y Schaal, 2001; Magalon *et al.*, 2005; Ivors *et al.*, 2006).

Sin embargo, aunque los marcadores moleculares nos permiten dilucidar las historias evolutivas de las poblaciones, esto no podría suceder sin el soporte teórico detrás sustentado por la genética de poblaciones (Rentería-Alcántara, 2007), que combinado con la biogeografía dan lugar a la filogeografía (Bermingham y Moritz, 1998). La filogeografía es una disciplina que estudia los principios y procesos que gobiernan la distribución geográfica de los linajes genealógicos, especialmente aquellos dentro y entre especies cercanamente relacionadas (Avise, 2000). Esta disciplina se ha utilizado ampliamente para explicar los patrones históricos y evolutivos entre las poblaciones, así como para hacer inferencia de los procesos demográficos históricos (Avise, 2000). Tiene dos vertientes de enfoque, la primera está relacionada con la taxonomía y sistemática, y es usada para obtener información acerca de las fronteras y límites entre especies o poblaciones. La segunda se enfoca en la identificación de linajes evolutivos y unidades evolutivas significativas (Domínguez-Domínguez y Vázquez-Domínguez, 2009).

Los linajes genealógicos son evaluados usando secuencias de genes del núcleo, del cloroplasto y la mitocondria, dentro de estos últimos están Citocromo Oxidasa I, II, B y la

región control (Morrone y Llorente-Bousquets, 2003). Usando algoritmos de parsimonia o máxima verosimilitud se construyen los árboles genealógicos que después serán superpuestos en la distribución geográfica de los organismos para poder interpretar el proceso evolutivo responsable del origen de los mismos (Morrone y Llorente-Bousquets, 2003).

En conjunto tanto la genética molecular como la filogeografía aportan información que combinada con la teoría genética es utilizada por la genética de la conservación para reducir el riesgo de extinción de las especies amenazadas, además de la información necesaria para el manejo de las poblaciones (Frankham *et al.*, 2002; Allendorf y Luikart, 2009).

1.1.3. Pozas vernaies

Las pozas vernaies son humedales efímeros que Keeley y Zedler (1998) definen como: “humedales inundados por precipitación durante un periodo donde la temperatura es suficiente para que las plantas crezcan, seguido por un estado de anegación terrestre y culminando en condiciones de desecación extrema durante un tiempo extendido.” Estos humedales se observan en invierno y varían en tamaño desde unos cuantos metros a varios cientos de metros, y se encuentran desde Oregón a través del centro de California y hasta el norte de Baja California en México (Baskin, 1994).

Se ubican en las pendientes suaves de las mesas o en los valles de la parte baja de la cuenca; aunque también se encuentran de manera discontinua en las montañas y su posición depende de la microtopografía del suelo (Bauder y McMillan, 1998). Además de la variación entre el material subyacente de origen de las pozas, las propiedades del suelo, la hidrología, la topología y el clima subregional que permiten las condiciones idóneas para la formación de las pozas (Bauder y McMillan, 1998). Estas pozas se presentan típicamente formando archipiélagos separados por grandes áreas donde las condiciones no son apropiadas para su formación. Dentro de cada archipiélago, las pozas se encuentran separadas por decenas a centenas de metros (Holland y Jain, 1981). La forma y tamaño de la poza en sincronía con los factores que regulan el ciclo de llenado y secado de la misma, van a determinar la profundidad, área, volumen y duración; que estarán directamente relacionados con la cantidad de especies que puedan mantener (Ripley y

Simovich, 2008).

Las pozas vernaless como ecosistemas aislados son entendidos dentro de los principios de biogeografía de islas que consideran tres características propias de las islas, 1) la distancia entre islas, a mayor distancia menor tasa de inmigración, 2) la superficie de la isla, a mayor superficie habrá mayor tamaño poblacional y por tanto una menor tasa de extinción y, 3) la especiación que será mayor donde las tasas de inmigración y extinción son menores. Considerando esas tres características se generan cuatro escenarios, 1) islas grandes y cercanas tendrán alta inmigración y baja extinción lo que resulta en biotas altamente ricas parecidas al continente, con bajo recambio de especies y bajo endemismo, 2) islas grandes y lejanas tendrán alta especiación y bajo recambio de especies, 3) islas pequeñas y cercanas donde habrá poca biota con baja especiación y alto recambio de especies y, 4) islas pequeñas lejanas caracterizadas por bajo recambio de especies con poco endemismo y biota disminuida (Losos y Ricklefs, 2010).

1.1.4. Anostraca

Las pozas temporales son un hábitat que presenta una alta riqueza de especies, entre los que se encuentran los crustáceos, de los cuales aproximadamente la mitad son especies endémicas (Simovich, 1996). Estos crustáceos pertenecen a la clase Branchiopoda y a tres órdenes: Anostraca, Conchostraca y Notostraca. Las especies de estos grupos que habitan las pozas sobreviven a periodos prolongados de sequía y temperaturas altas, por la producción de quistes de resistencia donde los embriones permanecen en latencia (Keeley y Zedler, 1998). Cuando llueve y la charca se inunda, los quistes eclosionan y las larvas crecen a una tasa muy rápida (Keeley y Zedler, 1998).

Estos quistes se dispersan entre pozas usando vectores, como organismos grandes que se muevan entre estos ambientes (Daborn, 1976). El requerir vectores para dispersarse y depender de los eventos estocásticos de su hábitat para reproducirse los hace vulnerables, aún más considerando el deterioro de su hábitat (Pyke, 2005). Su dispersión es entonces limitada y esto restringe la conectividad y el flujo genético, provocando una alta estructura genética entre poblaciones, y a largo plazo, diferenciación (Brendonck *et al.*, 2000).

Los anostracos son crustáceos alargados, que han perdido su caparazón y que nadan constantemente sobre su espalda en la columna de agua (Brendonck *et al.*, 2007). Son un grupo muy diverso con alrededor de 300 especies de ocho familias y 26 géneros, de las cuales un cuarto de especies solo son conocidas de su localidad tipo (Belk y Brtek, 1995; Weekers, 2002).

La familia Branchinectidae cuenta con dos géneros, *Archaebranchinecta* que se registra como extinto y *Branchinecta* (Rogers, 2013) que cuenta con aproximadamente 50 especies descritas y ha sido reportado en casi todos los continentes repartidas en diferentes hábitats, excepto África y Australia (Belk y Brtek, 1995; Rogers, 2002). También se ha reportado que hay especies que habitan solamente pozas prístinas y otras que prefieren pozas con algún grado de disturbio, principalmente antropogénico (Hathaway y Simovich, 1996).

1.1.4.1. *Branchinecta sandiegonensis* Fugate, 1993

La especie se distribuye desde Santa Bárbara, California y hasta el norte de Baja California, México (Fugate, 1993). Habita pozas poco profundas (< 30 cm) (Fugate, 1993), prefiriendo aquéllas con pH neutral o ligeramente alcalino y concentraciones iónicas menores a los 100 mmol Na⁺/L (Gonzalez *et al.*, 1996; Ripley *et al.*, 2004).

Esta especie tiene un desarrollo rápido, a la cual dependiendo de la temperatura del agua le toma de siete a 15 días en madurar sexualmente (Simovich y Hathaway, 1997). Las hembras tienen la capacidad de producir cientos de quistes, los cuales presentan un comportamiento propio de especies de ambientes poco predecibles, esto es que la eclosión inicial es incompleta, pero acumulativa, ya que siguen eclosionando en subsecuentes ciclos de secado y rehidratación (Simovich y Hathaway, 1997).

Este crustáceo fue enlistado como especie en peligro desde 1997 en EUA (U. S. Fish and Wildlife Service, 2008) y, esto se debió a la pérdida de su hábitat de más del 95 % de las pozas temporales presentes en la región de California (Bauder y McMillan, 1998). Las escasas pozas que quedan han sido severamente alteradas y fragmentadas debido al uso de vehículos y al pastoreo (Simovich *et al.*, 2013).

1.1.4.2. *Branchinecta lindahli* Packard, 1883

Esta especie tiene una amplia distribución a través del oeste de EUA y hasta México en los estados de Baja California, Baja California Sur y Coahuila (Eng *et al.*, 1990; Maeda-Martínez, 1991; Maeda-Martínez *et al.*, 1997a,b, 2005). Habita en pozas de características muy diversas, desde pozas turbias hasta pozas de agua clara, en un intervalo de temperaturas de 1.5-22.2 °C con bajas condiciones de salinidad, cloro, conductividad y un pH de 6.4 a 9.8 (Eng *et al.*, 1990). Aunque se ha encontrado en pozas con características fuera de los intervalos mencionados (Eng *et al.*, 1990).

Esta especie ha sido recolectada junto a otras especies de los géneros *Branchinecta* y *Streptocephalus* en California y puede coexistir con otras especies de anostracos (Horne, 1967; Lynch, 1964; Eng *et al.*, 1990). Gran parte de su hábitat en California se ha perdido o degradado debido a la agricultura y al desarrollo urbano. Sin embargo es un crustáceo que tiene un amplio intervalo de osmorregulación que le permite habitar un amplio espectro de pozas con condiciones ambientales diversas, además se ha visto que puede hibridar con sus congéneres comprometiendo la integridad genética de las otras especies y la suya propia (Gonzalez *et al.*, 1996; Simovich *et al.*, 2013).

1.2. Justificación

Las pozas temporales ubicadas en el noroeste de Baja California son ecosistemas que se comportan como islas. Estos ecosistemas al ser temporales y aislados y depender del régimen de lluvia regional, están sujetos a la estocasticidad ambiental que los hace hábitats vulnerables y frágiles. Al mismo tiempo, los convierte en centros de especiación y divergencia de linajes, aumentando su biodiversidad y la complejidad de las relaciones biológicas dentro del microambiente que forma cada poza. Por la ubicación de las pozas, que es discontinua a lo largo de California y del norte de Baja California forma una compleja estructura de charcas cuya conectividad disminuye entre las mismas conforme aumenta la distancia entre ellas; por lo que se dificultaría el libre tránsito de los residentes de las pozas entre los archipiélagos. Entre los residentes más comunes se encuentran crustáceos de la clase Branchipoda representado por varios órdenes que han desarrollado mecanismos para sobrevivir a esas condiciones ambientales. Dentro de ese gran

grupo de crustáceos se encuentra el orden Anostraca representado por varias familias y especies que son endémicas o de distribución restringida. Es interesante conocer la riqueza de especies de los crustáceos de las pozas y el patrón de distribución que adoptan en estos ambientes frágiles y fragmentados.

Particularmente uno de los representantes del orden Anostraca es el género *Branchinecta* y específicamente *B. sandiegonensis* es un modelo importante a estudiar, esto se debe a que es una especie endémica de la región que únicamente habita pozas que no han sido alteradas. La diversidad genética de la especie solo ha sido estudiada en las poblaciones que se distribuyen al sur de California en el condado de San Diego, sin considerar el total de su intervalo de distribución, siendo aún desconocido en la zona sur, que corresponde a la península de Baja California. En California, esta especie está considerada como una especie en peligro, debido a la pérdida de los ecosistemas que habita, causada por actividades antropogénicas de expansión. En Baja California la expansión antropogénica y todas las actividades de cambio de uso de suelo que conlleva, repercute directamente en los ecosistemas y por tanto en el equilibrio de las redes tróficas de la región, así como la dinámica entre las poblaciones. En resumen, al ser *B. sandiegonensis* una especie endémica, con baja capacidad de dispersión y que ocurre en hábitats vulnerables se convierte en un buen modelo para evaluar como las fuerzas evolutivas moldean la diversidad genética de sus poblaciones. Es crucial estudiar aspectos de su historia evolutiva, como la estructuración de sus poblaciones, su diversidad genética, y el grado de conectividad a lo largo del paisaje para conocer su estado de conservación y proporcionar información para su preservación.

1.3. Antecedentes

1.3.1. Estudios de taxonomía y riqueza de especies del género *Branchinecta*

Con respecto a datos taxonómicos y de diversidad de especies, existen listas taxonómicas que incluyen a todas las especies descritas de la clase Branchiopoda o del orden Anostraca (Belk y Brtek, 1995; Rogers, 2006). Además, se han llevado a cabo trabajos de descripción taxonómica y comparación entre especies morfológicamente similares para los casos de *B. mesovallensis*, *B. dissimilis*, *B. coloradensis*, *B. oriena*, *B. sandiegonensis*

y *B. hiberna* para el estado de California (Fugate, 1993; Belk y Fugate, 2000; Rogers y Fugate, 2001; Belk y Rogers, 2002).

Por otra parte, existen trabajos comparativos sobre la diversidad específica en pozas de California para los diferentes grupos de crustáceos que las habitan (King *et al.*, 1996; Simovich, 1996; Ripley y Simovich, 2008). También se ha reportado la diversidad taxonómica del género *Branchinecta* en pozas de California (Eng *et al.*, 1990). Finalmente para México se tienen nuevos registros de varias especies del orden Anostraca (Brown *et al.*, 1993; Maeda-Martínez, 1991; Maeda-Martínez *et al.*, 1997a,b, 2005).

1.3.2. Estudios basados en marcadores genéticos para el género *Branchinecta*

Para identificar especies del género *Branchinecta* se han realizado estudios moleculares usando secuencias del gen COI (Zickovich y Bohonak, 2007; Vandergast *et al.*, 2009). Además con este marcador, se han explorado los patrones filogeográficos en las especies *B. sandiegonensis* al norte de su distribución (Bohonak, 2005) y *B. lynchi* en el centro de California y al sur de Oregón (Aguilar, 2010).

En estudios sobre diversidad y estructura genética se han utilizado marcadores de alozimas, específicamente para *B. coloradensis* de las montañas Elk en Colorado (Bohonak, 1998) y en *B. sandiegonensis* del condado de San Diego (Davies *et al.*, 1997). También se han desarrollado marcadores microsatélites para *B. sandiegonensis* y *B. lynchi* (Andrews *et al.*, 2013; Deiner *et al.*, 2013), y usando estos marcadores se realizó un estudio de genética de poblaciones en *B. sandiegonensis* en el condado de San Diego (Andrews, 2013).

1.4. Hipótesis

1. Las pozas temporales siendo ecosistemas efímeros y relativamente aislados tendrán riqueza específica diferente relacionada al tamaño de la poza, y habrán especies compartidas en relación a la distancia entre las pozas. Siendo las pozas de mayor tamaño las que se espera tengan mayor riqueza (específica y genética) y las pozas más cercanas las que compartan mayor número de especies.

2. Debido a la presencia de las pozas temporales en regiones geográficas aisladas (mesetas o valles), así como a la baja dispersión de estos crustáceos los niveles de flujo génico serán bajos entre complejos de pozas, llevando a la diferenciación morfológica.
3. Las pozas temporales son ecosistemas que pueden considerarse como islas y dada la baja capacidad de dispersión de *B. sandiegonensis* se esperará que exista una alta estructura genética en *B. sandiegonensis*.
4. La existencia de topografía accidentada y la dispersión limitada de los organismos resultan en la separación de poblaciones y por tanto contribuyen al desarrollo de linajes evolutivos independientes. Al ser el norte de la península de Baja California una zona con topografía heterogénea y *B. sandiegonensis* el tener una dispersión limitada se espera que haya linajes evolutivos de *B. sandiegonensis* diferentes en las mesetas geográficas evaluadas.

1.5. Objetivos

Analizar la diversidad y riqueza específica del género *Branchinecta*, la estructura genética y la filogeografía de *B. sandiegonensis* en las pozas temporales de Baja California.

- Determinar cuáles especies están presentes en las pozas a partir de identificación taxonómica.
- Caracterizar la riqueza específica y genética de las pozas y su relación con el tamaño de la misma; así como las especies compartidas entre pozas cercanas.
- Analizar la estructura genética para *B. sandiegonensis* en el norte de la península de Baja California.
- Evaluar la estructura filogeográfica de *B. sandiegonensis* en la región norte de Baja California.

Capítulo 2. Materiales y métodos

2.1. Área de estudio

El estudio se realizó en la zona noroeste de la península de Baja California. Se muestrearon un total de 36 pozas vernaes repartidas en seis localidades: las Mesas Jesús María (MJM), El Descanso (MED), La Misión (con tres localidades Chichihuas (CHI), La Misión (MLM) y El Mirador (EMI)) y Colonet (COL y Propiedad de Feinman PEI), y en los Valles Las Palmas (VLP) y de Guadalupe (VDG) (Tabla 1, Figura 1). De estas pozas, 22 se encontraron con agua y 14 secas. Las recolectas se hicieron en las temporadas de lluvias de enero-abril de 2013, 2014 y 2015. Las muestras de 2013 fueron donadas por Matt Guilliams del Jardín Botánico de Santa Bárbara.

Tabla 1: Ubicación geográfica y nomenclatura de las pozas con agua muestreadas para cada región.

Región	Nombre de la Poza	Longitud	Latitud
Mesa El Descanso	MED01	-116.86803	32.17101
	MED02	-116.86747	32.17204
	MED05	-116.87172	32.1781
Mesa Jesús María	MJM35	-116.84000	32.49724
Mesa La Misión	MLM01	-116.85397	32.08020
	MLM23	-116.82306	32.04308
	MLM24	-116.83642	32.04392
	MLM25	-116.84220	32.04255
	MLM26	-116.85134	32.04255
	MLM28	-116.79552	32.04269
	CHI15	-116.77185	32.00227
	CHI16	-116.78919	32.01158
	CHI17	-116.77474	32.00328
	EMI34	-116.81892	31.99171
Mesa Colonet	COL01	-116.298183	31.03000
	PEI01	-116.287433	31.094233
Valle de Guadalupe	VDG18	-116.65608	32.01940
	VDG19	-116.66228	32.1567
	VDG20	-116.65822	32.01347
Valle Las Palmas	VLP31	-116.64966	32.363533
	VLP32	-116.64966	32.36516
	VLP33	-116.64961	32.36578

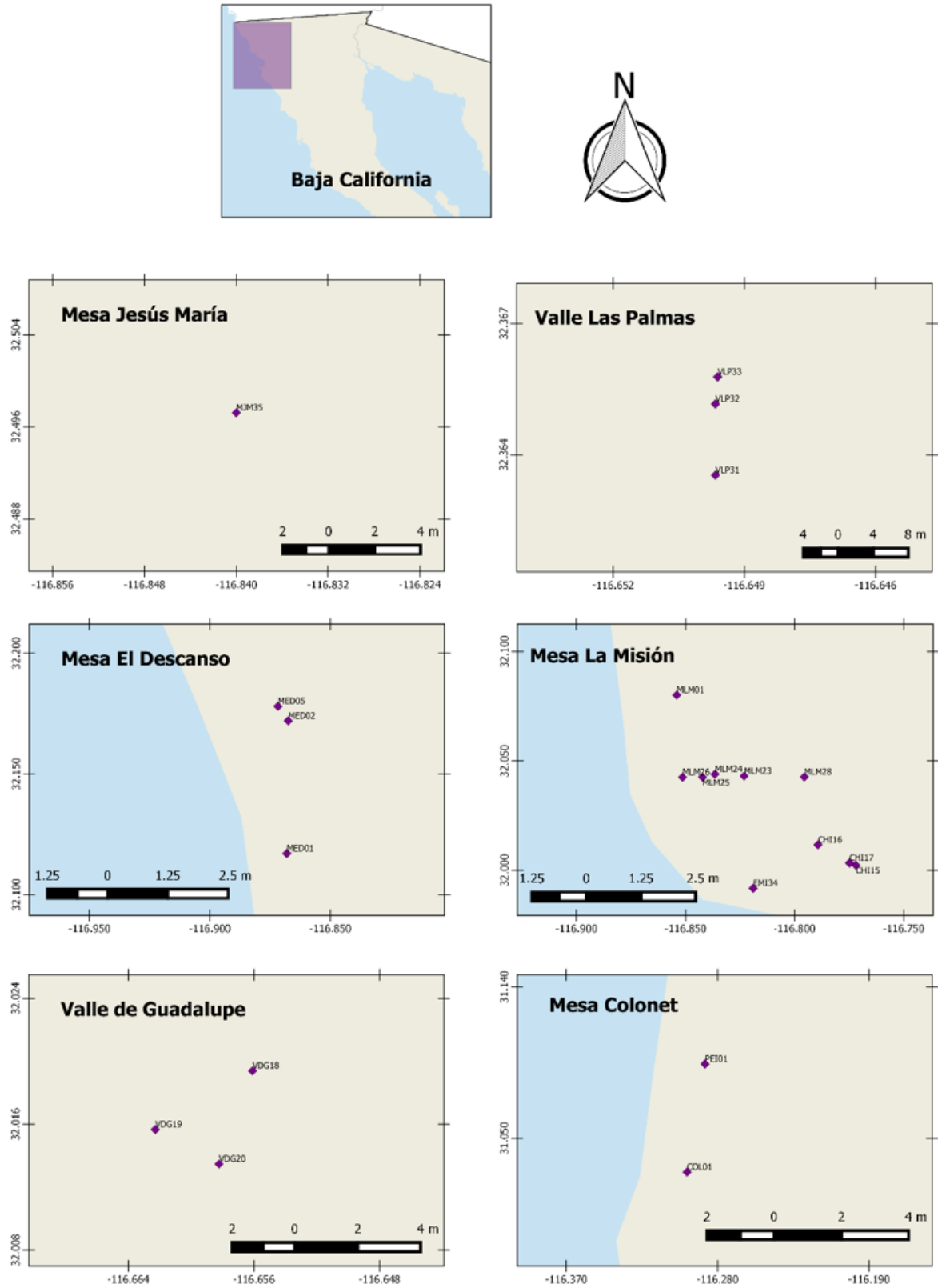


Figura 1: Pozas vernaes estudiadas en el Norte de la península de Baja California.

El estado de Baja California es atravesado longitudinalmente por una sierra, que culminan en pendientes de difícil acceso en el noroeste y aún más difíciles en el noreste y suroeste. En la porción norte, el estado cuenta con una superficie variable donde contrastan lomeríos, llanuras, sierras, valles y grandes desiertos. Las altitudes van desde el nivel del mar hasta el pico más alto en la sierra San Pedro Mártir (3,100 msnm) (INEGI, 2014). El suelo de las pozas está formado por materia orgánica, carbonatos acumulados, arcillas, duripán (formado por sílice) (Hobson y Dahlgren, 1998). La zona mediterránea se caracteriza por tener clima templado con lluvias en invierno; con una precipitación total anual de alrededor de 200 mm (INEGI, 2014).

2.2. Obtención de muestras

En las pozas con agua las muestras se recolectaron usando redes de luz de malla de 0.1 mm. Se evitó al máximo que la red tocara el fondo de la charca para no remover el sedimento. Después de tomar la muestra, las redes se lavaron en agua con cloro para que los organismos o quistes que quedaban en ellas se murieran y no contaminar la siguiente poza con muestra biológica de la poza anterior. Las muestras se fijaron en etanol al 70 % tanto para su identificación taxonómica como para su uso en análisis moleculares, se colocaron en viales para su transporte y conservación.

Para el caso de las pozas secas se tomaron muestras de tierra de la superficie, usando una pala de jardinería. Las tierras fueron colocadas en acuarios (un acuario por poza) y se hidrataron con agua destilada, se les colocó aeración y se monitorearon diariamente en la espera de que los anostracos eclosionaran. Una vez que los crustáceos eclosionaron, fueron alimentados una vez al día durante un mes con una mezcla de levadura y alimento para pez triturado disueltos en agua.

De cada poza muestreada se midió el diámetro mayor en la zona más ancha y de manera perpendicular se midió el diámetro menor en la zona más angosta. A partir de los diámetros se obtuvieron los radios y se sacó el área de cada poza usando la fórmula de área para elipses. La distancia entre las pozas se midió usando distancias euclidianas (distancia lineal entre dos puntos) a partir de las coordenadas geográficas.

2.3. Identificación taxonómica, riqueza de especies y análisis morfológicos

Se separaron e identificaron 20 individuos adultos (10 hembras y 10 machos) de cada poza. Aunque esto ocurrió en la mayoría de las pozas, hubo otras para las que no se contó con esa cantidad, entonces se trabajó con menos individuos. Se colocó cada individuo en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se etiquetó. Los organismos fueron identificados siguiendo las claves de Eriksen y Belk (1999) para machos y para las hembras se usaron las claves de Rogers (2013). Para el análisis morfológico se tomaron las medidas longitudinales del cuerpo que son especificadas en la Figura 2.

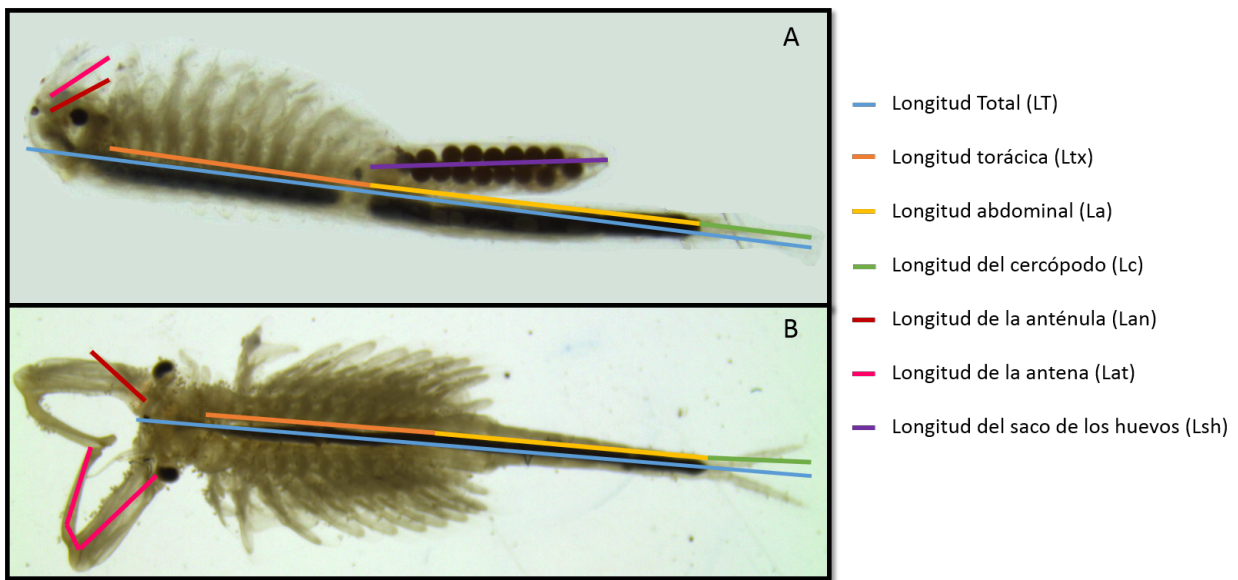


Figura 2: Longitudes tomadas para cada individuo para todas las especies. A) Hembra, B) Macho. Foto de *B. sandoegonensis*.

Con el fin de evaluar si existían diferencias fenotípicas intraespecíficas de los individuos de diferentes pozas, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) utilizando las tasas de las medidas morfológicas tomadas durante la identificación taxonómica. Primero se calcularon diferentes tasas morfológicas (en todas las especies) Longitud Total/Longitud torácica (LT/Ltx), Longitud Total/Longitud Abdominal (LT/La), Longitud Total/Longitud de los cercópodos (LT/Lc), Longitud Total/Longitud de la anténula (LT/Lan), Longitud Total/Longitud de la antena (LT/Lat), Longitud de la antena/Longitud de la anténula (Lat/Lan) y Longitud Total/Longitud del saco de los huevos (LT/Lsh). Poste-

riormente, se obtuvieron las medias de cada tasa y su desviación estándar por poza. El ACP se realizó con las medias de las tasas y se analizaron machos y hembras de manera independiente.

Para sacar las medias de las tasas únicamente se consideraron organismos adultos y que estuvieran completos, es decir que no les faltara ningún segmento del cuerpo, por lo que en algunas pozas se contó con menos individuos. Una hembra se consideró como adulta cuando el saco de los huevos tenía huevecillos o en su defecto cuando la longitud del mismo llegaba al quinto o sexto segmento abdominal, dependiendo de la especie; mientras que un macho se consideró como adulto cuando la parte distal de las antenas estaba completamente formada y coincidía con la descripción de las claves (Fugate, 1993; Erikson y Belk, 1999) (Figuras 3 y 4).

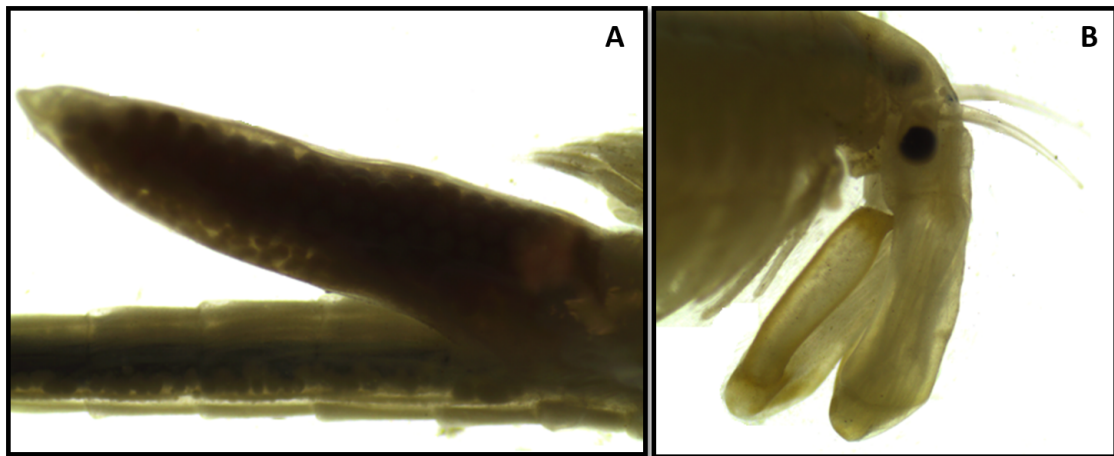


Figura 3: Características morfológicas en adultos de *B. lindahli*. A) Hembra, se observa el saco de huevos con huevecillos, su longitud se extiende hasta la mitad del sexto segmento. B) Macho, se observa la parte distal de la antena que está completamente formada.



Figura 4: Características morfológicas de *B. sandiegonensis*. A) Antena de macho adulto completamente formada, B) Antena de macho juvenil que aún no termina su desarrollo (señalado con la flecha), C) Saco de los huevos de hembra adulta con huevecillos y se extiende hasta la mitad del quinto segmento abdominal, D) Saco de los huevos aún en desarrollo de hembra juvenil (señalado con la flecha).

2.4. Extracción de ADN y amplificación de marcadores moleculares

La extracción de ADN se llevó a cabo utilizando el protocolo de QIAGEN para el kit DNeasy blood and tissues (QIAGEN, 2006). Se extrajo ADN de diez individuos de *B. sandiegonensis* de cada poza que fueron previamente identificados taxonómicamente. Se usaron 0.1 mg de tejido de antena y cabeza de cada individuos para la extracción. En total se extrajo el ADN de 150 individuos de *B. sandiegonensis* recolectados en 15 pozas, las cuales están distribuidas en cuatro regiones Mesa La Misión (8 pozas), Mesa El Descanso (3 pozas), Mesa Jesús María (1 poza) y Valle Las Palmas (3 pozas). La calidad de las extracciones se evaluó mediante electroforesis, utilizando geles de agarosa al 1 %. Los productos de la extracción corrieron a 80 V durante 25 min, se tiñó con gelred y se observó bajo luz UV. La concentración del ADN de cada muestra se obtuvo mediante la absorvancia a 260 nm utilizando un espectofotómetro NanoDrop 2000 (ThermoScientific, 2008).

Se amplificó un fragmento de 800 pb del gen Citocromo Oxidasa subunidad I (COI) utilizando los iniciadores desarrollados en el laboratorio del Dr. Andrew J. Bohonak en San Diego State University, Jyothi: 5' TTC TCA ACA AAT CAT AAA GAT ATT GG 3' y 2198-2: 5' TTA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CAA AAC AAG TG 3'. La mezcla de reacción (25 μ L) contuvo 1.5 mM de $MgCl_2$, 0.04 x de BSA, 0.8 mM de dNTPs, 0.48 de ambos iniciadores y 0.8 U de polimerasa Taq. Las condiciones de amplificación fueron de 94 °C durante 3 min, seguido de 35 ciclos de: 94 °C por 30 s, 49 °C por 30 s, 72 °C por 1 min con una rampa de 0.5 °C/s, finalizando con 7 min de extensión a 72 °C. Además se amplificaron cinco microsatélites nucleares, desarrollados por Andrews *et al.* (2013) (Tabla 2). La mezcla de reacción de los microsatélites utilizados (30 μ L) contuvo 0.8 mM de dNTPs, 0.48 μ M de cada iniciador y 1 U de Taq, la concentración de $MgCl_2$ se muestra en la Tabla 2. Las condiciones de amplificación fueron de 95 °C durante 15 min, seguido de 30 ciclos de: 94 °C por 30 s, la temperatura de alineamiento (se especifica en la Tabla 2) por 3 min y 72 °C por 30 s para los loci BsH106, BsH120, BsB201 y BsB8 y por 60 s para el loci BsH101, finalizando con 30 min de extensión a 60 °C; para el locus BsH101 se hizo una rampa de 0.5 °C/s.

Tabla 2: Loci microsatelitales nucleares caracterizados para *B. sandiegonensis*. Modificado de Andrews *et al.* (2013).

Locus	Motivo repetitivo	Secuencia del cebador	Tamaño esperado	Temp. de ali.	Concentración de $MgCl_2$
BsB8	(CT) ₃₀	F: VIC -GTGTCTCACTGCCGTTGTTTTCAAT R: GGCAAGTTCCTACTTTTCATCCTTTTACCGA	138-283	61 °C	3.0 mM
BsB201	(CT) ₁₀ Inserto TT	F: VIC -CAAACCCAACCCATCGTGACATCCTAC R: CTGGCACCACCTTACAATCGGCTATCATC	386-399	69 °C	1.5 mM
BsH106	(ATCT) ₈	F: FAM -GTCGGCGCTACGAGTTGGATCAATAAAA R: TGGAGTCGAAACGAACGTCTGTCCA	112-145	69 °C	1.5 mM
BsH120	(TAGA) ₂₃	F: FAM -CGGACGGTTTGGGTCTCCTTTTATCTTT R: TCGGGAGGATCTAATGTAAGCGGTA	261-400	63 °C	3.0 mM
BsH101	(TCTA) ₅	F: PET -ACAGGACGGACGAGGCATCAAAATC R: AAAGACGAAAACCGCCAAAAAGCATCT	310-318	69 °C	3.0 mM

Los productos de las amplificaciones, se observaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % a 75 V durante 35 min para el gen COI y en geles de agarosa al 2 % a 100 V durante 25 min para los loci microsatelitales, tiñéndolos con gelred. Se realizó análisis de fragmentos para los microsatélites. Los electroferogramas se analizaron en el programa Peak Scanner Software v1.0 (Biosystems, 2006) y se determinó el tamaño de los alelos y

el estado para cada individuo (homocigoto o heterocigoto). Los amplicones del gen COI se enviaron a secuenciar. Los electroferogramas de las secuencias fueron revisados en el programa BioEdit 7.2.5 (Hall, 1999) donde se alinearon y se revisó cada sitio polimórfico.

2.4.1. Análisis de diversidad y estructura genética de *B. sandiegonensis*

La diversidad genética se midió considerando tres unidades diferentes (Figura 5A), la primera consideró la diversidad de *B. sandiegonensis* en el norte de la península de Baja California como unidad. La segunda es la diversidad regional, la cual abarcó a las regiones geográficas como islas (Mesa Jesús María, Mesa El Descanso, Mesa La Misión y Valle las Palmas) y, la tercera es la diversidad por poza que consideró a cada poza como una isla (15 pozas). La estructura genética se midió a tres escalas geográficas (Figura 5B), la macroescala consideró las cuatro regiones geográficas; la mesoescala abarcó las tres mesas (Jesús María, El Descanso y La Misión); y la microescala consideró a la Mesa La Misión dividida en tres localidades (Chichihuas (CHI), La Misión (MLM) y El Mirador (EMI)).

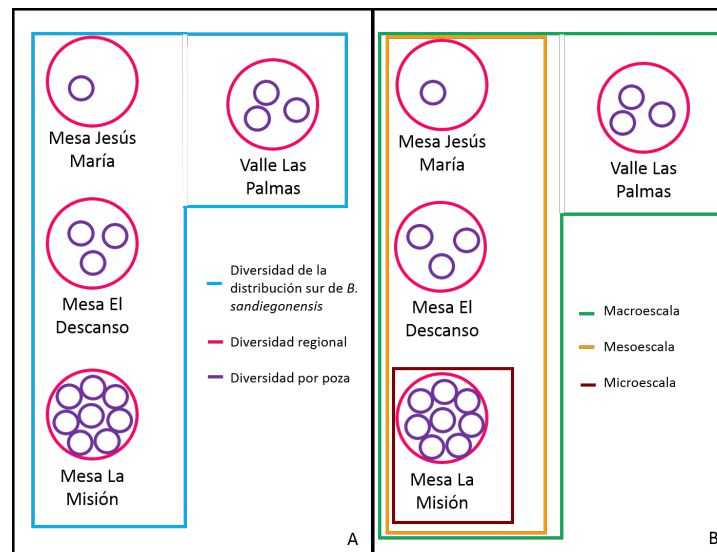


Figura 5: Escalas para los análisis de diversidad y estructura genética. A) Diversidad genética; B) Estructura genética.

2.4.1.1. Marcadores nucleares

Considerando las tres unidades de diversidad, se obtuvieron estimados de riqueza alélica, número de alelos efectivos por población y media del número de alelos por poza (Tabla 3). Para la diversidad regional y por poza se estimaron alelos privados, índice de endogamia (F_{IS}), heterocigosidad observada, esperada y se evaluó el equilibrio de Hardy-Weinberg en cada unidad de muestreo (Tabla 3). Para la diversidad por poza se hizo la prueba de alelos nulos y se calculó el desequilibrio de ligamento, para este último y el equilibrio de Hardy-Weinberg se hizo la corrección de Bonferroni (Rice, 1989) (Tabla 3). Para saber si había una relación entre el tamaño de la poza y la diversidad genética, se hicieron regresiones lineales usando los estimados de diversidad de riqueza alélica, índice de endogamia y heterocigosidad observada por poza en relación al área de las pozas.

Para evaluar la estructura genética primero se utilizó el programa STRUCTURE para calcular cuántos componentes genéticos había en el área de estudio usando un periodo de calentamiento de 50,000, seguido de 500,000 cadenas de Markov, utilizando el modelo de mezcla y correlacionando todas las frecuencias; se hicieron 15 repeticiones. La K evaluada fue diferente en cada escala ya que el número de pozas fue diferente, macroescala K=15, mesoescala K=12 y microescala K=8. En los tres casos se hizo la corrección de Evanno *et al.* (2005). Para evaluar la distribución de la variación genética se realizó un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) de tres componente en las tres escalas geográficas, considerando a macroescala dos grupos (Valle Las Palmas vs Las Mesas), a mesoescala tres grupos (Mesa Jesús María vs Mesa El Descanso vs Mesa La Misión) y a microescala tres grupos (Chichihuas vs La Misión vs El Mirador); también se calcularon los índices de fijación (F_{IS} , F_{ST} y F_{IT}). Además se calcularon las distancias genéticas (F_{st}) haciendo la corrección de ENA (Chapuis y Estoup, 2006) calculada con el programa FreeNa, por poza para las tres escalas y se evaluó la existencia de aislamiento por distancia con una prueba de Mantel entre éstas y las distancias euclidianas (Tabla 3). Los F_{st} también fueron utilizados para generar los árboles de agrupamiento usando el método de unión de vecinos (Tabla 3).

2.4.1.2. Marcador mitocondrial

En el caso de las secuencias del gen COI se obtuvo la diversidad haplotípica, nucleotídica, los haplotipos y los sitios polimórficos por región utilizando los programas listados en la Tabla 3. El modelo de substitución nucleotídica para esta región del COI se estimó con las secuencias de Baja California y dos haplotipos de la especie obtenidos del genbank (FJ439718 y FJ439740; Vandergast *et al.* (2009)), en el programa Modeltest 2.1.5, para encontrar el mejor modelo se usó el Criterio de Información Aikake (AIC). Para determinar las relaciones filogenéticas de los individuos y evaluar a que linaje pertenecían (en la distribución norte de la especie se determinó la existencia de dos linajes mitocondriales el A y el B; Bohonak (2005); Vandergast *et al.* (2009)), se construyó un árbol usando el método de máxima verosimilitud (Tabla 3). Finalmente se analizó la distribución de los haplotipos en las cuatro regiones geográficas con una red de haplotipos, y se hizo una red utilizando las secuencias del linaje A para establecer el parentesco de la especie en San Diego y en Baja California.

Tabla 3: Lista de los programas utilizados para los análisis genéticos.

Análisis de Diversidad Genética	
Microsatélites	COI
GenAlex 6.5	MEGA 6.06
Arlequín 3.5.2.1	DNASP 5.10.01
FSTAT 2.9.3	
GenePop en línea	
FreeNa	
Excel Microsat toolkit	
Análisis de estructura genética	
Microsatélites	COI
R studio	Modeltest 2. 1.5
Structure 2.3.4	Network 4.6.1.3
MEGA 6.06	

Referencias (Raymond y Rousset, 1995; Goudet, 2001; Morrison, 2005; Chapuis y Estoup, 2006; Posada, 2008; Hubisz *et al.*, 2009; Librado y Rozas, 2009; Excoffier y Lischer, 2010; Peakall y Smouse, 2012; Tamura *et al.*, 2013).

Capítulo 3. Resultados

3.1. Identificación taxonómica

Se identificaron un total de 353 individuos (entre 331 adultos y 22 nauplios) pertenecientes a dos especies: *Branchinecta sandiegonensis* Fugate, 1993 y *B. lindahli* Packard, 1883 (Figura 6). De estos, 260 fueron *B. sandiegonensis*, 70 *B. lindahli* y 20 nauplios del género *Branchinecta*. De las tierras puestas en acuarios se obtuvieron organismos en dos de los acuarios, el de Valle Las Palmas donde se identificó una hembra de *B. sandiegonensis* y la Mesa Jesús María donde se obtuvieron dos nauplios (Figura 7).



Figura 6: Especies de Anostracos encontrados. A) Hembra de *B. sandiegonensis*; B) Macho de *B. sandiegonensis*; C) Hembra de *B. lindahli*; D) Macho de *B. lindahli*.

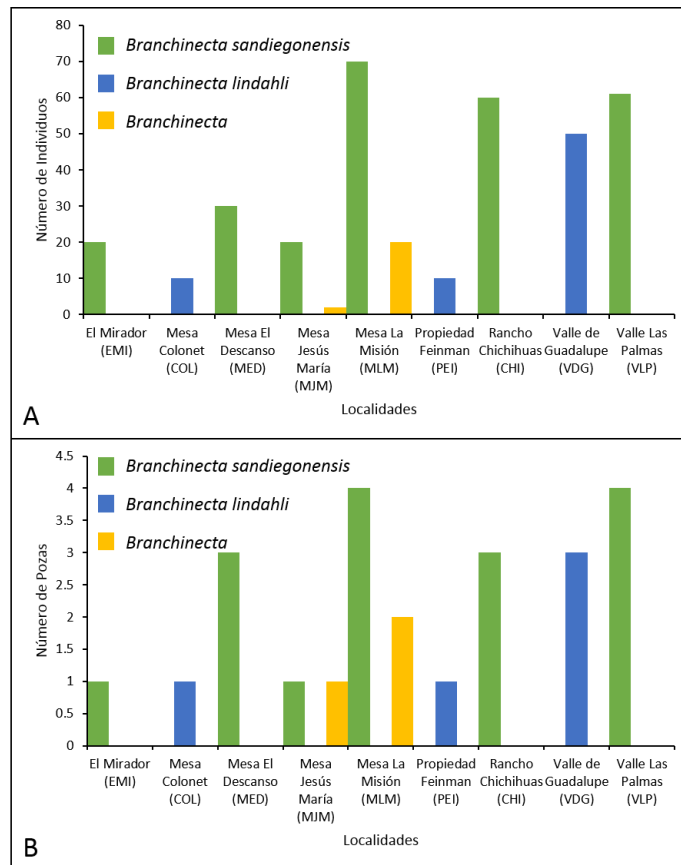


Figura 7: Localización de las especies en las pozas vernaes. A) Número de individuos; B) Número de pozas.

3.2. Análisis de datos morfológicos

3.2.1. *Branchinecta lindahli*

Esta especie se encontró en cinco pozas (tres en Valle de Guadalupe y dos en la Mesa Colonet), de las cuales sólo se consideraron cuatro pozas para el análisis, dos pozas en cada región, ya que los individuos de la tercera poza de Valle de Guadalupe les faltaban partes del cuerpo. Se consideraron datos de 29 hembras y 29 machos. El intervalo de longitud total (LT) para la especie fue de 7.35-21.60 mm.

En el ACP tanto de hembras como de machos, no se observa un patrón que coincida con la ubicación geográfica de las pozas. Por ejemplo los individuos de la poza VDG19 de Valle de Guadalupe y PEI01 de la de Mesa Colonet quedan más cercanos entre sí,

mientras que los individuos de las otras dos pozas quedan separados entre sí y se alejan del resto (Figuras 8A y 8B).

3.2.2. *Branchinecta sandiegonensis*

Esta especie se encontró en cuatro regiones geográficas (Valle Las Palmas, Mesa Jesús María, Mesa El Descanso y Mesa La Misión) y en 15 pozas. De las cuales sólo se consideraron 13 pozas ya que en las otras dos los organismos aún no estaban completamente desarrollados y sólo se consideraron los datos de 117 hembras y 115 machos. El intervalo de longitud de los adultos fue de 7.15-19.04 mm.

El ACP en hembras (Figura 8D) y machos (Figura 8C) no muestra un patrón claro de agrupamiento por localidad geográfica, lo que sugiere que no existen diferencias fenotípicas entre los individuos entre pozas ni entre regiones. Por ejemplo las pozas de la Mesa El Descanso (MED01, MED02 y MED05) se esperaba que estuvieran más cercanas entre sí, sin embargo están separadas y son más cercanas a pozas de otras regiones.

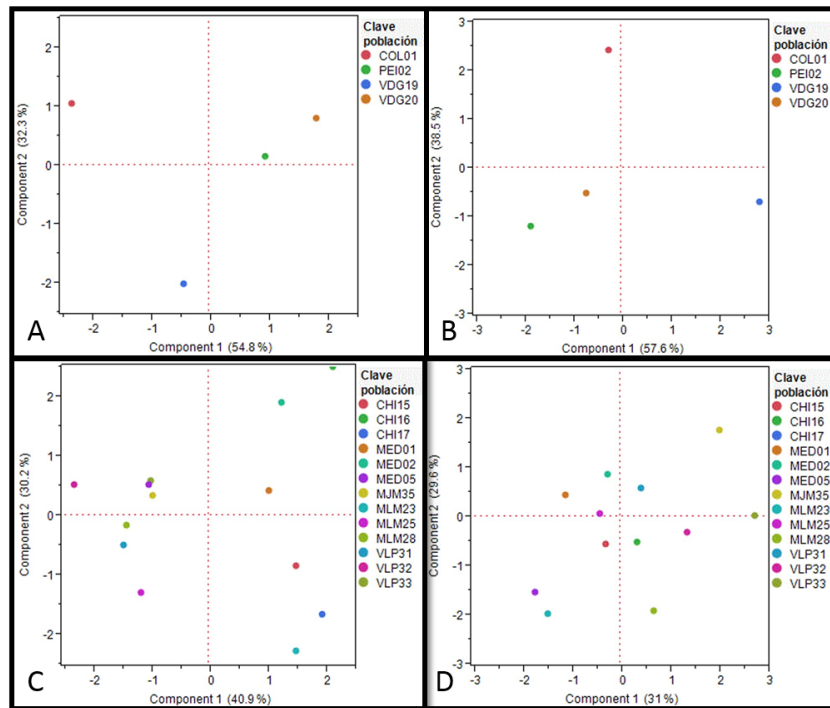


Figura 8: Análisis de Componentes Principales de los datos morfológicos para ambas especies. A) Machos de *B. lindahli*, B) Hembras de *B. lindahli*, C) Machos de *B. sandiegonensis* y, D) Hembras de *B. sandiegonensis*.

3.3. Análisis moleculares

3.3.1. Análisis de diversidad genética. Microsatélites

3.3.1.1. Diversidad por poza

Para los análisis de diversidad con los microsatélites se utilizaron 140 muestras donde se genotipificaron por lo menos cuatro de los cinco loci por muestra (Apéndice A). Las frecuencias de alelos nulos por poza fueron relativamente bajas, estando en un intervalo de 0-0.385. El análisis de desequilibrio de ligamiento para cada par de locus por poza fueron no significativos después de hacer la corrección de Bonferroni (Rice, 1989).

En el análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg hay cuatro pozas que tienen desviaciones del equilibrio en tres de las regiones y todas presentan déficit de heterocigotos. Los coeficientes de endogamia fueron altos para las pozas del Rancho Chichihuas, Valle Las Palmas y Mesa Jesús María, comparados con el resto de pozas (Tabla 4).

A nivel de poza la riqueza alélica estuvo entre 1.89-3.35, la mayor riqueza alélica está en la Mesa El Descanso, mientras que la menor estuvo en Mesa La Misión. El número promedio de alelos estuvo entre 2.20 y 4.20; el número efectivo de alelos estuvo entre de 1.845 y 3.348. La poza con mayor número de alelos privados se encontró en Valle Las Palmas y hubo varias pozas sin alelos privados (Tabla 4). En los tres análisis de regresión lineal que se efectuaron no hubo una correlación significativa entre el área de la poza respecto a los tres estimadores de diversidad (riqueza alélica vs área $R^2 = 0.2659$ $p = 0.1271$; F_{IS} vs área $R^2 = 0.0012$ $p = 0.9250$; H_o vs área $R^2 = 0.0092$ $p = 0.7926$).

Tabla 4: Diversidad genética por poza de *B. sandiegonensis*.

Localidad	Poza	N	N _e	N _a	R _a	AP	F _{IS}	H _o	H _e
Mesa La Misión	CHI15	8	1.845	3.0	2.428	1	0.352	0.257	0.363
	CHI16	8	2.155	2.8	2.299	1	0.402	0.271*	0.412
	CHI17	9	2.677	3.8	2.931	0	0.437	0.275*+	0.448
	EMI34	10	2.509	2.2	1.884	0	0.118	0.300	0.321
	MLM01	10	2.527	3.4	2.710	2	0.044	0.469	0.464
	MLM23	10	2.296	3.2	2.581	0	-0.040	0.451	0.412
	MLM25	10	2.281	4.2	2.850	0	-0.021	0.453	0.421
	MLM28	10	2.369	2.2	2.147	1	0.114	0.393	0.419
Mesa Jesús María	MJM35	8	2.793	3.6	2.820	2	0.437	0.264*+	0.427
Mesa El Descanso	MED01	10	2.610	3.0	2.341	1	0.147	0.360	0.398
	MED02	9	1.973	2.4	2.190	0	0.119	0.383	0.407
	MED05	8	2.296	4.2	3.348	1	0.131	0.483*	0.514
Valle Las Palmas	VLP31	10	2.001	3.6	2.628	0	0.260	0.300*+	0.380
	VLP32	10	2.796	4.2	2.959	2	0.191	0.380*	0.442
	VLP33	10	3.348	3.8	2.708	5	0.350	0.277*+	0.391

N= Número de individuos, N_e= Número efectivo de alelos, N_a= Media del número de alelos, R_a= Riqueza alélica, AP= Alelos Privados, F_{IS}= Coeficiente de endogamia, H_o= Heterocigosidad Observada, H_e= Heterocigosidad Esperada, * Valores significativos $\alpha = 0.05$, + Valores significativos después de la corrección de Bonferroni (Rice, 1989).

3.3.1.2. Diversidad regional

En esta escala las cuatro regiones se encuentran en desequilibrio de Hardy-Weinberg por un déficit de heterocigotos. Los índices de endogamia fueron altos, siendo las mesas Jesús María y La Misión las que tuvieron los valores más altos. La riqueza alélica fue mayor en la Mesa La Misión y menor en la Mesa Jesús María. El número promedio de alelos fue de 3.60-6.60, siendo la Mesa Jesús María la menos diversa. El número efectivo de alelos estuvo entre 2.755 y 3.65, siendo la Mesa El Descanso la menor. La región con mayor número de alelos privados fue Valle Las Palmas con 21, mientras que la Mesa Jesús María no tuvo (Tabla 5).

3.3.1.3. Diversidad en la región sur de la distribución de *B. sandiegonensis*

La riqueza alélica fue de 11.97, mientras que el promedio de alelos por locus fue de 12.6, en un intervalo dado entre un alelo para el locus BsH101 y 26 para el BsB8 y el número efectivo de alelos de 4.42.

Tabla 5: Diversidad genética regional de *B. sandiegonensis*

Localidad	N	NP	N_e	N_a	R_a	AP	F_{IS}	H_o	H_e
Mesa La Misión	75	8	3.553	6.6	3.035	12	0.310	0.406*+	0.561
Mesa El Descanso	27	3	2.755	5.6	2.822	3	0.208	0.262*+	0.468
Mesa Jesús María	8	1	2.793	3.6	2.820	0	0.437	0.264*+	0.427
Valle Las Palmas	30	3	3.658	6.4	2.871	21	0.260	0.322*+	0.426

N= Número de individuos, NP= Número de pozas, N_e = Número efectivo de alelos, N_a = Media del número de alelos, R_a = Riqueza alélica, AP= Alelos Privados, F_{IS} = Coeficiente de endogamia, H_o = Heterocigosidad Observada, H_e = Heterocigosidad Esperada, * Valores significativos $\alpha = 0.05$, + Valores significativos después de la corrección de Bonferroni (Rice, 1989).

3.3.2. Análisis de diversidad genética. Citocromo Oxidasa I

Se obtuvieron 20 secuencias de entre 400-700 pb (Apéndice B), 11 de la Mesa La Misión, tres para Valle Las Palmas, cuatro para Mesa El Descanso y dos para Mesa Jesús María. Se encontraron cinco sitios polimórficos (todos parsimoniosos), que definen cuatro haplotipos (I, II, III y IV). La diversidad haplotípica a macroescala fue de 0.563 y la nucleotídica de 0.002.

3.3.3. Análisis de estructura genética. Microsatélites

3.3.3.1. Macroescala

Los resultados con el programa STRUCTURE indican que existen dos acervos genéticos, que están presentes en regiones geográficas diferentes. Uno de los grupos fue formado por las pozas de Valle Las Palmas y el segundo grupo fue formado por las pozas de las tres Mesas (Figura 9A). Con el AMOVA se encontró que el porcentaje de variación es mayor entre los grupos que dentro de los grupos; lo mismo sucedió con los índices de fijación, siendo el F_{ST} mayor que el F_{IS} , en ambos hubo diferencias significativas (Tabla 6).

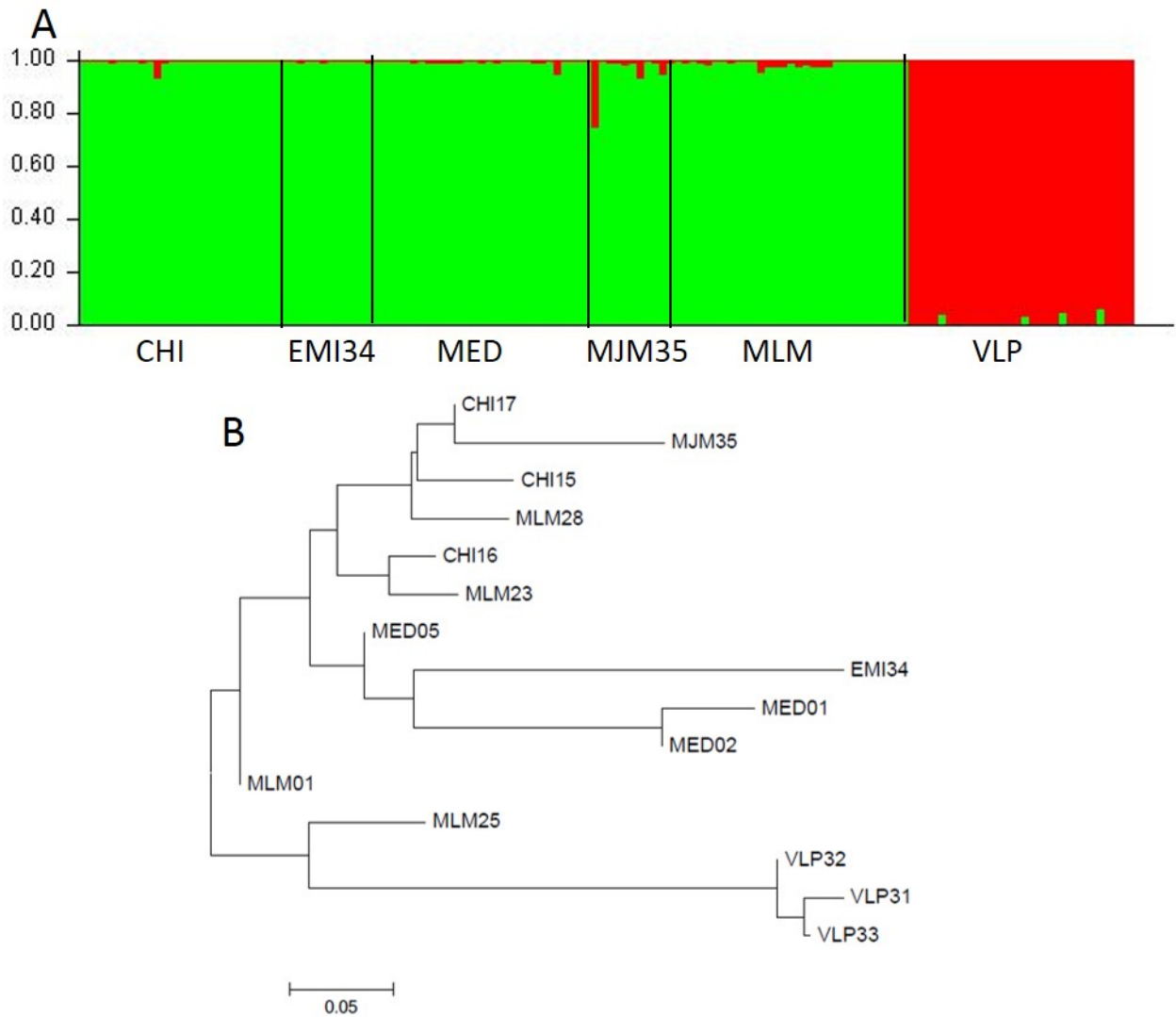


Figura 9: Estructura de *B. sandiegonensis* a macroescala. A) Gráfico del Structure K=2; B) Árbol de agrupamiento usando las distancias genéticas (F_{st}).

Tabla 6: AMOVA jerárquico a macroescala de *B. sandiegonensis* entre dos grupos.

Fuente de variación	G.L.	% de variación	Índice de fijación
Entre Grupos	1	31.59	0.31593*
Entre poblaciones dentro de los grupos	13	15.07	0.22036*
Dentro de las poblaciones	265	53.33	0.31593*

* $p < 0.05$

El intervalo de F_{st} estuvo entre 0.0119 (VLP32 vs VLP33) y 0.5093 (EMI34 vs VLP31), obteniendo en general valores menores entre pozas de la misma región y valores mayores entre pozas de diferentes regiones. El árbol de agrupamiento muestra que las tres pozas

de Valle Las Palmas se agrupan en una rama aparte junto a MLM25, el resto de las pozas se agrupan en otra rama (Figura 9B). La prueba de Mantel entre estos grupos comprobó la existencia de un aislamiento por distancia ($r= 0.5888$, $p= 0.002$).

3.3.3.2. Mesoescala

El análisis del programa STRUCTURE indicó la existencia de tres componentes genéticos que tuvieron una coincidencia parcial con la geografía, debido a que hubo cinco pozas con un solo componente genético, mientras que el resto tuvieron una mezcla de componentes genéticos y, en algunos casos hay individuos que presentan mezcla de componentes genéticos (Figura 10A). En el AMOVA la variación entre los grupos es menor que entre las poblaciones dentro de los grupos; igualmente el F_{IS} fue mayor que el F_{ST} , ambos muestran diferencias significativas (Tabla 7).

El intervalo de F_{st} fue de 0.0246 (MED01 vs MED02) a 0.4195 (EMI34 vs MJM35), siendo en general la diferenciación genética moderada dentro de las regiones y muy grande entre regiones, exceptuando a la poza EMI34 que tuvo diferenciación genética muy grande con pozas de la misma mesa (Mesa La Misión). El árbol de distancias agrupa a dos pozas de la Mesa El Descanso junto a la poza EMI34 de la Mesa La Misión en una rama separada del resto de las pozas, la tercera poza de El Descanso se mantiene como una rama sola, mientras que el resto de las pozas se subdividen en dos ramas que corresponden a el resto de la Mesa La Misión y la Mesa Jesús María (Figura 10 B). No se encontró un aislamiento por distancia ($r=0.2144$ $p= 0.183$) al llevar a cabo una prueba de Mantel entre estos grupos.

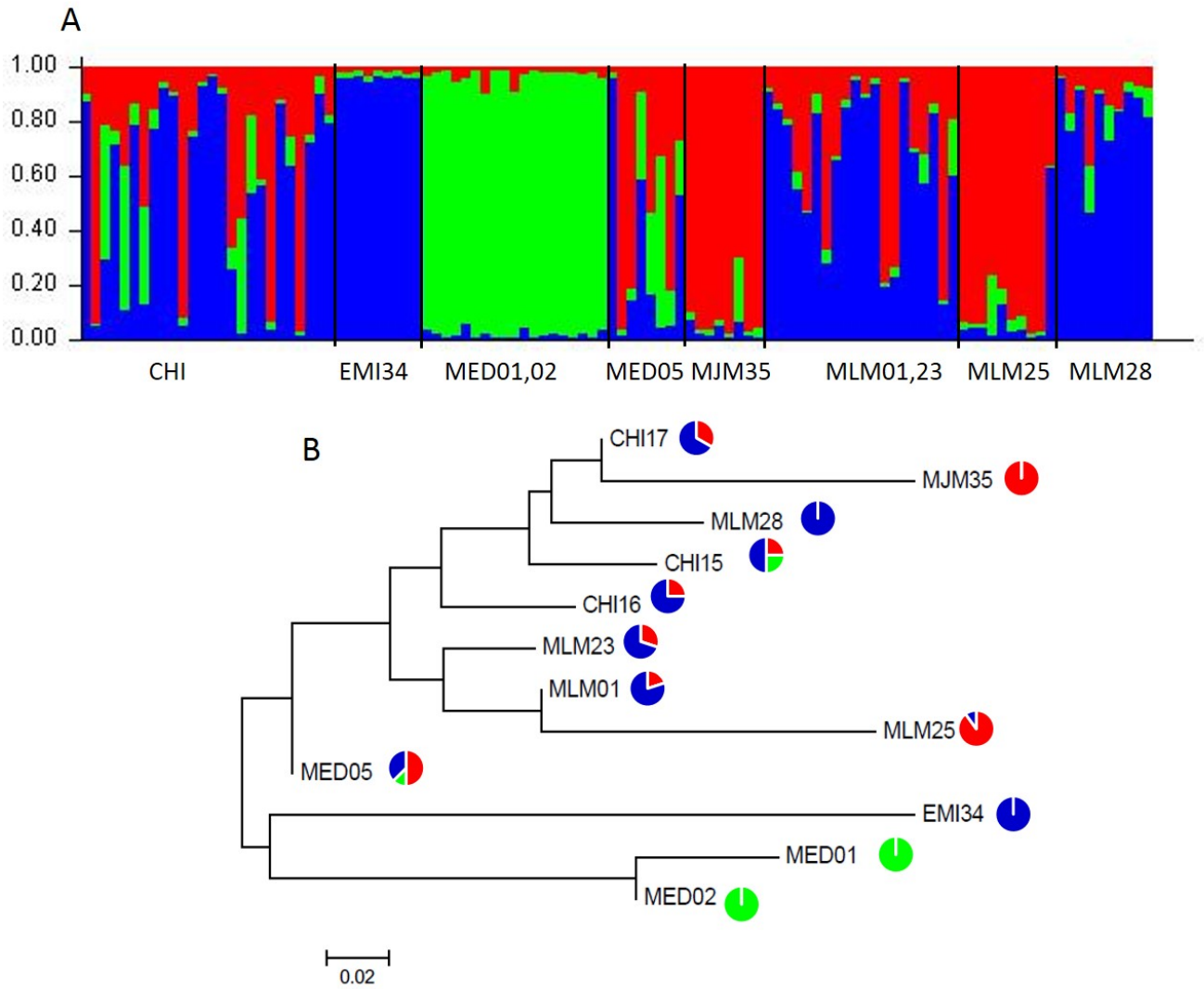


Figura 10: Estructura de *B. sandiegonensis* a mesoescala. A) Gráfico del Structure K=2; B) Árbol de agrupamiento usando las distancias genéticas (F_{st}). Los pays que se anexan al árbol representan el porcentaje de individuos de cada poza que pertenece a cada grupo generado por el programa Structure.

Tabla 7: AMOVA jerárquico a mesoescala de *B. sandiegonensis* entre tres grupos.

Fuente de variación	G.L.	% de variación	Índice de fijación
Entre Grupos	2	8.00	0.08002*
Entre poblaciones dentro de los grupos	9	19.49	0.21184*
Dentro de las poblaciones	208	72.51	0.27491*

* $p < 0.05$

3.3.3.3. Microescala

Finalmente, en los resultados del análisis realizado con el programa STRUCTURE para las muestras obtenidas en la Mesa La Misión se encontraron dos componentes genéticos, que no tienen una correspondencia geográfica, ya que existen tres pozas con un solo componente genético (EMI34, MLM25 y MLM28), mientras que el resto de las pozas tienen una mezcla de los dos componentes genéticos (Figura 11A). En el AMOVA el porcentaje de variación entre grupos y dentro de los grupos son muy similares, lo mismo sucede con F_{IS} y F_{ST} que son significativos en ambos casos (Tabla 8).

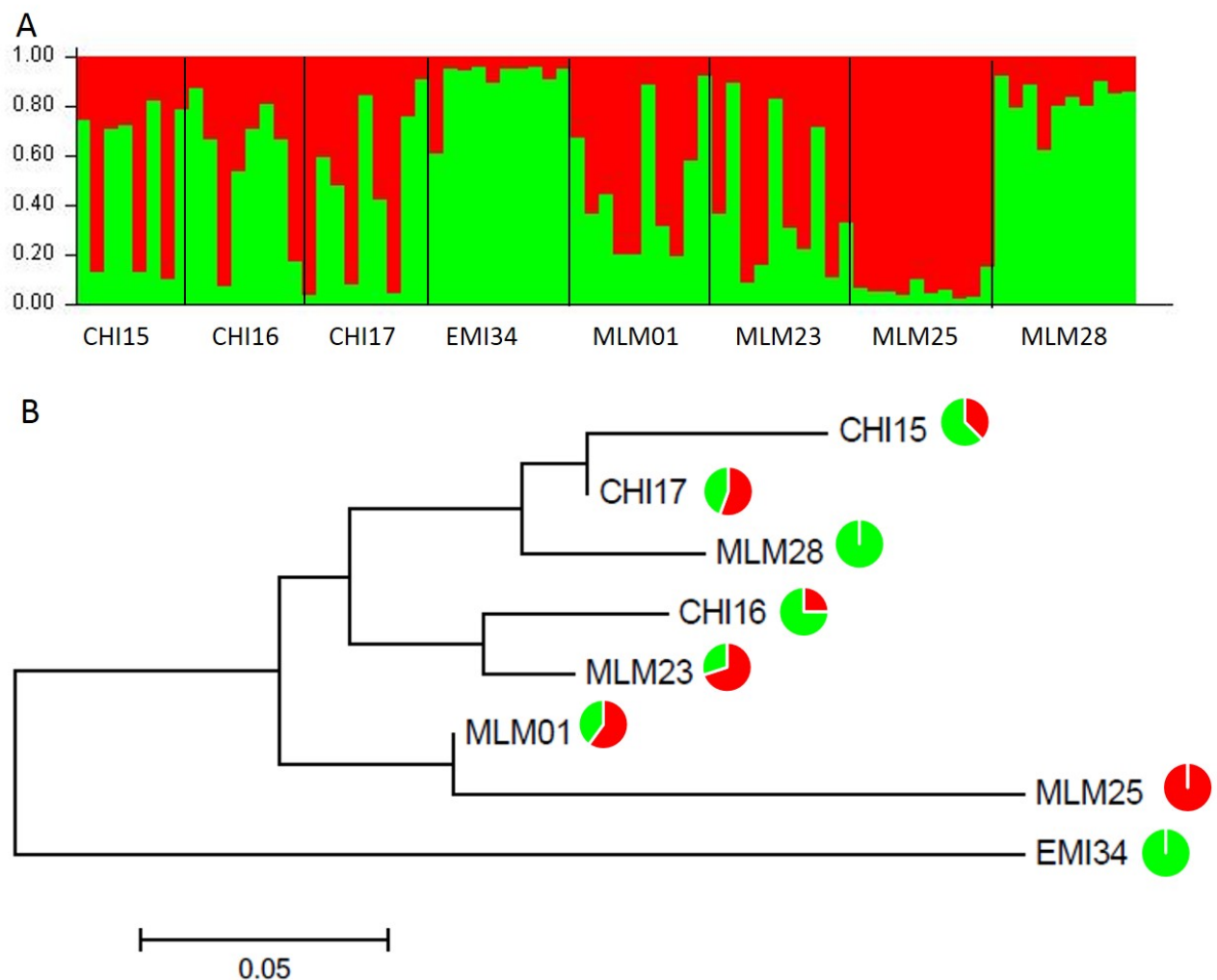


Figura 11: Estructura de *B. sandiegonensis* a microescala. A) Gráfico del Structure K=2; B) Árbol de agrupamiento usando las distancias genéticas (F_{st}). Los pays que se anexan al árbol representan el porcentaje de individuos de cada poza que pertenece a cada grupo generado con el programa Structure.

Tabla 8: AMOVA jerárquico a microescala de *B. sandiegonensis* entre tres grupos.

Fuente de variación	G.L.	% de variación	Índice de fijación
Entre Grupos	2	12.95	0.12949*
Entre poblaciones dentro de los grupos	5	13.33	0.15315*
Dentro de las poblaciones	142	73.72	0.26281*

* $p < 0.05$

El intervalo de F_{st} fue de 0.0350 (CHI15 vs CHI17) y 0.4164 (EMI34 vs MLM25), entre las localidades de Chichihuas y La Misión las diferencias genéticas fueron generalmente moderadas, pero cuando se compara contra la poza de El Mirador las distancias genéticas se vuelven muy grandes (> 0.25). El árbol de agrupamiento muestra que la poza EMI34 se ha separado del resto de las pozas de la mesa, las otras pozas forman dos grupos dentro de la misma rama, ambos grupos corresponden parcialmente a las localidades geográficas, ya que en la rama superior están dos de las tres pozas del Rancho Chichihuas y en la rama inferior tres de cuatro pozas de La Misión (Figura 11B). Al llevar a cabo la prueba de Mantel entre estos grupos no se encontró aislamiento por distancia ($r=0.1243$ $p= 0.199$).

3.3.4. Análisis de estructura genética. Citocromo Oxidasa I

El modelo de mutación fue el modelo de Tamura-Nei (TrN). El árbol de agrupación muestra que los individuos de Baja California son parte del linaje A de la especie (Bohonak, 2005; Vandergast et al. 2009), ya que se agrupan dentro de la misma rama, mientras que el haplotipo del linaje B queda en otra rama (Figura 12).

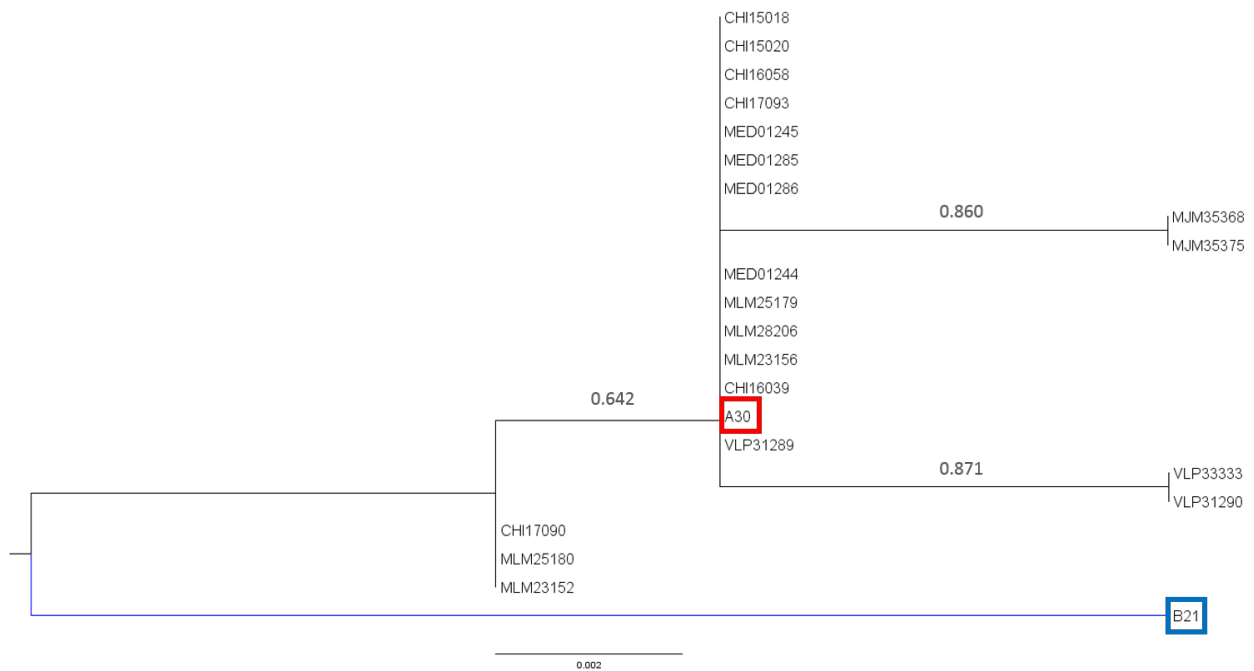


Figura 12: Árbol de agrupamiento de los individuos de *B. sandiegonensis* secuenciados para Baja California y dos haplotipos de diferentes linajes de la especie. En rojo el haplotipo del linaje A y en azul el haplotipo del linaje B.

La red de haplotipos usando las 20 secuencias de las muestras de Baja California, muestra que hay un haplotipo (I) abundante que está presente en dos de las mesas (La Misión y El Descanso) y en Valle Las Palmas (por ocho individuos de Mesa La Misión, cuatro de Mesa El Descanso y una de Valle Las Palmas). El segundo haplotipo (II) está presente en los dos individuos de Mesa Jesús María, el haplotipo III está en tres individuos de Mesa La Misión, finalmente el haplotipo IV está en dos individuos de Valle Las Palmas (Figura 13).

La red de haplotipos que se hizo combinando las secuencias de este trabajo con el linaje A (Bohonak, 2005; Vandergast *et al.*, 2009) de *B. sandiegonensis* (Figura 14), muestra la existencia del haplotipo I compartido entre Baja California y San Diego (A30, A27). El haplotipo de la Mesa Jesús María deriva de los haplotipos A16 y A26 de San Diego, que a su vez derivan del haplotipo I. El haplotipo de la Mesa La Misión y el de Valle Las palmas derivan del haplotipo I.

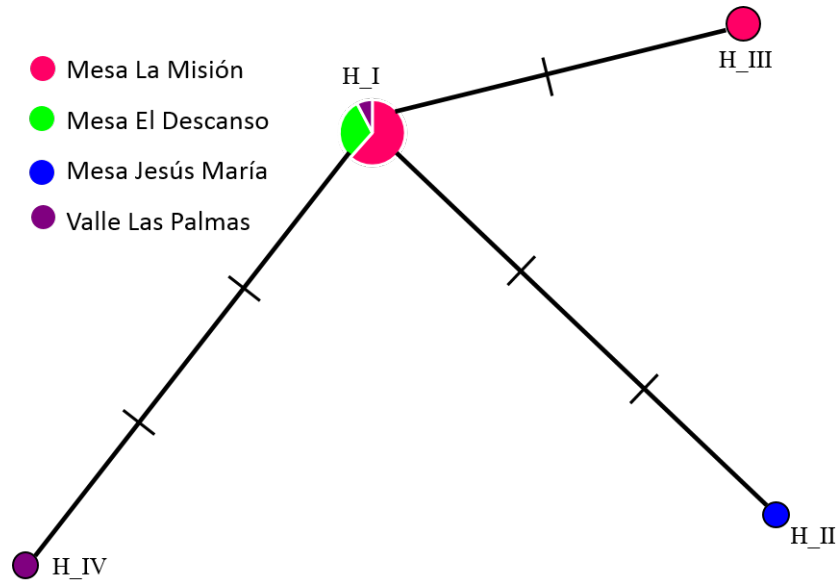


Figura 13: Red de haplotipos a escala región de *B. sandiegonensis* en Baja California. Cada círculo representa un haplotipo, y el tamaño del mismo representa al número de individuos con ese haplotipo. Las líneas cortas representan los pasos mutacionales entre un haplotipo y otro.

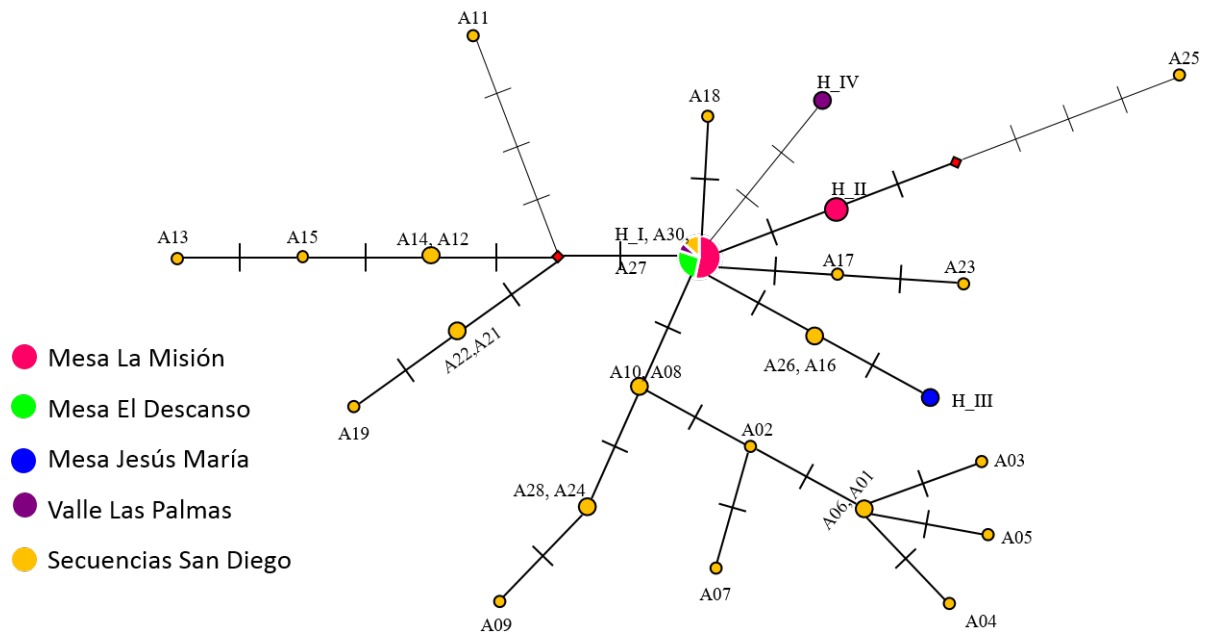


Figura 14: Red de haplotipos de *B. sandiegonensis* en Baja California con el clado A de San Diego. Cada círculo representa un haplotipo, y el tamaño del mismo representa al número de individuos con ese haplotipo. Las líneas cortas representan los pasos mutacionales entre un haplotipo y otro. Los diamantes representan haplotipos hipotéticos.

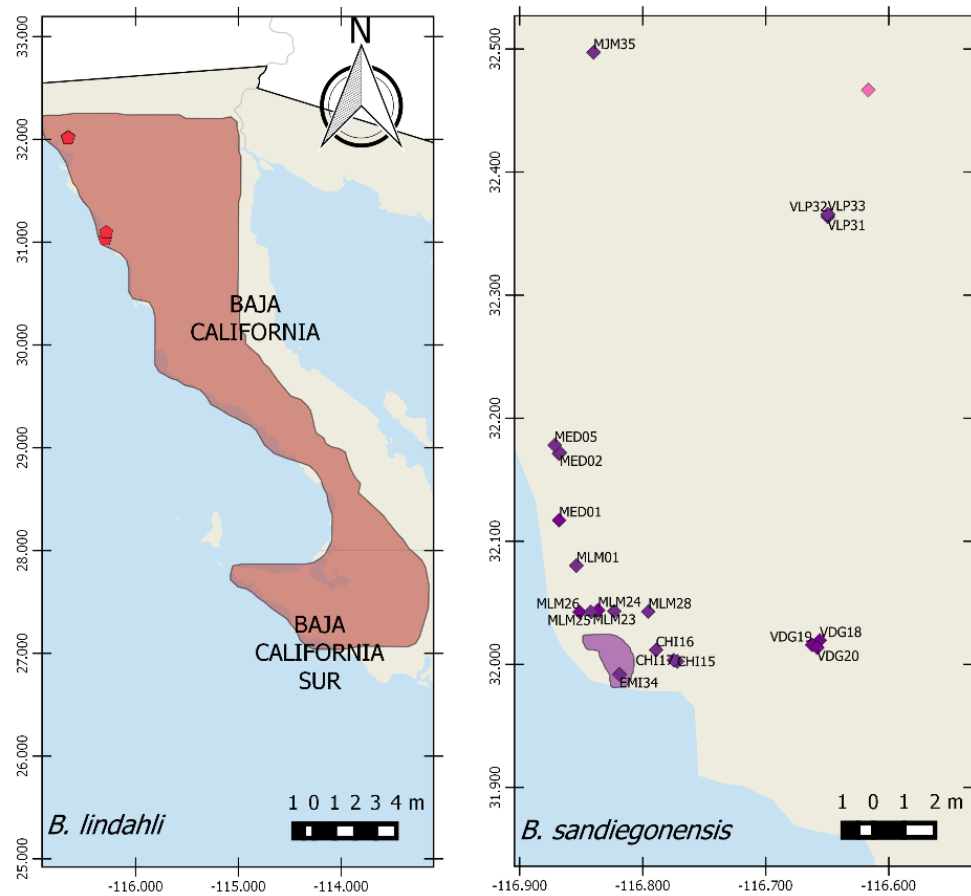
Capítulo 4. Discusiones

4.1. Taxonomía y riqueza de especies

En las pozas temporales del norte de Baja California se reportan dos especies de *Branchinecta*, *B. sandiegonensis* y *B. lindahli*. Estas especies ya han sido reportadas para la región por diversos autores (Maeda-Martínez, 1991; Brown *et al.*, 1993; Maeda-Martínez *et al.*, 1997a,b, 2005). Siendo limitados a dos localidades para *B. sandiegonensis*, y varias localidades a lo largo de la península de Baja California para *B. lindahli* (Figura 15). Los nuevos registros aumentan el conocimiento sobre la distribución geográfica regional de estas especie, así como la aportación al conocimiento sobre la variación morfológica y genética de las poblaciones de la zona sur de la distribución de *B. sandiegonensis* y zona media de la distribución de *B. lindahli*.

La primera hipótesis de trabajo se divide en dos partes, en la primera se propone que entre más grande la poza mayor riqueza tanto de especies como genética habrá, esta parte se rechaza. Sólo se encontró una especie de anostraco por poza, siendo irrelevante el tamaño de la misma. Esto coincide con lo reportado para la región de California en la zona de clima mediterráneo, donde se han encontrado pozas monoespecíficas para especies diferentes a las reportadas en este estudio (King *et al.*, 1996). Entre tanto en pozas presentes en Marruecos y Canadá se han registrado más especies de anostracos por poza (Retallack y Clifford, 1980; Thiery, 1982; King *et al.*, 1996).

Mientras que, con respecto a la segunda parte de la hipótesis que propone que entre pozas cercanas se compartirán especies, esta se acepta. Se encontró una especie por región geográfica. Los requerimientos ambientales de las especies de *Branchinecta* son variables (Gonzalez *et al.*, 1996), y las pozas dentro de un intervalo geográfico pueden variar en sus condiciones ambientales a lo largo de esa área, debido a varios factores principalmente los inherentes a la composición del suelo, la temporada de lluvias y la cantidad de agua, así como la intervención humana que causa disturbio en las pozas (King *et al.*, 1996).



Acotaciones

- ◆ *B. lindahli* este trabajo
- *B. lindahli* (Maeda-Martínez, 1991; Maeda-Martínez et al. 1997a)
- ◆ *B. sandiegonensis* este trabajo
- ◆ *B. sandiegonensis* (Fugate, 1993)
- *B. sandiegonensis* (Brown et al. 1993)

Figura 15: Registros geográficos de las dos especies en este trabajo y otros autores (Maeda-Martínez, 1991; Brown et al., 1993; Maeda-Martínez et al., 1997a,b, 2005).

Los factores que pueden estar influyendo en los resultados obtenidos pueden ser varios. Uno de esos factores es el número de veces que se muestreo, ya que en este trabajo sólo se hizo una vez en el año en cada poza, lo que nos impide conocer si existe un recambio de especies, particularmente de anostracos, a lo largo de la temporada que la poza permanece inundada. Esto se ha hecho en pozas de California y encuentran que el recambio general de especies es diferente de acuerdo a la época de muestreo (Schneider y Frost, 1996). También podría considerarse el tiempo de duración de la poza. Esto está ligado a la sucesión de especies, ya que al ser un ambiente cambiante existe esa dinámica de sucesión que ya ha sido estudiado en pozas de California (Schneider y Frost, 1996) donde encontraron que al aumentar la duración de la poza se incrementa el efecto de las interacciones bióticas dentro de la misma y se da una sucesión de especies.

La especie *B. lindahli* se distribuye en pozas con mayor grado de disturbio, mientras que *B. sandiegonensis* se le ha encontrado en pozas con características más prístinas (Hathaway y Simovich, 1996), esto se debe a que tienen diferentes capacidades osmorreguladoras, siendo *B. lindahli* el que tiene un intervalo más amplio de osmorregulación comparado con *B. sandiegonensis* (Gonzalez *et al.*, 1996). En la zona norte de Baja California se encontró la especie *B. lindahli* en pozas con mayor grado de disturbio, es decir esas pozas se formaron sobre la carretera en terrenos donde se está comenzando la construcción de casas habitacionales. A diferencia de *B. sandiegonensis* que fue encontrado en pozas con agua transparente, el grado de disturbio en donde se encontró fue menor. En algunas localidades (Los Valles Las Palmas y de Guadalupe) estas pozas corren el riesgo de desaparecer debido a la expansión antropogénica, por tanto se amenaza la diversidad e integridad de la especie, esto convierte a esas localidades en sitios potenciales para la conservación.

Estudios futuros deben evaluar la dinámica de las pozas comparando su diversidad específica de acuerdo a la duración de la época de inundación de la poza, y su tamaño. También es relevante evaluar la relación entre el disturbio antropogénico y la calidad de agua, midiendo variables como cantidad de coliformes en el agua o productos de limpieza y relacionados al cultivo en el agua de las charcas, con la diversidad específica y genética.

4.2. Análisis de datos morfológicos

En la segunda hipótesis se planteó que se esperaban diferencias morfológicas regionales a lo largo de la distribución de cada especie en el norte de la península, dado que al estar alejadas geográficamente entre sí el flujo génico sería bajo por lo que se llegaría a una diferenciación morfológica. Dicha diferenciación podría suceder por adaptaciones locales a condiciones del microhábitat o que hubiera diferenciación morfológica producto del azar. Sin embargo, la variación fenotípica fue muy baja y esta hipótesis se rechaza.

Se observó un patrón de uniformidad fenotípica de ambas especies. Posiblemente esto se deba a que hay un alto grado de flujo genético o a que aunque se hallen los organismos distribuidos en diferentes regiones, las condiciones ambientales no son muy diferentes entre sí. Aunque también esta situación podría darse debido que aún conservan las características morfológicas de los colonizadores originales y se han mantenido a lo largo de diferentes eventos ambientales, ya que ese morfotipo es funcional en la zona hasta el momento. Esta falta de estructura morfológica ha sido observada en otros grandes branchiopodos de pozas temporales de California como es el caso de *Lepidurus packardi*, donde encuentran cinco linajes usando COI, pero no encuentran una diferenciación morfológica entre dichos linajes (Aguilar, 2012). A diferencia de especies europeas como el caso de *Chirocephalus kerkyrensis* que se distribuye en Italia y Grecia, y que exhibe una alta diversidad morfológica (Ketmaier *et al.*, 2012).

4.3. Diversidad genética de *B. sandiegonensis*

En el análisis del desequilibrio de ligamiento para los loci microsatelitales no se encontraron genes ligados por lo que la información obtenida de ellos no es redundante. Se detectó una desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg en algunas pozas, resultado del déficit de heterocigotos. Esto ya ha sido registrado para otras especies de anostracos y para *B. sandiegonensis* usando tanto microsatélites como alozimas (Davies *et al.*, 1997; Bohonak, 1998; Brendonck *et al.*, 2000; Andrews, 2013). Este resultado puede deberse a la presencia de alelos nulos, entre tanto su frecuencia en general es muy baja. También esa desviación se puede atribuir al efecto del traslape de generaciones dado por el banco de quistes (Bohonak, 2005). El apareamiento no al azar también puede causar esta

desviación, esto es apoyado por los valores positivos altos del índice de endogamia que se observan incluso en los locus con bajas frecuencias de alelos nulos (Tabla 8).

Los índices de endogamia positivos también han sido reportados en otros anostracos (Davies *et al.*, 1997; Bohonak, 1998; Brendonck *et al.*, 2000; Andrews, 2013). La endogamia se reporta principalmente en poblaciones pequeñas. No obstante para el caso de estas especies, este fenómeno puede suceder como resultado del proceso de colonización de pozas, de manera que, después de varias generaciones, la mayoría de los individuos provendrán de los fundadores, manteniendo una relación de parentesco entre los individuos de las pozas. Sin embargo, no todas las pozas presentaron índices positivos, lo que puede deberse a que en algunos sistemas de pozas hay más flujo genético que en otras. Este flujo se da principalmente por la presencia de vectores que son capaces de transportar a los quistes de un lugar a otro, siendo las aves migratorias a las que se les ha considerado como el vector principal de transporte de los quistes. Sin embargo considerando las pozas cercanas, lo más probable es que sea otro vector (vacas, maquinaria de cultivo, humanos), que este manteniendo el transporte de quistes dentro de los sistemas de pozas. Otra forma en que los quistes son transportados dentro del mismo archipiélago es en la temporada, cuando la poza está seca y existan vientos capaces de mover esos quistes de una poza a otra.

A nivel regional también se detectaron desviaciones del equilibrio de Hardy Weinberg en las cuatro regiones por déficit de heterocigotos y valores de F_{IS} altos. Sin embargo estos resultados pueden estarse debiendo nuevamente al traslape de generaciones dado por el banco de quistes (Bohonak, 2005) o a un efecto fundador, es decir que en cada región pudo haber llegado un grupo pequeño de colonizadores, estos proliferaron en las pozas de la región, y aunque exista intercambio de individuos dentro de las pozas de la misma región, todos provienen de los mismos fundadores.

La diversidad genética encontrada en las poblaciones de *B. sandiegonensis* es baja y similar entre pozas, en cuanto a los estimados de riqueza alélica, número efectivo de alelos y promedio de alelos por locus. Sin embargo, para los alelos privados son las pozas de Valle Las Palmas las que cuentan con la mayor cantidad de ellos, indicando la existencia

de un posible aislamiento o separación del resto de las poblaciones. Al haber pocos alelos privados en el resto de las pozas pertenecientes a las mesas, se infiere que existe un flujo genético que está homogenizando los acervos genéticos en esas poblaciones.

A nivel de región la diversidad genética es más alta comparada con las pozas, y hay una diferenciación en los estimados de número efectivo de alelos y número promedio de alelos, donde la Mesa La Misión y Valle Las Palmas presentan los estimados más altos. La riqueza alélica permanece similar en las cuatro regiones, mientras que los alelos privados diferencian a las regiones, siendo Valle Las Palmas la de mayor número de alelos, seguida de Mesa La Misión. Que se aumenten los estimados de diversidad a nivel regional comparado con el nivel de poza tiene que ver con que se está abarcando más área geográfica y por tanto más individuos. Sin embargo observando los resultados de los alelos privados nuevamente hay un indicativo del aislamiento o separación de Valle Las Palmas respecto a las otras regiones. La alta diversidad encontrada en Valle Las Palmas se deba a que fue un área llena de archipiélagos y debido a la expansión demográfica humana esas pozas se han ido perdiendo, y lo que se midió en este trabajo es un relictos de esa gran población que existió.

En la distribución sur de *B. sandiegonensis* en el norte de Baja California el promedio por locus es relativamente bajo comparado con lo encontrado para las poblaciones de *B. sandiegonensis* de EUA que es de 25.43 alelos por locus. Esto puede deberse al grado de fragmentación del hábitat donde se forman las pozas, ya que se ha visto que el disturbio no tiene un efecto aparente sobre la diferenciación genética de la especie (Andrews, 2013).

No se encontró una relación entre la diversidad genética de cada poza con su tamaño, de esto se deduce que hay otros factores que están influenciando la diversidad genética de la especie, podrían ser factores antropogénicos, podrían ser otros factores ambientales o la propia dinámica de la poza, es decir la complejidad de interacciones biológico-ambientales dentro de la poza. Con este resultado se rechaza la hipótesis donde se esperaba que en las pozas de mayor tamaño hubiera mayor riqueza genética.

4.4. Estructura genética de *B. sandiegonensis*

En la macroescala se encontraron dos componentes genéticos que están estructurados geográficamente. El primero está presente en el Valle Las Palmas y el otro está distribuido en las mesas. Probablemente esto es resultado de un aislamiento histórico de las dos regiones que puede estar relacionado con procesos geológicos o climáticos. El índice de estructuración entre ambas regiones es moderado (0.31), lo que indica que el flujo genético está siempre presente, pero es bajo, probablemente mediado por la distancia geográfica (soportado por los resultados) a la que se encuentran dichas regiones. Otros factores implicados en mantener un flujo genético bajo pueden ser tamaños poblacionales pequeños, lo que limita el número de migrantes por generación y un bajo número de vectores desplazándose entre regiones, por condiciones no propicias en el medio de las áreas. Futuros estudios son necesarios para corroborar esta hipótesis.

En el nivel de mesoescala el grupo formado por las tres Mesas: Jesús María, El Descanso y La Misión, está formado por tres componentes genéticos que no tienen una correspondencia geográfica con las mesas. Esto da el primer indicio de la existencia de un alto flujo genético entre las tres mesas, ese flujo se debe probablemente a las aves y también al efecto antropogénico, ya que al comenzar a crear caminos entre las mesas el paso de personas, ganado y autos es más frecuente provocando una mayor transporte de quistes de un sitio a otro.

Las distancias genéticas en general presentan un patrón de ser pequeñas a moderadas en pozas de la misma región y son grandes entre las pozas de diferente región. Sin embargo existen pozas como la MED05 (Mesa El Descanso) que tienen diferencias genéticas pequeñas con pozas de la Mesa La Misión y la EMI34 (El Mirador) que tiene diferenciación genética muy grande con pozas de la Mesa La Misión que son las más cercanas geográficamente. Estos resultados reflejan la alta conectividad que se da dentro de las regiones dado probablemente por el movimiento del ganado, u otros animales que no tienen la capacidad de moverse entre regiones como pequeños vertebrados, o por las máquinas usadas en la agricultura (Bohonak y Whiteman, 1999; Bilton *et al.*, 2001; Figuerola y Green, 2002). La baja estructuración entre estas regiones indica una conectividad pro-

blemente mediada por el transporte de quistes por las aves marinas migratorias que pasan a los esteros costeros durante su viaje.

En el nivel de microescala, en la Mesa La Misión existen dos componentes genéticos que no corresponden con la cercanía geográfica de las pozas de la mesa. Hay una mezcla de componentes en la mayoría de las pozas. Esto es evidencia del flujo genético existente, producto probablemente de los vectores como el ganado, personas y las máquinas usadas para el cultivo. Las distancias genéticas dentro de las localidades (Rancho Chichihuas y La Misión) son pequeñas y entre esas dos localidades son moderadas, comparadas con las distancias con El Mirador que son mayores. La poza de El Mirador se encuentra en la base de la Mesa, mientras que el resto de las pozas se encuentran en la cima de la mesa. Eventos históricos pudieron haberla separado de las pozas de la cima de la mesa, siendo que antes era parte de un paisaje continuo en altitud.

El AMOVA indica que la diferenciación genética entre y dentro de las localidades son similares, nuevamente los vectores que se mantienen dentro de la mesa son los que se encargan de mantener a las pozas conectadas, para el caso de la poza de El Mirador, si bien al separarse físicamente del resto de las pozas su conectividad disminuyó, esto no implica que se aisló por completo del resto, es decir sigue habiendo alguna ave u otro vertebrado o el mismo humano el que está manteniendo esa baja conectividad entre El Mirador con la cima de la Mesa. Tampoco se encontró un aislamiento por distancia, con esto se termina de enfatizar la existencia de una alta conectividad dentro de la mesa y en menor grado entre la base y la cima de la mesa.

Para las poblaciones de *B. sandiegonensis* de California se reportaron dos componentes genéticos (usando microsatélites), los cuales fueron difíciles de asignar por complejos de pozas o por poza. Esos dos grupos están separados por una zona de contacto bien definida donde el flujo génico es restringido (Andrews, 2013), este mismo escenario se repite en las poblaciones de Baja California, ya que en las regiones geográficas dentro del grupo costero de nivel mesoescala y en la Mesa La Misión a nivel microescala no se pueden definir la concordancia de los componentes genéticos con la geografía, pero a nivel macroescala es evidente que hay un contacto restringido entre los dos componentes

genéticos encontrados.

En la tercera hipótesis de trabajo se propone la existencia de una alta estructura genética en *B. sandiegonensis* dada por la baja dispersión de la especie y la cualidad de aislamiento de las pozas; esta hipótesis se acepta a nivel macroescala, pero es rechazada a nivel meso y microescala.

4.5. Citocromo Oxidasa I

La cuarta hipótesis de este trabajo propone que habrán linajes evolutivos diferentes resultado de un contacto restringido entre mesas y valles. Esta hipótesis se rechaza, ya que se encontró un solo linaje mitocondrial que se comparte con poblaciones de la especie en San Diego.

La diversidad haplotípica y nucleotídica es baja, los haplotipos encontrados son pocos y muy parecidos entre sí. Si se considera que el paisaje era altitudinalmente continuo, esta baja diversidad puede deberse a una separación reciente. Otra razón que puede explicar la baja diversidad es una colonización reciente de esta región y un efecto fundador marcado. Por lo que un análisis que considere la distribución en Baja California de la especie pueda dar mayor resolución de eventos históricos o más actuales relacionados con los niveles de diversidad y su distribución geográfica.

Los pocos individuos analizados pertenecen a un solo linaje que se distribuye desde esta región hasta las localidades de Lago Otay, Mesa Otay y Valle Marron (Bohonak, 2005). Sin embargo, aunque se comparte el linaje hay evidencia de haplotipos únicos en la región de Baja California. El linaje compartido puede ser resultado de ancestría compartida o del flujo genético entre las poblaciones de Baja California y EUA. El análisis de más individuos en esta región permitirá abordar estas preguntas.

En otras especies de los grandes branquiopodos en California se han reportado la existencia de varios linajes mitocondriales y la divergencia entre ellos puede ser alta, como es el caso de *Lepidurus packardii* que tiene cinco clados distribuidos en dos valles (dos clados en una valle y los otros tres clados en el otro valle) este patrón filogeográfico lo

atribuyen a la historia de vida, las interacciones históricas y al régimen climático reciente que es diferente en ambos valles (Aguilar, 2012). Pero también está el caso contrario, en la especie *B. lynchi* que se distribuye al centro de California, no hay evidencia de la existencia de un patrón de estructura filogeográfico claro, para este caso son la dispersión limitada de la especie y la diversificación subregional los posibles causantes de ese patrón (Aguilar, 2010). Aun aumentando el área de estudio como es el caso de la especie europea *Chirocephalus kerkyrensis* que se encuentra en pozas de Italia y Albania, donde existen tres linajes, dos restringidos a cada una de las áreas, pero el tercero es un linaje compartido, sigue manifestándose ese intercambio de individuos a través de grandes distancias (Ketmaier *et al.*, 2012).

Los tres casos anteriores registran haplotipos únicos restringidos a una sola localidad, y lo mismo sucede en *B. sandiegonensis* (Bohonak, 2005; Aguilar, 2010, 2012; Ketmaier *et al.*, 2012). Esto fue observado en las pocas muestras que se tienen en este trabajo. Sin embargo falta por explorar más la parte de los linajes mitocondriales su distribución, diversidad y estructura en las regiones de Baja California.

El impacto de las actividades antropogénicas sobre las pozas temporales, principalmente el cambio acelerado de uso de suelo, así como la baja diversidad genética y morfológica encontrada en *B. sandiegonensis* y el flujo genético restringido a nivel regional, convierte a esta especie en un objetivo vulnerable a la extinción local de sus poblaciones. Por ello es necesario dirigir esfuerzos de conservación para preservar las pozas y por ende las especies que las habitan.

Capítulo 5. Conclusiones

Se identificaron dos especies del género *Branchinecta* en el norte de Baja California: *B. sandiegonensis* Fugate, 1993 y *B. lindahli* Packard, 1883.

Se amplió el intervalo de distribución hacia el sur para *B. sandiegonensis*, además se aumentaron los registros para *B. lindahli* en la región.

Se observó que no hay diferencias fenotípicas entre poblaciones de la misma especie a lo largo de la región norte de Baja California. Se logró la estandarización de cinco micro-satélites nucleares para *B. sandiegonensis*, así como la secuenciación del gen Citocromo Oxidasa subunidad I (COI).

Las desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg encontradas en algunas pozas, así como los valores positivos de F_{IS} son probablemente debidos a la endogamia.

A nivel nuclear, se encontró una estructura geográfica fuerte entre Valle Las Palmas y el resto de las regiones muestreadas. Entre tanto, en las pozas de la región costera hay evidencia de altas tasas de flujo genético, siendo mayores dentro de las mesas que entre las mesas.

Se encontró un linaje mitocondrial en *B. sandiegonensis* que también se ha registrado en la parte norte de la distribución de la especie. Se encontraron tres haplotipos únicos restringidos a Valle Las Palmas, Mesa Jesús María y Mesa La Misión.

Al haber encontrado una baja diversidad genética y la baja conectividad entre Valle Las Palmas y las demás mesas, se evidencia el riesgo en que se encuentran las pozas de esta región, aunado la expansión antropogénica que se está presentando allí la cual ya acabó con un alto porcentaje de las pozas temporales, poniendo en riesgo la permanencia de componente genético único.

En el caso de las pozas de las demás mesas, si bien hay una alta conectividad entre ellas, también hay un cierto grado de impacto antropogénico que las amenaza. Es necesario medir ese impacto y valorar la situación de esas pozas para su conservación.

Se desconoce la existencia de una sucesión de especies a lo largo del tiempo en las pozas en la región de Baja California, o si permanece una sola especie a lo largo del tiempo de vida de la poza. Es necesario realizar estudios que aborden muestreos multitemporales.

Se midió la diversidad genética de una sola especie (*B. sandiegonensis*) que habita pozas con bajo disturbio y se analizó en época de lluvias atípicas; falta medir la diversidad genética de *B. lindahli* que habita pozas y zonas con alto grado de disturbio e impacto antropogénico. Además de hacer un trabajo comparativo de la diversidad genética de la especie *B. sandiegonensis* en la temporada de pocas lluvias contra una temporada de lluvias altas como lo que se espera a la llegada del fenómeno El Niño.

Hace falta determinar la relación filogeográfica de *B. sandiegonensis* en la región norte de Baja California con las poblaciones de San Diego. Lo mismo sucede con *B. lindahli*, con ello se podría conocer la historia de colonización de *B. lindahli* en la península.

Lista de referencias bibliográficas

- Aguilar, A. (2010). Weak phylogeographic structure in the endemic western north american fairy shrimp *Branchinecta lynchi* (Eng, Belk and Erickson 1990). *Aquatic Sciences*, **73**(1): 15–20. DOI: 10.1007/s00027-010-0155-6.
- Aguilar, A. (2012). Range-wide and local drivers of genetic structure in an endangered California vernal pool endemic crustacean. *Conservation Genetics*, **13**(6): 1577–1588. DOI: 10.1007/s10592-012-0405-3.
- Aguirre-Planter, E. (2007). Flujo génico: métodos para estimarlo y marcadores moleculares. En: L. E. Eguiarte, V. Souza, y X. Aguirre (eds.), *Ecología Molecular*. SEMARNAT, INE, UNAM, CONABIO, capítulo 2, pp. 49–62.
- Allaire, J. (2011). Rstudio: Integrated development environment for r. En: *The R User Conference, use R! 2011 August 16-18 2011 University of Warwick, Coventry, UK*. p. 14.
- Allendorf, F. W. y Luikart, G. (2009). *Conservation and the genetics of populations*. John Wiley & Sons, 2da. ed. p. 630.
- Andrews, J. (2013). *Conservation genetics of the endangered San Diego fairy shrimp (Branchinecta sandiegonensis)*. Tesis de maestría, San Diego State University.
- Andrews, J. M., Bohonak, A. J., y Simovich, M. A. (2013). Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the endangered San Diego fairy shrimp (*Branchinecta sandiegonensis*). *Conservation Genetics Resources*, **6**(2): 401–403. DOI: 10.1007/s12686-013-0103-6.
- Avice, J. C. (2000). *Phylogeography: The history and formation of species*. Harvard University Press, 3era. ed. Massachusetts, p. 453.
- Baskin, Y. (1994). California's ephemeral vernal pools may be a good model for speciation. *BioScience*, **44**(6): 384–388. DOI: 10.2307/1312360.
- Bauder, E. T. y McMillan, S. (1998). Current distribution and historical extent of vernal pools in southern California and northern Baja California, Mexico. En: C. Witham, E. T. Bauder, D. Belk, W. R. J. Ferren, y R. Ornduff (eds.), *Ecology, conservation, and management of vernal pool ecosystems proceedings from a 1996 conference*, Sacramento, California. pp. 56–70.
- Begon, M., Townsend, C., y Harper, J. (2006). *Ecology: from individuals to ecosystems*. MA: Blackwell Publishing. p. 759.
- Belk, D. y Brtek, J. (1995). Checklist of the anostraca. En: *Studies on Large Branchiopod Biology and Aquaculture II*. Springer Science Mathplus Business Media, pp. 315–353. DOI: 10.1007/978-94-011-0291-9_30.
- Belk, D. y Brtek, J. (1997). Checklist of the anostraca. *Hydrobiologia*, **359**(1/3): 243–245. DOI: 10.1023/a:1003172516989.

- Belk, D. y Fugate, M. (2000). Two new *Branchinecta* (Crustacea: Anostraca) from the southwestern United States. *The Southwestern Naturalist*, **45**(2): 111. DOI: 10.2307/3672450.
- Belk, D. y Rogers, D. C. (2002). A confusing trio of *Branchinecta* (Crustacea: Anostraca) from the western north america with a description of a new species. *Hydrobiologia*, **486**(1): 49–55. DOI: 10.1023/a:1021374012622.
- Bermingham, E. y Moritz, C. (1998). Comparative phylogeography: concepts and applications. *Molecular Ecology*, **7**(4): 367–369. DOI: 10.1046/j.1365-294x.1998.00424.x.
- Bilton, D. T., Freeland, J. R., y Okamura, B. (2001). Dispersal in freshwater invertebrates. *Annual review of ecology and systematics*, pp. 159–181.
- Biosystems, A. (2006). Peak Scanner Software TM Reference Guide. Recuperado el 15-06-2015 en: [https:// products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/ redirect/ab?cmd=catNavigate2&catID=600583 &tab=DetailInfo](https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/redirect/ab?cmd=catNavigate2&catID=600583&tab=DetailInfo).
- Bohonak, A. J. (1998). Genetic population structure of the fairy shrimp *Branchinecta coloradensis* (Anostraca) in the rocky mountains of colorado. *Canadian Journal of Zoology*, **76**(11): 2049–2057. DOI: 10.1139/cjz-76-11-2049.
- Bohonak, A. J. (2005). Coservation genetics of the endangered fairy shrimp species *Branchinecta sandiegonensis*. Reporte técnico, Department of Biology, San Diego State University. Reporte técnico.
- Bohonak, A. J. y Whiteman, H. H. (1999). Dispersal of the fairy shrimp *Branchinecta coloradensis* (Anostraca): Effects of hydroperiod and salamanders. *Limnology and Oceanography*, **44**(3): 487–493. DOI: 10.4319/lo.1999.44.3.0487.
- Brendonck, L., De Meester, L., y Riddoch, B. J. (2000). Regional structuring of genetic variation in short-lived rock pool populations of *Branchipodopsis wolffi* (Crustacea: Anostraca). *Oecologia*, **123**(4): 506–515.
- Brendonck, L., Rogers, D. C., Olesen, J., Weeks, S., y Hoeh, W. R. (2007). Global diversity of large branchiopods (Crustacea: Branchiopoda) in freshwater. *Hydrobiologia*, **595**(1): 167–176. DOI: 10.1007/s10750-007-9119-9.
- Brown, J. W., Wier, H. A., y Belk, D. (1993). New records of fairy shrimp (Crustacea: Anostraca) from Baja California, Mexico. *The Southwestern Naturalist*, **38**(4): 389. DOI: 10.2307/3671624.
- Chapuis, M.-P. y Estoup, A. (2006). Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution*, **24**(3): 621–631. DOI: 10.1093/molbev/msl191.
- Daborn, G. (1976). Colonization of isolated aquatic habitats. *Canadian Field Naturalist*, **90**: 56–57.

- Davies, C. P., Simovich, M. A., y Hathaway, S. A. (1997). Population genetic structure of a California endemic branchiopod, *Branchinecta sandiegonensis*. En: *Studies on Large Branchiopod Biology and Conservation*. Springer Science Mathplus Business Media, pp. 149–158. DOI: 10.1007/978-94-017-3177-5_15.
- Deiner, K., Hull, J. M., y May, B. (2013). Eight novel microsatellite loci developed from vernal pool fairy shrimp. *Journal of Fish and Wildlife Management*, **4**(1): 134–138. DOI: 10.3996/112012-jfw-096.
- Domínguez-Domínguez, O. y Vázquez-Domínguez, E. (2009). Filogeografía: aplicaciones en taxonomía y conservación. *Animal biodiversity and conservation*, **32**(1): 59–70.
- Eguiarte, L. E. y Souza, V. (2007). Introducción a la ecología molecular. En: L. E. Eguiarte, V. Souza, y X. Aguirre (eds.), *Ecología Molecular*. SEMARNAT, INE, UNAM, CONABIO, capítulo Introducción, pp. 1–6.
- Eng, L. L., Belk, D., y Eriksen, C. H. (1990). Californian anostraca: distribution, habitat, and status. *Journal of Crustacean Biology*, **10**(2): 247. DOI: 10.2307/1548485.
- Eriksen, C. H. y Belk, D. (1999). *Fairy shrimps of California's puddles, pools, and playas*. Mad River Press. p. 200.
- Evanno, G., Regnaut, S., y Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology*, **14**(8): 2611–2620. DOI: 10.1111/j.1365-294x.2005.02553.x.
- Excoffier, L. y Lischer, H. E. L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under linux and windows. *Molecular Ecology Resources*, **10**(3): 564–567. DOI: 10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x.
- Figuerola, J. y Green, A. J. (2002). Dispersal of aquatic organisms by waterbirds: a review of past research and priorities for future studies. *Freshwater biology*, **47**(3): 483–494. DOI: 10.1046/j.1365-2427.2002.00829.x.
- Frankham, R., Briscoe, D. A., y Ballou, J. D. (2002). *Introduction to conservation genetics*. Cambridge University Press. p. 619.
- Fugate, M. (1993). *Branchinecta sandiegonensis*, a new species of fairy shrimp (Crustacea: Anostraca) from western north america. *Proceedings-Biological Society of Washington*, **106**: 296–296.
- Futuyma, D. J. (2005). *Evolution*. Sinauer Associates, Inc., 2da. ed. p. 608.
- Gonzalez, R. J., Drazen, J., Hathaway, S., Bauer, B., y Simovich, M. (1996). Physiological correlates of water chemistry requirements in fairy shrimps (anostraca) from southern California. *Journal of Crustacean Biology*, **16**(2): 315. DOI: 10.2307/1548889.
- Goudet, J. (2001). FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices. Recuperado el 17-06-2015 en: <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.

- Hall, T. A. (1999). Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/nt. En: *Nucleic acids symposium series*. Vol. 41, pp. 95–98.
- Hathaway, S. A. y Simovich, M. A. (1996). Factors affecting the distribution and co-occurrence of two southern californian anostracans (Branchiopoda), *Branchinecta sandiegonensis* and *Streptocephalus woottoni*. *Journal of Crustacean Biology*, **16**(4): 669–677. DOI: 10.1163/193724096x00757.
- Hobson, W. A. y Dahlgren, R. A. (1998). Soil forming processes in vernal pools of northern california, chico area. *Ecology, conservation, and management of vernal pool ecosystems*, pp. 24–37.
- Holland, R. F. y Jain, S. K. (1981). Insular biogeography of vernal pools in the central valley of California. *American Naturalist*, pp. 24–37.
- Horne, F. (1967). Effects of physical-chemical factors on the distribution and occurrence of some southeastern Wyoming phyllopods. *Ecology*, **48**(3): 472. DOI: 10.2307/1932682.
- Hubisz, M. J., Falush, D., Stephens, M., y Pritchard, J. K. (2009). Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources*, **9**(5): 1322–1332. 10.1111/j.1755-0998.2009.02591.x.
- Huston, M. A. y Huston, M. A. (1994). *Biological diversity: the coexistence of species*. Cambridge University Press. p. 685.
- INEGI (2014). Información por entidad: Baja California. Recuperado en 03-08-2014 en: <http://cuentame.inegi.gob.mx/monografias/informacion/bc/territorio/clima.aspx?tema=me&e=02>.
- Ivors, K., Gaberlotto, M., Vries, I. D. E., Ruyter-Spira, C., Hekkert, B. T., Rosenzweig, N., y Bonants, P. (2006). Microsatellite markers identify three lineages of *Phytophthora ramorum* in US nurseries, yet single lineages in US forest and european nursery populations. *Molecular Ecology*, **15**(6): 1493–1505. DOI: 10.1111/j.1365-294x.2006.02864.x.
- Keeley, J. E. y Zedler, P. H. (1998). Characterization and global distribution of vernal pools. En: *Ecology, conservation, and management of vernal pool ecosystems, proceedings from 1996 conference*. Vol. 1, p. 14.
- Ketmaier, V., Marrone, F., Alfonso, G., Paulus, K., Wiemann, A., Tiedemann, R., y Mura, G. (2012). Mitochondrial DNA regionalism and historical demography in the extant populations of *Chirocephalus kerkyrensis* (Branchiopoda: Anostraca). *PLoS ONE*, **7**(2): e30082. DOI: 10.1371/journal.pone.0030082.
- King, J. L., Simovich, M. A., y Brusca, R. C. (1996). Species richness, endemism and ecology of crustacean assemblages in northern California vernal pools. *Hydrobiologia*, **328**(2): 85–116. DOI: 10.1007/bf00018707.
- Kumar, P., Gupta, V., Misra, A., Modi, D., Pandey, B., et al. (2009). Potential of molecular markers in plant biotechnology. *Plant Omics Journal*, **2**(4): 141–162.

- Li, Y.-C., Korol, A. B., Fahima, T., Beiles, A., y Nevo, E. (2002). Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology*, **11**(12): 2453–2465. DOI: 10.1046/j.1365-294x.2002.01643.x.
- Librado, P. y Rozas, J. (2009). Dnasp v5: a software for comprehensive analysis of dna polymorphism data. *Bioinformatics*, **25**(11): 1451–1452.
- Loreau, M., Naeem, S., Inchausti, P., Bengtsson, J., Grime, J. P., Hector, A., Hooper, D. U., Hutson, M. A., Raffaelli, D., Schmid, B., Tilman, D., y Wardle, D. A. (2001). Biodiversity and ecosystem functioning: current knowledge and future challenges. *Science*, **294**(5543): 804–808. DOI: 10.1126/science.1064088.
- Losos, J. B. y Ricklefs, R. E., (eds.) (2010). *The theory of Island Biogeography revisited*. Princeton University Press. Nueva Jersey, p. 495.
- Lynch, J. E. (1964). Packard's and pearse's species of *Branchinecta*: Analysis of a nomenclatural involvement. *American Midland Naturalist*, **71**(2): 466. DOI: 10.2307/2423306.
- MacArthur, R. H. y Wilson, E. O. (1963). An equilibrium theory of insular zoogeography. *Evolution*, pp. 373–387.
- MacArthur, R. H. y Wilson, E. O. (1967). *The theory of Island Biogeography*, Vol. 1. Princeton University Press. Nueva Jersey, p. 203.
- Maeda-Martínez, A. M. (1991). Distribution of species of Anostraca, Notostraca, Spinicaudata, and Laevicaudata in Mexico. En: *Studies on Large Branchiopod Biology and Aquaculture*. Springer Science Mathplus Business Media, pp. 209–219. DOI: 10.1007/978-94-011-3366-1_24.
- Maeda-Martínez, A. M., Belk, D., Obregón-Barboza, H., y Dumont, H. J. (1997a). Large branchiopod assemblages common to Mexico and the United States. En: *Studies on Large Branchiopod Biology and Conservation*. Springer Science Mathplus Business Media, pp. 45–62. DOI: 10.1007/978-94-017-3177-5_6.
- Maeda-Martínez, A. M., Obregón-Barboza, H., y García-Velazco, H. (1997b). New records of large branchiopods (Branchiopoda: Anostraca, Notostraca, and Spinicaudata) in Mexico. *Hydrobiologia*, **359**(1/3): 63–69. DOI: 10.1023/a:1003142332493.
- Maeda-Martínez, A. M., Worthington, R. D., y Rogers, D. C. (2005). First records of the fairy shrimp *Streptocephalus moorei* (Branchiopoda: Anostraca) from the United States. *Journal of Crustacean Biology*, **25**(4): 547–550. DOI: 10.1651/c-2582.1.
- Magalon, H., Adjeroud, M., y Veuille, M. (2005). Patterns of genetic variation do not correlate with geographical distance in the reef-building coral *Pocillopora meandrina* in the south pacific. *Molecular Ecology*, **14**(7): 1861–1868. DOI: 10.1111/j.1365-294x.2005.02430.x.
- Morrison, D. A. (2005). Networks in phylogenetic analysis: new tools for population biology. *International Journal for Parasitology*, **35**(5): 567–582. DOI: 10.1016/j.ijpara.2005.02.007.

- Morrone, J. J. y Llorente-Bousquets, J. (2003). *Una perspectiva latinoamericana de la biogeografía*. UNAM. p. 315.
- Olsen, K. M. y Schaal, B. A. (2001). Microsatellite variation in cassava (*Manihot esculenta*, Euphorbiaceae) and its wild relatives: further evidence for a southern amazonian origin of domestication. *American Journal of Botany*, **88**(1): 131–142.
- Peakall, R. y Smouse, P. E. (2012). GenAlEx 6.5: genetic analysis in excel. population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics*, **28**(19): 2537–2539. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts460.
- Posada, D. (2008). jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, **25**(7): 1253–1256. DOI: 10.1093/molbev/msn083.
- Pyke, C. R. (2005). Interactions between habitat loss and climate change: Implications for fairy shrimp in the central valley ecoregion of California, USA. *Climatic Change*, **68**(1-2): 199–218. DOI: 10.1007/s10584-005-6011-3.
- QIAGEN (2006). DNeasy Blood & Tissue Handbook For purification of total DNA from animal blood animal tissue insects. Recuperado el 18-09-2014 en: <https://www.qiagen.com/aw/resources/resourcedetail?id=6b09dfb8-6319-464d-996c-79e8c7045a50&lang=en>.
- Queller, D. C., Strassmann, J. E., y Hughes, C. R. (1993). Microsatellites and kinship. *Trends in Ecology & Evolution*, **8**(8): 285–288. DOI: 10.1016/0169-5347(93)90256-o.
- Raymond, M. y Rousset, F. (1995). Genepop (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, **86**(3): 248–249.
- Rentería-Alcántara, M. (2007). Breve revisión de los marcadores moleculares. En: L. E. Eguiarte, V. Souza, y X. Aguirre (eds.), *Ecología Molecular*. SEMARNAT, INE, UNAM, CONABIO, capítulo 18, pp. 541–566.
- Retallack, J. T. y Clifford, H. F. (1980). Periodicity of crustaceans in a saline prairie stream of Alberta, Canada. *American Midland Naturalist*, **103**(1): 123. DOI: 10.2307/2425046.
- Rice, W. R. (1989). Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, **43**(1): 223. DOI: 10.2307/2409177.
- Ripley, B. J. y Simovich, M. A. (2008). Species richness on islands in time: variation in ephemeral pond crustacean communities in relation to habitat duration and size. *Hydrobiologia*, **617**(1): 181–196. DOI: 10.1007/s10750-008-9548-0.
- Ripley, B. J., Holtz, J., y Simovich, M. A. (2004). Cyst bank life-history model for a fairy shrimp from ephemeral ponds. *Freshwater Biology*, **49**(3): 221–231. DOI: 10.1111/j.1365-2427.2004.01179.x.
- Rogers, D. C. (2002). Female-based characters for Anostracan (Crustacea: Branchiopoda) identification: A key for species of California and Oregon, USA. *Hydrobiologia*, **486**(1): 125–132. DOI: 10.1023/a:1021390416256.

- Rogers, D. C. (2006). Three new species of *Branchinecta* (Crustacea: Branchiopoda: Anostraca) from the nearctic. *Zootaxa*, **1126**: 35–51.
- Rogers, D. C. (2013). Anostraca catalogus (Crustacea: Branchiopoda). *The Raffles Bulletin of Zoology*, **61**(2): 525–546.
- Rogers, D. C. y Fugate, M. (2001). *Branchinecta hiberna*, a new species of fairy shrimp (Crustacea: Anostraca) from western north america. *Western North American Naturalist*, **61**(1): 11–18.
- Schneider, D. W. y Frost, T. M. (1996). Habitat duration and community structure in temporary ponds. *Journal of the North American Benthological Society*, **15**(1): 64. DOI: 10.2307/1467433.
- Simovich, M. A. (1996). Crustacean Biodiversity and Endemism in California's Ephemeral Wetlands. En: C. W. Witham, E. T. Bauder, D. Belk, W. R. J. Ferren, y R. Ornduff (eds.), *Ecology, conservation, and management of Vernal pool ecosystems*, Sacramento, California. Vol. 2492, pp. 107–118.
- Simovich, M. A. y Hathaway, S. A. (1997). Diversified bet-hedging as a reproductive strategy of some ephemeral pool anostracans (Branchiopoda). *Journal of Crustacean Biology*, **17**(1): 38. DOI: 10.2307/1549460.
- Simovich, M. A., Bohonak, A. J., y Davis, K. B. (2013). Landscape homogenization threatens the genetic integrity of the endangered San Diego fairy shrimp *Branchinecta sandiegonensis* (Branchiopoda: Anostraca). *Journal of Crustacean Biology*, **33**(5): 730–740. DOI: 10.1163/1937240x-00002164.
- Sunnucks, P. (2000). Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology & Evolution*, **15**(5): 199–203. DOI: 10.1016/s0169-5347(00)01825-5.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., y Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, **30**(12): 2725–2729. DOI: 10.1093/molbev/mst197.
- ThermoScientific (2008). T009-Technical bulletin NanoDrop 1000 y 8000. 260/280 and 260/230 Ratios. Recuperado el 19-09-2014 en: <http://www.nanodrop.com/>.
- Thiery, R. G. (1982). Environmental instability and community diversity. *Biological Reviews*, **57**(4): 691–710. DOI: 10.1111/j.1469-185x.1982.tb00377.x.
- U. S. Fish and Wildlife Service (2008). San Diego fairy shrimp (*Branchinecta sandiegonensis*). 5-year review: Summary and evaluation. Recuperado el 04-05-2014 en: http://ecos.fws.gov/tess_public/profile/speciesProfile.action?spcode=K049.
- Vandergast, A. G., Wood, D. A., Simovich, M., y Bohonak, A. J. (2009). Identification of co-occurring *Branchinecta* fairy shrimp species from encysted embryos using multiplex polymerase chain reaction. *Molecular Ecology Resources*, **9**(3): 767–770. DOI: 10.1111/j.1755-0998.2009.02522.x.
- Walker, B. H. (1992). Biodiversity and ecological redundancy. *Conservation Biology*, **6**(1): 18–23. DOI: 10.1046/j.1523-1739.1992.610018.x.

- Weekers, P. (2002). Phylogenetic analysis of anostracans (Branchiopoda: Anostraca) inferred from nuclear 18s ribosomal DNA (18s rDNA) sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **25**(3): 535–544. DOI: 10.1016/s1055-7903(02)00289-0.
- Zickovich, J. M. y Bohonak, A. J. (2007). Dispersal ability and genetic structure in aquatic invertebrates: a comparative study in southern California streams and reservoirs. *Freshwater Biology*, **52**(10): 1982–1996. DOI: 10.1111/j.1365-2427.2007.01822.x.

Apéndice A. Base de datos Microsatélites

Muestra	Poza	BsH106		BsB201		BsH120		BsB8		BsH101	
CHI15016	CHI15	130	130	397	399	246	246	143	155	318	318
CHI15018	CHI15	130	130	397	397	254	432	151	151	318	318
CHI15019	CHI15	118	118	397	399	246	246	147	151	0	0
CHI15020	CHI15	130	130	397	399	246	246	143	143	318	318
CHI15021	CHI15	130	130	397	397	0	0	161	161	318	318
CHI15025	CHI15	118	130	397	397	246	246	143	143	318	318
CHI15064	CHI15	130	130	397	397	246	262	143	169	318	318
CHI15065	CHI15	130	130	397	399	246	246	147	147	318	318
CHI16038	CHI16	130	142	399	399	246	266	147	147	318	318
CHI16039	CHI16	130	142	397	397	246	246	143	155	318	318
CHI16042	CHI16	130	142	397	397	246	246	165	177	318	318
CHI16044	CHI16	130	130	399	399	246	266	149	155	318	318
CHI16054	CHI16	130	142	397	397	0	0	155	155	318	318
CHI16056	CHI16	142	142	397	397	266	266	155	155	0	0
CHI16057	CHI16	130	130	397	397	246	246	155	155	318	318
CHI16053	CHI16	0	0	397	397	266	266	149	161	318	318
CHI17076	CHI17	130	138	397	397	246	404	169	169	318	318
CHI17078	CHI17	118	130	397	397	246	266	147	161	318	318
CHI17080	CHI17	118	130	397	397	254	254	149	149	318	318
CHI17081	CHI17	130	130	397	397	246	246	159	159	0	0
CHI17088	CHI17	130	130	397	399	266	266	143	143	0	0
CHI17089	CHI17	138	142	397	397	246	266	147	147	318	318
CHI17090	CHI17	130	134	397	397	404	404	143	159	318	318
CHI17091	CHI17	130	130	397	397	0	0	147	147	318	318
CHI17093	CHI17	118	118	397	397	246	246	143	155	318	318
EMI34347	EMI34	118	118	397	397	396	400	147	155	318	318
EMI34348	EMI34	118	118	397	397	254	254	147	147	0	0
EMI34349	EMI34	118	118	397	397	266	266	147	155	318	318
EMI34350	EMI34	118	118	397	399	254	254	155	155	318	318
EMI34351	EMI34	118	118	399	399	254	400	147	155	318	318
EMI34352	EMI34	118	118	397	399	254	266	155	155	318	318
EMI34353	EMI34	118	118	397	399	266	266	147	155	318	318
EMI34354	EMI34	118	118	399	399	254	254	147	155	318	318
EMI34356	EMI34	118	118	397	399	254	408	155	155	318	318
EMI34357	EMI34	118	118	397	397	254	266	147	155	318	318
MED01243	MED01	118	138	397	397	246	246	147	161	0	0
MED01244	MED01	118	138	389	397	246	246	147	161	0	0
MED01245	MED01	118	118	389	397	262	262	161	161	0	0
MED01246	MED01	118	118	389	399	246	364	161	169	0	0
MED01249	MED01	118	118	389	389	246	246	143	169	318	318
MED01250	MED01	118	118	389	397	246	262	161	161	318	318
MED01251	MED01	118	118	397	397	246	258	161	161	0	0
MED01252	MED01	118	138	389	397	246	262	161	161	318	318

Muestra	Poza	BsH106		BsB201		BsH120		BsB8		BsH101	
MED01285	MED01	118	118	389	389	246	262	161	161	318	318
MED01286	MED01	138	138	389	399	250	250	161	161	0	0
MED02253	MED02	118	118	389	397	0	0	147	161	318	318
MED02254	MED02	138	138	389	399	246	246	161	161	0	0
MED02255	MED02	138	138	397	399	246	262	147	161	0	0
MED02257	MED02	118	118	397	399	246	246	161	161	318	318
MED02258	MED02	118	138	397	399	262	262	147	161	0	0
MED02259	MED02	138	138	397	399	246	246	161	161	318	318
MED02260	MED02	118	118	397	397	246	246	169	169	0	0
MED02261	MED02	118	138	389	397	246	246	161	169	318	318
MED02262	MED02	118	130	397	399	246	262	161	161	0	0
MED05264	MED05	118	142	397	397	246	254	155	155	0	0
MED05265	MED05	126	134	395	399	246	324	147	159	0	0
MED05269	MED05	118	134	397	399	246	266	149	149	318	318
MED05272	MED05	118	130	397	399	246	262	147	155	0	0
MED05387	MED05	118	142	397	397	0	0	167	167	318	318
MED05388	MED05	118	138	397	397	246	246	167	167	0	0
MED05389	MED05	0	0	397	397	246	246	153	153	318	318
MED05390	MED05	138	142	397	399	0	0	147	147	318	318
MJM35367	MJM35	130	130	397	397	250	250	143	143	0	0
MJM35368	MJM35	130	130	397	397	294	294	143	175	0	0
MJM35369	MJM35	130	138	397	397	310	310	151	151	318	318
MJM35370	MJM35	130	134	397	399	250	294	147	147	318	318
MJM35371	MJM35	130	130	397	395	294	294	149	149	318	318
MJM35373	MJM35	130	138	397	397	250	262	143	143	0	0
MJM35374	MJM35	0	0	397	397	250	294	181	181	318	318
MJM35375	MJM35	130	138	397	397	250	250	159	159	0	0
MLM01026	MLM01	122	142	397	397	254	254	143	147	318	318
MLM01027	MLM01	122	130	397	397	246	246	155	155	318	318
MLM01028	MLM01	122	130	397	399	246	246	143	155	318	318
MLM01029	MLM01	122	138	397	397	246	266	143	155	318	318
MLM01030	MLM01	122	122	397	399	266	396	143	147	318	318
MLM01031	MLM01	118	130	397	397	0	0	147	147	318	318
MLM01032	MLM01	118	122	397	397	246	324	143	147	318	318
MLM01033	MLM01	122	122	397	399	246	400	143	155	318	318
MLM01034	MLM01	118	122	397	397	246	246	143	155	318	318
MLM01036	MLM01	118	142	397	399	266	266	143	143	318	318
MLM23147	MLM23	122	142	397	397	246	246	155	155	0	0
MLM23148	MLM23	118	142	397	397	246	266	147	147	318	318
MLM23150	MLM23	122	142	397	397	246	266	149	149	318	318
MLM23151	MLM23	122	142	397	399	246	246	147	159	318	318
MLM23152	MLM23	118	142	397	397	266	408	147	155	318	318
MLM23153	MLM23	142	142	397	397	0	0	149	155	318	318
MLM23154	MLM23	122	130	397	397	246	254	155	161	318	318

Muestar	Poza	BsH106		BsB201		BsH120		BsB8		BsH101	
MLM23155	MLM23	130	142	397	397	246	246	147	147	318	318
MLM23156	MLM23	130	142	397	397	246	266	149	159	318	318
MLM23157	MLM23	0	0	397	397	246	266	155	161	318	318
MLM25175	MLM25	122	122	389	397	0	0	143	159	318	318
MLM25176	MLM25	122	122	397	397	246	324	147	149	318	318
MLM25177	MLM25	122	122	397	397	246	266	149	159	318	318
MLM25178	MLM25	122	138	397	399	246	258	159	161	318	318
MLM25179	MLM25	122	142	395	397	246	266	147	161	318	318
MLM25180	MLM25	122	122	389	397	246	246	149	149	318	318
MLM25181	MLM25	110	122	397	397	246	254	159	161	318	318
MLM25182	MLM25	122	122	397	397	258	258	149	159	318	318
MLM25183	MLM25	122	122	397	397	246	258	149	159	318	318
MLM25184	MLM25	122	122	397	397	400	400	147	155	318	318
MLM28205	MLM28	118	142	397	397	254	254	143	143	318	318
MLM28206	MLM28	0	0	389	397	254	254	143	143	318	318
MLM28207	MLM28	130	130	397	397	254	254	143	147	318	318
MLM28208	MLM28	130	130	389	397	246	246	143	147	318	318
MLM28209	MLM28	130	142	397	397	246	266	147	147	318	318
MLM28210	MLM28	118	130	389	397	246	266	143	147	0	0
MLM28211	MLM28	130	130	397	397	266	266	143	143	0	0
MLM28212	MLM28	118	130	397	397	246	266	147	147	318	318
MLM28213	MLM28	118	142	397	397	246	246	143	147	318	318
MLM28214	MLM28	118	142	389	397	246	254	143	147	0	0
VLP31287	VLP31	122	122	399	399	274	274	179	187	318	318
VLP31288	VLP31	122	122	399	399	274	278	161	179	318	318
VLP31289	VLP31	122	122	399	401	278	278	161	173	318	318
VLP31290	VLP31	122	122	399	401	274	278	183	183	318	318
VLP31291	VLP31	122	122	399	401	286	290	143	191	318	318
VLP31292	VLP31	122	122	399	401	278	278	179	179	0	0
VLP31293	VLP31	122	122	399	399	278	278	175	175	0	0
VLP31294	VLP31	122	122	399	401	278	278	161	161	318	318
VLP31295	VLP31	122	122	399	401	278	286	181	181	318	318
VLP31296	VLP31	122	122	399	399	274	286	177	177	318	318
VLP32307	VLP32	122	122	399	399	286	286	185	185	0	0
VLP32308	VLP32	122	122	399	401	278	278	161	173	318	318
VLP32309	VLP32	122	122	401	401	274	278	197	197	318	318
VLP32310	VLP32	122	122	399	403	274	274	163	173	318	318
VLP32311	VLP32	122	122	399	403	274	286	185	185	0	0
VLP32318	VLP32	122	122	399	401	266	274	175	183	0	0
VLP32319	VLP32	122	122	401	401	274	278	171	179	318	318
VLP32320	VLP32	122	122	399	401	278	286	175	175	318	318
VLP32321	VLP32	122	122	399	401	274	290	163	177	0	0
VLP32322	VLP32	122	122	401	403	278	278	177	181	318	318

Muestra	Poza	BsH106		BsB201		BsH120		BsB8		BsH101	
VLP33327	VLP33	122	122	401	401	246	278	179	179	318	318
VLP33328	VLP33	122	122	399	401	278	278	163	163	318	318
VLP33329	VLP33	122	122	399	399	274	298	0	0	318	318
VLP33330	VLP33	122	122	399	401	278	282	0	0	318	318
VLP33331	VLP33	122	122	399	399	274	278	189	195	318	318
VLP33332	VLP33	122	122	399	399	262	270	0	0	318	318
VLP33333	VLP33	122	122	401	401	278	278	161	161	318	318
VLP33334	VLP33	122	122	399	399	278	286	163	163	318	318
VLP33335	VLP33	122	122	399	401	274	278	181	193	318	318
VLP33336	VLP33	122	122	399	399	278	282	161	161	318	318

Apéndice B. Secuencias COI

CHI15018

AATGTTAATTCGGGCGGAATTAGGACAACCGGGATCTCTTTTAGGAGATGAGCAATTATATAAC
GTTATTGTTACAGCTCATGCATTTATTATAATTTTCTTTATAGTAATACCAATCTTAATTGGAG
GATTTGGAAATTGATTAGTCCCTATTATACTCGGAGCTCCAGATATAGCATTTCCACGATTAAA
TAATCTAAGATTTTGAATACTCCCTCCAGCTTTAACTCTTCTACTAGCAGGATCAATAGTAGAA
AGTGGGGCTGGAAGTGGATGAACAGTTTACCCTCCTCTTTCTGCGGGAATTGCTCATGCAGGGC
CTTCAGTGGATCTTTCTATTTTTTGCTCTTCATCTAGCAGGTGTTTCATCTATTCTCGGTGCAGT
TAATTTTATTACAACCATCCTAAACATGCGGCCCTCCTCTATGTCATTAGACCGAATACCCTTA
TTTGTATGGTCCGTAGGTATCACAGCTGTTCTTCTTCTCTCTCTTCCCGTATTGGCAGGAG
CCATTACTATATTACTTACAGACCGTAATCTTAATACATCTTTCTTCGATCCAGC

CHI15020

AATGTTAATTCGGGCGGAATTAGGACAACCGGGATCTCTTTTAGGAGATGANCAATTATATAAC
GTTATTGTTACAGCTCATGCATTTATTATAATTTTCTTTATAGTAATACCAATCTTAATTGGAG
GATTTGGAAATTGATTAGTCCCTATTATACTCGGAGCTCCAGATATAGCATTTCCACGATTAAA
TAATCTAAGATTTTGAATACTCCCTCCAGCTTTAACTCTTCTACTAGCAGGATCAATAGTAGAA
AGTGGGGCTGGAAGTGGATGAACAGTTTACCCTCCTCTTTCTGCGGGAATTGCTCATGCAGGGC
CTTCAGTGGATCTTTCTATTTTTTGCTCTTCATCTAGCAGGTGTTTCATCTATTCTCGGTGCAGT
TAATTTTATTACAACCATCCTAAACATNCGGCCCTCCTCTATGTCATTAGACCGAATACCCTTA
TTTGTATGNTCCGTAGGTATCACAGCTNTTCTTCTTCTTCTCTCTTCCCGTATTGGCAGGAG
CCATTACTATATTACTTACAGACCGTAATCTTAATACATCTTTCTTCGATCCAGC

CHI16039

AATGTTAATTCGGGCGGAATTAGGACAACCGGGATCTCTTTTAGGAGATGAGCAATTATATAAC
GTTATTGTTACAGCTCATGCATTTATTATAATTTTCTTTATAGTAATACCAATCTTAATTGGAG
GATTTGGAAATTGATTAGTCCCTATTATACTCGGAGCTCCAGATATAGCATTTCCACGATTAAA
TAATCTAAGATTTTGAATACTCCCTCCAGCTTTAACTCTTCTACTAGCAGGATCAATAGTAGAA
AGTGGGGCTGGAAGTGGATGAACAGTTTACCCTCCTCTTTCTGCGGGAATTGCTCATGCAGGGC
CTTCAGTGGATCTTTCTATTTTTTGCTCTTCATCTAGCAGGTGTTTCATCTATTCTCGGTGCAGT
TAATTTTATTACAACCATCCTAAACATGCGGCCCTCCTCTATG-----

CHI16058

AATGTTAATTCGGGCGGAATTAGGACAACCGGGATCTCTTTTAGGAGATGAGCAATTATATAAC
GTTATTGTTACAGCTCATGCATTTATTATAATTTTCTTTATAGTAATACCAATCTTAATTGGAG
GATTTGGAAATTGATTAGTCCCTATTATACTCGGAGCTCCAGATATAGCATTTCCACGATTAAA
TAATCTAAGATTTTGAATACTCCCTCCAGCTTTAACTCTTCTACTAGCAGGATCAATAGTAGAA
AGTGGGGCTGGAAGTGGATGAACAGTTTACCCTCCTCTTTCTGCGGGAATTGCTCATGCAGGGC
CTTCAGTGGATCTTTCTATTTTTTGCTCTTCATCTAGCAGGTGTTTCATCTATTCTCGGTGCAGT
TAATTTTATTACAACCATCCTAAACATGCGGCCCTCCTCTATGTCATTAGACCGAATACCCTTA
TTTGTATGGTCCGTAGGTATCACAGCTGTTCTTCTTCTTCTCTCTTCCCGTATTGGCAGGAG
CCATTACTATATTACTTACAGACCGTAATCTTAATACATCTTTCTTCGATCCAGC

CHI17090

AATGTTAATTCGGGCGGAATTAGGACNACCAGGATCTCTTTTAGGAGATGAGCAATTATATAAC
 GTTATTGTTACAGCTCATGCATTTATTATAATTTTCTTTATAGTAATACCAATCTTAATTGGAG
 GATTTGGAAATTGATTAGTCCCTATTATACTCGGAGCTCCAGATATAGCATTTCCACGATTAAA
 TAATCTAAGATTTTGAATACTCCCTCCAGCTTTAACTCTTCTACTAGCAGGATCAATAGTAGAA
 AGTGGGGCTGGAAGTGGATGAACAGTTTACCCTCCTCTTTCTGCGGGAATTGCTCATGCAGGGC
 CTTCAGTGGATCTTTCTATTTTTGCTCTTCATCTAGCAGGTGTTTCATCTATTCTCGGTGCAGT
 TAATTTTATTACAACCATCCTAAACATGCGGCCCTCCTCTATGTCATTAGACCGAATACCCTTA
 TTTGTATGGTCCGTAGGTATCACAGCTGTTCTTCTTCTTCTCTCTCTTCCCCTATTGGCAGGAG
 CCATTACTATATTACTTACAGACCGTAATCTTAATACATCTTTCTTCNATCCAGC

CHI17093

AATGTTAATTCGGGCGGAATTAGGACAACCGGGATCTCTTTTAGGAGATGAGCAATTATATAAC
 GTTATTGTTACAGCTCATGCATTTATTATAATTTTCTTTATAGTAATACCAATCTTAATTGGAG
 GATTTGGAAATTGATTAGTCCCTATTATACTCGGAGCTCCAGATATAGCATTTCCACGATTAAA
 TAATCTAAGATTTTGAATACTCCCTCCAGCTTTAACTCTTCTACTAGCAGGATCAATAGTAGAA
 AGTGGGGCTGGAAGTGGATGAACAGTTTACCCTCCTCTTTCTGCGGGAATTGCTCATGCAGGGC
 CTTCAGTGGATCTTTCTATTTTTGCTCTTCATCTAGCAGGTGTTTCATCTATTCTCGGTGCAGT
 TAATTTTATTACAACCATCCTAAACATGCGGCCCTCCTCTATGTCATTAGACCGAATACCCTTA
 TTTGTATGGTCCGTAGGTATCACAGCTGTTCTTCTTCTTCTCTCTCTTCCCCTATTGGCAGGAG
 CCATTACTATATTACTTACAGACCGTAATCTTAATACATCTTTCTTCGATCCAGC

MED01244

AATGTTAATTCGGGCGGAATTANGACAACCGGGATCTCTTTTAGGAGATGAGCAATTATATAAC
 GTTATTGTTACAGCTCATGCATTTATTATAATTTTCTTTATAGTAATACCAATCTTAATTGGAG
 GATTTGGAAATTGATTAGTCCCTATTATACTCGGAGCTCCAGATATAGCATTTCCACGATTAAA
 TAATCTAAGATTTTGAATACTCCCTCCAGCTTTAACTCTTCTACTAGCAGGATCAATAGTAGAA
 AGTGGGGCTGGAAGTGGATGAACAGTTTACCCTCCTCTTTCTGCGGGAATTGCTCATGCAGGGC
 CTTCAGTGGATCTTTCTATTTTTGCTCTTCATCTAGCAGGTGTTTCATCTATTCTCGGTGCAGT
 TAATTTTATTACAACCATCCTAAACATGCGGCCCTCCTCTATGTCATTAGACCGAATACCCTTA
 TTTGTATGGTCCGTAGGTATCACAGCTGTTCTTCTTCTTCTCTCTCTTCCCCTATTGGCAGGAG
 C-----

MED01245

AATGTTAATTCGGGCGGAATTAGGACAACCGGGATCTCTTTTAGGAGATGAGCAATTATATAAC
 GTTATTGTTACAGCTCATGCATTTATTATAATTTTCTTTATAGTAATACCAATCTTAATTGGAG
 GATTTGGAAATTGATTAGTCCCTATTATACTCGGAGCTCCAGATATAGCATTTCCACGATTAAA
 TAATCTAAGATTTTGAATACTCCCTCCAGCTTTAACTCTTCTACTAGCAGGATCAATAGTAGAA
 AGTGGGGCTGGAAGTGGATGAACAGTTTACCCTCCTCTTTCTGCGGGAATTGCTCATGCAGGGC
 CTTCAGTGGATCTTTCTATTTTTGCTCTTCATCTAGCAGGTGTTTCATCTATTCTCGGTGCAGT
 TAATTTTATTACAACCATCCTAAACATGCGGCCCTCCTCTATGTCATTAGACCGAATACCCTTA
 TTTGTATGGTCCGTAGGTATCACAGCTGTTCTTCTTCTTCTCTCTCTTCCCCTATTGGCAGGAG
 CCATTACTATATTACTTACAGACCGTAATCTTAATACATCTTTCTTCGATCCAGC

MED01285

AATGTTAATTCGGGCGGAATTANGACAACCGGGATCTCTTTTAGGAGATGAGCAATTATATAAC
 GTTATTGTTACAGCTCATGCATTTATTATAATTTTCTTTATAGTAATACCAATCTTAATTGGAG
 GATTTGGAAATTGATTAGTCCCTATTATACTCGGAGCTCCAGATATAGCATTTCCACGATTAAA
 TAATCTAAGATTTTGAATACTCCCTCCAGCTTTAACTCTTCTACTAGCAGGATCAATAGTAGAA
 AGTGGGGCTGGAAGTGGATGAACAGTTTACCCTCCTCTTTCTGCGGGAATTGCTCATGCAGGGC
 CTTCACTGGATCTTTCTATTTTTTGCTCTTCATCTAGCAGGTGTTTCATCTATTCTCGGTGCAGT
 TAATTTTATTACAACCATCCTAAACATGCGGCCCTCCTCTATGTCATTAGACCGAATACCCTTA
 TTTGTATGGTCCGTAGGTATCACAGCTGTTCTTCTTCTCTCTCTTCCCGTATTGGCAGGAG
 CCATTACTATATTACTTACAGACCGTAATCTTAATACATCTTTCTTCGATCCAGC

MED01286

AATGTTAATTCGGGCGGAATTAGGACAACCGGGATCTCTTTTAGGAGATGAGCAATTATATAAC
 GTTATTGTTACAGCTCATGCATTTATTATAATTTTCTTTATAGTAATACCAATCTTAATTGGAG
 GANTTGGAAATTGATTAGTCCCTATTATACTCGGAGCTCCAGATATAGCATTTCCACGATTAAA
 TAATCTAAGATTTTGAATACTCCCTCCAGCTTTAACTCTTCTACTAGCAGGATCAATAGTAGAA
 AGTGGGGCTGGAAGTGGATGAACAGTTTACCCTCCTCTTTCTGCGGGAATTGCTCATGCAGGGC
 CTTCACTGGATCTTTCTATTTTTTGCTCTTCATCTAGCNGGTGTTTCATCTATTCTCGGTGCAGT
 TAATTTTATTACAACCATCCTAAACATGCGGCCCTCCTCTATGTCATTAGACCGAATACCCTTA
 TTTGTATGATCCGTAGGTATNACAGCTGTTCTTCTTCTTCTCTCTTCCCGTATTGGCAGGAG
 CCATTACTATATTACTTACAGACCGTAATCTTAATACATCTTTCTTCGATCCAGC

MJM35368

AATGTTAATTCGGGCGGAATTAGGACAACCGGGATCTCTTTTAGGAGATGAACAATTATATAAC
 GTTATTGTTACAGCTCACGCATTTATTATAATTTTCTTTATAGTAATACCAATCTTAATTGGAG
 GATTTGGAAATTGATTAGTCCCTATTATACTCGGAGCTCCAGATATAGCATTTCCACGATTAAA
 TAATCTAAGATTTTGAATACTCCCTCCAGCTTTAACTCTTCTACTAGCAGGATCAATAGTAGAA
 AGTGGGGCTGGAAGTGGATGAACAGTTTACCCTCCTCTTTCTGCGGGAATTGCTCATGCAGGGC
 CTTCACTGGATCTTTCTATTTTTTGCTCTTCATCTGGCAGGTGTTTCATCTATTCTCGGTGCAGT
 TAATTTTATTACAACCATCCTAAACATGCGGCCCTCCTCTATGTTATTAGACCGAATACCCTTA
 TTTGTATGATCCGTAGGTATCACAGCTGTTCTTCTTCTTCTCTCTTCCCGTATTGGCAGGAG
 CCATTACTATATTACTTACAGACCGTAATCTTAATACATCTTTCTTCGATCCA--

MJM35375

AATGTTAATTCGGGCGGAATTAGGACAACCGGGATCTCTTTTAGGAGATGAACAATTATATAAC
 GTTATTGTTACAGCTCACGCATTTATTATAATTTTCTTTATAGTAATACCAATCTTAATTGGAG
 GATTTGGAAATTGATTAGTCCCTATTATACTCGGAGCTCCAGATATAGCATTTCCACGATTAAA
 TAATCTAAGATTTTGAATACTCCCTCCAGCTTTAACTCTTCTACTAGCAGGATCAATAGTAGAA
 AGTGGGGCTGGAAGTGGATGAACAGTTTACCCTCCTCTTTCTGCGGGAATTGCTCATGCAGGGC
 CTTCACTGGATCTTTCTATTTTTTGCTCTTCATCTGGCAGGTGTTTCATCTATTCTCGGTGCAGT
 TAATTTTATTACAACCATCCTAAACATGCGGCCCTCCTCTATGTTATTAGACCGAATACCCTTA
 TTTGTATGATCCGTAGGTATCACAGCTGTTCTTCTTCTTCTCTCTTCCCGTATTGGCAGGAG
 CCATTACTATATTACTTACAGACCGTAATCTTAATACATCTTTCTTCGATCCAGC

MLM23152

AATGTTAATTCGGGCGGAATTAGGACAACCAGGATCTCTTTTAGGAGATGAGCAATTATATAAC
 GTTATTGTTACAGCTCATGCATTTATTATAATTTTCTTTATAGTAATACCAATCTTAATTGGAG
 GATTTGGAAATTGATTAGTCCCTATTATACTCGGAGCTCCAGATATAGCATTTCACGATTAAA
 TAATCTAAGATTTTGAATACTCCCTCCAGCTTTAACTCTTCTACTAGCAGGATCAATAGTAGAA
 AGTGGGGCTGGAAGTGGATGAACAGTTTACCCTCCTCTTCTGCGGGAATTGCTCATGCAGGGC
 CTTCAGTGGATCTTTCTATTTTTTGCTCTTCATCTAGCAGGTGTTTCATCTATTCTCGGTGCAGT
 TAATTTTATTACAACCATCCTAAACATNCGGCCCTCCTCTATGTCATTAGACCGAATACCCTTA
 TTTGTATGGTCCGTAGGTATCACAGCTGTTCTTCTTCTTCTCTCTTCCCCTATTGGCAGGAG
 CCATTACTATATTACTTACAGACCGTAATCTTAATACATCTTTCTTCNATCCAGC

MLM23156

AATGTTAATTCGGGCGGAATTAGGACAACCGGGATCTCTTTTAGGAGATGAGCAATTATATAAC
 GTTATTGTTACAGCTCATGCATTTATTATAATTTTCTTTATAGTAATACCAATCTTAATTGGAG
 GATTTGGAAATTGATTAGTCCCTATTATACTCGGAGCTCCAGATATAGCATTTCACGATTAAA
 TAATCTAAGATTTTGAATACTCCCTCCAGCTTTAACTCTTCTACTAGCAGGATCAATAGTAGAA
 AGTGGGGCTGGAAGTGGATGAACAGTTTACCCTCCTCTTCTGCGGGAATTGCTCATGCAGGGC
 CTTCAGTGGATCTTTCTATTTTTTGCTCTTCATCTAGCAGGTGTTTCATCTATTCTCGGTGCAGT
 TAATTTTATTACAACCATCCTAAACATGCGGCCCTCCTCTATGTCATTAGACCGAATACCCTTA
 TTTGTATGGTCCGTAGGTATCACAGCTGTTCTTCTTCTTCTCTCTTCCCCTATTGGCAGGAG
 CCATTACTATATTACTTACAGACCGTAATCTTAATACATCTTTCTTCGATCCAGC

MLM25179

AATGTTAATTCGGGCGGAATTAGGACAACCGGGATCTCTTTTAGGAGATGAGCAATTATATAAC
 GTTATTGTTACAGCTCATGCATTTATTATAATTTTCTTTATAGTAATACCAATCTTAATTGGAG
 GATTTGGAAATTGATTAGTCCCTATTATACTCGGAGCTCCAGATATAGCATTTCACGATTAAA
 TAATCTAAGATTTTGAATACTCCCTCCAGCTTTAACTCTTCTACTAGCAGGATCAATAGTAGAA
 AGTGGGGCTGGAAGTGGATGAACAGTTTACCCTCCTCTTCTGCGGGAATTGCTCATGCAGGGC
 CTTCAGTGGATCTTTCTATTTTTTGCTCTTCATCTAGCAGGTGTTTCATCTATTCTCGGTGCAGT
 TAATTTTATTACAACCATCCTAAACATGCGGCCCTCCTCTATGTCATTAGACCGAATACCCTTA
 TTTGTATGGTCCGTAGGTATCACAGCTGTTCTTCTTCTTCTCTCTTCCCCTATTGGCAGGAG
 CCATTACTATATTACTTACAGACCGTAATCTTAATACATCTTTCTTCGATCCAGC

MLM25180

AATGTTAATTCGGGCGGAATTAGGACAACCAGGATCTCTTTTAGGAGATGANCAATTATATAAC
 GTTATTGTTACAGCTCATGCATTTATTATAATTTTCTTTATAGTAATACCAATCTTAATTGGAG
 GATTTGGAAATTGATTAGTCCCTATTATACTCGGAGCTCCAGATATAGCATTTCACGATTAAA
 TAATCTAAGATTTTGAATACTCCCTCCAGCTTTAACTCTTCTACTAGCAGGATCAATAGTAGAA
 AGTGGGGCTGGAAGTGGATGAACAGTTTACCCTCCTCTTCTGCGGGAATTGCTCATGCAGGGC
 CTTCAGTGGATCTTTCTATTTTTTGCTCTTCATCTAGCAGGTGTTTCATCTATTCTCGGTGCAGT
 TAATTTTATTACAACCATCCTAAACATGCGGCCCTCCTCTATGTCATTAGACCGAATACCCTTA
 TTTGTATGNTCCGTAGGTATNACAGCTGTTCTTCTTCTTCTCTCTTCCCCTATTGGCAGGAG
 CCATTACTATATTACTTACAGACCGTAATCTTAATACATCTTTCTTCGATCCAGC

MLM28206

AATGTTAATTCGGGCGGAATTAGGACAACCGGGATCTCTTTTAGGAGATGAGCAATTATATAAC
 GTTATTGTTACAGCTCATGCATTTATTATAATTTTCTTTATAGTAATACCAATCTTAATTGGAG
 GATTTGGAAATTGATTAGTCCCTATTATACTCGGAGCTCCAGATATAGCATTTCCACGATTAAA
 TAATCTAAGATTTTGAATACTCCCTCCAGCTTTAACTCTTCTACTAGCAGGATCAATAGTAGAA
 AGTGGGGCTGGAAGTGGATGAACAGTTTACCCTCCTCTTTCTGCGGGAATTGCTCATGCAGGGC
 CTTCAGTGGATCTTTCTATTTTTTGCTCTTCATCTAGCAGGTGTTTCATCTATTCTCGGTGCAGT
 TAATTTTATTACAACCATCCTAAACATGCGGCCCTCCTCTATGTCATTAGACCGAATACCCTTA
 TTTGTATGGTCCGTAGGTATCACAGCTGTTCTTCTTCTTCTCTCTCTTCCCGTATTGGCAGGAG
 CCATTACTATATTACTTACAGACCGTAATCTTAATACATCTTTCTTCGATCCAGC

VLP31289

AATGTTAATTCGGGCGGAATTAGGACAACCGGGATCTCTTTTAGGAGATGAACAATTATATAAC
 GTTATTGTTACAGCTCATGCATTTATTATAATTTTCTTTATAGTAATACCAATCTTAATTGGAG
 GATTTGGAAATTGATTAGTCCCTATTATACTCGGAGCTCCAGATATAGCATTTCCACGATTAAA
 TAATCTAAGATTTTGAATACTCCCTCCAGCTTTAACTCTTCTACTAGCAGGATCAATAGTAGAA
 AGTGGGGCTGGAAGTGGATGAACAGTTTACCCTCCTCTTTCTGCGGGAATTGCTCATGCAGGGC
 CTTCAGTGGATCTTTCTATTTTTTGCTCTTCATCTAGCGGGTGTTCATCTATTCTCGGTGCAGT
 TAATTTTATTACAACCATCCTAAACATGCGGCCCTCCTCTATGTCATTAGACCGAATACCCTTA
 TTTGTATGATCCGTAGGTATCACAGCTGTTCTTCTTCTTCTCTCTCTTCCCGTATTGGCAGGAG
 CCATTACTATATTACTTACAGACCGTAATCTTAATACATCTTTCTTCGATCCAGC

VLP31290

AATGTTAATTCGGGCGGAATTANGACAACCGGGATCTCTTTTAGGAGATGAACAATTATATAAC
 GTTATTGTTACAGCTCATGCATTTATTATAATTTTCTTTATAGTAATACCAATCTTAATTGGAG
 GATTTGGAAATTGATTAGTCCCTATTATACTCGGAGCTCCAGATATAGCATTTCCACGATTAAA
 TAATCTAAGATTTTGAATACTCCCTCCAGCTTTAACTCTTCTGCTAGCAGGATCAATAGTAGAA
 AGTGGGGCTGGAAGTGGATGAACAGTTTACCCTCCTCTTTCTGCGGGAATTGCTCATGCAGGGC
 CTTCAGTGGATCTTTCTATTTTTTGCTCTTCATCTANCGGGTATTTTCATCTATTCTCGGTGCAGT
 TAATTTTATTACAACCATCCTAAACATGCGGCCCTCCTCTATGTCATTAGACCGAATACCCTTA
 TTTGTATGATCCGTAGGTATCACAGCTGTTCTTCTTCTTCTCTCTCTTCCCGTATTGGCAGGAG
 CCAT-----

VLP33333

AATGTTAATTCGGGCGGAATTAGGACAACCGGGATCTCTTTTAGGAGATGAACAATTATATAAC
 GTTATTGTTACAGCTCATGCATTTATTATAATTTTCTTTATAGTAATACCAATCTTAATTGGAG
 GATTTGGAAATTGATTAGTCCCTATTATACTCGGAGCTCCAGATATAGCATTTCCACGATTAAA
 TAATCTAAGATTTTGAATACTCCCTCCAGCTTTAACTCTTCTGCTAGCAGGATCAATAGTAGAA
 AGTGGGGCTGGAAGTGGATGAACAGTTTACCCTCCTCTTTCTGCGGGAATTGCTCATGCAGGGC
 CTTCAGTGGATCTTTCTATTTTTTGCTCTTCATCTAGCGGGTATTTTCATCTATTCTCGGTGCAGT
 TAATTTTATTACAACCATCCTAAACATGCGGCCCTCCTCTATGTCATTAGACCGAATACCCTTA
 TTTGTATGATCCGTAGGTATCACAGCTGTTCTTCTTCTTCTCTCTCTTCCCGTATTGGCAGGAG
 CCATTACTATATTACTTACAGACCGTAATCTTAATACATCTTTCTTCGATCCAGC