

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE  
EDUCACIÓN SUPERIOR DE ENSENADA

**BIOMETRÍA Y VARIABILIDAD GENÉTICA DE  
*LITTORINA KEENAE* ROSEWATER, 1978 Y *L. SCUTULATA*  
DOULD, 1849 (GASTRÓPODA: PROSOBRANCHIA)  
EN DOS LOCALIDADES DE LA COSTA DE  
ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO**

TESIS  
MAESTRÍA EN CIENCIAS

**ALFONSO CORREA SANDOVAL**

Ensenada, Baja California, México, junio de 1994.

RESUMEN de la Tesis de Alfonso Correa Sandoval presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS en OCEANOGRAFIA con opción en ECOLOGIA MARINA. Ensenada, Baja California, México. Junio de 1994.

BIOMETRIA Y VARIABILIDAD GENETICA DE *Littorina keenae* Rosewater, 1978 y *L. scutulata* Gould, 1849 (GASTROPODA : PROSOBRANCHIA) EN DOS LOCALIDADES DE LA COSTA DE ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MEXICO

Resumen aprobado por :

Dra.

Director de Tesis

Se compararon las características biométricas de la concha y se estimó la variación génica en las poblaciones de *Littorina keenae* Rosewater, 1978 y *L. scutulata* Gould, 1849 de dos localidades de la costa de Ensenada, Baja California, México. Se encontró una considerable variabilidad en los tamaños de la concha en ambas especies y localidades. Particularmente, *L. keenae* presentó diferencias en función de su ubicación en el intermareal. Ambas situaciones reflejan diferencias locales. Las poblaciones de *L. keenae* no mostraron diferencias morfológicas entre localidades, y en la localidad de Punta Morro las diferencias entre el nivel de recio de marea y el nivel medio fueron menores. La variación génica de *L. keenae* y *L. scutulata* resultó comparativamente baja con respecto a otras especies del género, en función de la muestra genética analizada. En *L. keenae* los loci polimórficos fueron AKP-1 y EST-2 y en *L. scutulata* sólo AKP-1. Los valores promedio de  $P_{(0.95)}$  y  $H_e$  fueron 20% y  $.099 \pm .071$ , y 101 y  $.017 \pm .014$ , para *L. keenae* y *L. scutulata* respectivamente. Existe una elevada deficiencia de heterocigosis en todas las poblaciones. Ambas especies presentaron intraespecíficamente una alta similitud genética e interespecíficamente una apreciable diferenciación. Además, *L. keenae* presenta una escasa estructuración genética de sus poblaciones y *L. scutulata* una elevada estructuración, la cual puede estar asociada al tamaño de la muestra.

TESIS DEFENDIDA POR: **ALFONSO CORREA SANDOVAL**

Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITE:



**DRA. VICTORIA DIAZ CASTAÑEDA.-** Director del Comité

**DR. JORGE DE LA ROSA VELEZ.-** Miembro del Comité

  
**DRA. DIANA TENTORI SAN**

**ARRAGA PARTIDA.-** Jefe Depto. Ecología Marina

**CALDERON AGUILERA.-** Director de Estudios de Posgrado

27 DE JUNIO DE 1994



CIC € 5€

CENTRO DE INVESTIGACION CIENTIFICA Y DE  
EDUCACION SUPERIOR DE ENSENADA

DIVISION DE OCEANOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ECOLOGIA

BIOMETRIA Y VARIABILIDAD GENETICA DE *Littorina keenae*  
Rosewater, 1978 y *L. scutulata* Gould, 1849 (GASTROPODA :  
PROSOBRANCHIA) EN DOS LOCALIDADES DE LA COSTA DE ENSENADA,  
BAJA CALIFORNIA, MEXICO.

TESIS

Que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para  
obtener el grado de M ESTRO EN CIENCIAS presenta:

ALFONSO CORREA SANDOVAL

Ensenada, I a a Calif rnia, Junio de 1994.

A mi esposa, Anabel.

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Victoria Díaz Castañeda, por su constante apoyo, confianza, consejos e interés como Director de Tesis.

Al Dr. Jorge de la Rosa Vélez por su paciente orientación, sugerencias, correcciones y aclarar mis dudas en los aspectos de genética.

Al Dr. Domenico Voltolina Lobina por sus valiosos comentarios, sugerencias, críticas e interés en este estudio.

A la Dra. Diana Tentori Santacruz por la revisión crítica y atinadas sugerencias al escrito.

Al Dr. David G. Reid, del Departamento de Zoología del Museo Británico de Historia Natural por la corroboración taxonómica de especies, literatura y notas proporcionadas, así como el interés mostrado en este estudio.

A la Dra. Sylvia Behrens Yamada, del Departamento de Zoología de la Universidad Estatal de Oregon por la literatura proporcionada, comentarios e interés en este trabajo.

Al Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California (IIO-UABC) y en particular al M.C. Roberto Escobar Fernández por permitirme el uso del equipo del Laboratorio de Genética y sus consejos durante los análisis electroforéticos.

A la L.I. Anabel Gutiérrez Borbolla mi mayor agradecimiento por su gran apoyo y constante ayuda durante todo el desarrollo de este estudio.

Al Dr. Francisco Correa Sandoval, del IIO-UABC, por sus valiosos consejos, sugerencias y respaldo desde el principio.

Al B.M Pedro Cruz Hernández por su colaboración en los análisis electroforéticos y al M.C. Manuel Grijalva por resolver algunas dudas durante los mismos.

Al Dr. Horacio de la Cueva Salcedo por su constante disposición para aclarar mis dudas en los aspectos de estadística.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por su apoyo con una beca-crédito durante mis estudios y al Ing. Tomás Garza Wong, Director del Instituto Tecnológico de Ciudad Victoria, Tams., por las facilidades brindadas para la realización del posgrado.

A todas las personas que contribuyeron de diversas maneras a la realización de este trabajo.

## CONTENIDO

	Página
I. INTRODUCCION .....	1
II. ANTECEDENTES .....	3
III. OBJETIVOS .....	11
IV. ASPECTOS BIOLOGICOS DE <i>Littorina keenae</i> y <i>L. scutulata</i> .....	11
IV.1 Ubicación taxonómica .....	13
IV.2 Distribución de especies de <i>Littorina</i> en la zona .....	13
V. AREA DE ESTUDIO .....	15
VI. METODOLOGIA .....	18
VI.1 Obtención de material biológico y transporte .....	18
VI.2 Biometría .....	19
VI.3 Preparación de material biológico para electroforesis .....	20
VI.3.1 Lavado y congelación .....	20
VI.3.2 Homogenizado .....	21
VI.4 Electroforesis .....	21
VI.5 Corroboración taxonómica de especies .....	32
VII. RESULTADOS .....	34
VII.1 Biometría .....	34
VII.2 Variabilidad génica, polimorfismo y heterocigosis .....	46
VII.3 Similitud y distancia genética .....	52

VIII. DISCUSION .....	62
IX. CONCLUSIONES .....	79
LITERATURA CITADA .....	80
ANEXO .....	96

GRESO

OCT 11 1995

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Sitios de colecta en el intermareal rocoso, dentro y fuera de la Bahía de Todos Santos, B. C., Mexico : 1) Punta Morro (PM) y 2) área Sur de La Bufadora (BU).	18
2. Dendrograma de acuerdo al análisis de agrupamiento en función de los coeficientes de identidad genética sin sesgo de Nei (1978).	60

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Distribución geográfica de las especies de <i>Littorina</i> presentes en la costa noroccidental de Baja California.	15
II. Relación de sistemas amortiguadores para gel y electrodo empleados en los corrimientos electroforeticos.	26
III. Condiciones electroforeticas utilizadas para cada sistema amortiguador.	28
IV. Sistemas enzimáticos analizados, amortiguadores, mezclas de tinción empleadas y número de loci expresados.	29
V. Estadísticos descriptivos de cada una de las medidas (en mm) de las conchas en las cuatro poblaciones. Se da el resultado del análisis de varianza de una vía de Kruskal Wallis ( $P < .001$ ). Los puntos alineados que unen los grupos de datos de cada población indican igualdad de acuerdo al metodo de comparación múltiple de Student-Newman-Keuls (SNK) ( $P < .05$ ). M = Mediana; E.E. = Error estándar; D.E.= Desviación estándar; VMM = Valor mínimo y máximo; $\bar{X}$ = Media; 1PM = <i>Littorina keenae</i> - Punta Morro; 2BU = <i>L. keenae</i> -área sur de la Bufadora; 3PM = <i>L. scutulata</i> - Punta Morro; 4BU = <i>L. scutulata</i> - área sur de la Bufadora.	36
VI. Comparación de 1PM y 2BU con los lotes adicionales de <i>L. keenae</i> . 5PM = <i>L. keenae</i> -Punta Morro-nivel medio de marea; 6BU = <i>L. keenae</i> - sur de La Bufadora-nivel medio de marea. El resto de la notación es similar a la de la Tabla V.	40

LISTA DE TABLAS (Continuación)

Tabla	Página
VII. Estadísticos descriptivos de cada una de las razones biometricas obtenidos a partir de las medidas de las conchas en las cuatro poblaciones. La notación es similar a la de la Tabla V.	43
VIII. Comparación de las razones biometricas de 1PM y 2BU con los lotes adicionales de <i>L. keenae</i> . Notación similar a la de la Tabla VI.	45
IX. Variación genica en las poblaciones de <i>Littorina keenae</i> y <i>L. scutulata</i> . N es el número de organismos analizados; Ho es la heterocigosis observada por locus; He es la heterocigosis esperada por locus. 1PM y 2BU se refiere a <i>L. keenae</i> en Punta Morro y área sur de La Bufadora. 3PM y 4BU se refiere a <i>L. scutulata</i> en las mismas localidades.	50
X. Polimorfismo y heterocigosis promedio en <i>L. keenae</i> y <i>L. scutulata</i> en dos localidades del noroccidente de Baja California. P es la proporción de loci polimórficos con el criterio de la frecuencia de alelo más común menor o igual a .95; Ho = Heterocigosis media observada; He= Heterocigosis media; e.e. = Error estándar.	52
XI. Coeficientes de similitud y de distancia geneticas (sin sesgo de Nei, 1978) para <i>Littorina keenae</i> y <i>L. scutulata</i> en los 10 loci analizados. Debajo de la diagonal la distancia y sobre la diagonal la similitud.	55
XII. Coeficiente de similitud genetica (sin sesgo de Nei, 1978) interespecífica e interpoblacional de <i>L. keenae</i> y <i>L. scutulata</i> en el locus AKP-1.	56

LI STA DE TABLAS (Continuación)

Tabla	Pá g i na
XIII. Coeficiente de similitud genética (sin sesgo de Nei, 1978) interespecífica e interpoblacional de <i>L. keenae</i> y <i>L. scutulata</i> en el locus EST-1.	57
XIV. Coeficiente de similitud genética (sin sesgo de Nei, 1978) interespecífica e interpoblacional de <i>L. keenae</i> y <i>L. scutulata</i> en el locus GPI-1*.	58
XV. Coeficiente de similitud genética (sin sesgo de Nei, 1978) interespecífica e interpoblacional de <i>L. keenae</i> y <i>L. scutulata</i> en el locus EST-2.	59
XVI. Valores obtenidos con el estadístico F de Wrigth y su promedio para <i>Littorina keenae</i> en dos localidades de la costa noroccidental de Ensenada, Baja California, México. F(IS) es la homogeneidad intrapoblacional; F(IT) es la homogeneidad de una población respecto a la otra; F(ST) es la divergencia intrapoblacional o porcentaje de loci heterogeneos respecto a la frecuencia de sus alelos entre las poblaciones.	61
XVII. Valores obtenidos con el estadístico F de Wrigth y su promedio para <i>Littorina scutulata</i> .	62
XVIII. Longitud (en mm) de la concha de litorínidos adultos en la costa del Pacífico Americano.	67
XIX. Comparación de la variabilidad genética entre diversas especies de <i>Littorina</i> . PA es el número de poblaciones analizadas; NL es el número de loci analizados; NA es el número promedio de alelos por locus; Ho es la heterocigosis observada promedio; He es la heterocigosis esperada promedio.	71

LISTA DE TABLAS (Continuación)

Tabla	Página
XX. Síntesis comparativa de la distribución y morfología de <i>Littorina keenae</i> y <i>L. scutulata</i> . Se incluye información obtenida en este estudio. a = <i>L. keenae</i> ; b = <i>L. scutulata</i> .	97
XXI. Características en las que se colectó <i>Littorina keenae</i> , (a) y <i>L. scutulata</i> (b) en las localidades visitadas para este estudio.	99
XXII. Características en las que se colectaron los lotes adicionales de <i>L. keenae</i> .	100

BIOMETRIA Y VARIABILIDAD GENETICA DE *Littorina keenae*  
Rosewater, 1978 y *L. scutulata* Gould, 1849 (GASTROPODA:  
PROSOBRANCHIA) EN DOS LOCALIDADES DE LA COSTA DE ENSENADA,  
BAJA CALIFORNIA, MEXICO.

## I. INTRODUCCION

La variabilidad es un rasgo común de los organismos que se puede presentar en sus características fisiológicas, etológicas, morfológicas y genéticas. Esta última clase de variabilidad, así como las características genéticas en si mismas reflejan, según Dobzhansky *et al.* (1980), la forma como las poblaciones de organismos han reaccionado y están reaccionando frente a los cambios ambientales.

Lo anterior puede conducir finalmente a la adaptación, e indica por lo tanto que la eficacia biológica de un organismo está determinada por la interacción entre su fenotipo y la totalidad de su entorno ambiental (Pianka, 1982).

En este sentido, una herramienta importante de la biología de las poblaciones que ayuda a entender la relación de los organismos y su medio, es el análisis de alguna de las clases de variabilidad que presentan, lo cual puede sentar las bases de una comprensión biológica más profunda.

En el presente estudio se analizan características biométricas y genéticas de *Littorina keenae* Rosewater, 1978 y *L. scutulata* Gould, 1849, especies representativas en la región de uno de los géneros de gasterópodos intermareales más comunes y abundantes en las zonas costeras rocosas (Keen, 1971). Precisamente estas características del género son unas de las razones por las cuales algunas de sus especies podrían emplearse como indicadores ecológicos (Dixon 1983; Thorson, 1946, citado por Janson, 1985), previo conocimiento del comportamiento biológico de una población o comunidad local determinada.

Otra ventaja de este género es que su estudio puede contribuir a revelar los efectos de la coexistencia de especies relacionadas estrechamente entre sí, los cuales pueden manifestarse en términos de variabilidad a diferentes niveles biológicos, incluido el genético (Beardmore & Morris, 1978).

Entre estos efectos se han estudiado la variabilidad en la morfología y el color de la concha en relación a la influencia de los componentes ambientales, pues el polimorfismo fenotípico es notable y particularmente frecuente en *Littorina* (Struhsaker, 1968; Behrens, 1972; Gooch, 1975; Sacchi y Voltolina, 1987).

En el aspecto biométrico de este estudio se comparan estadísticamente diversas medidas de las conchas, y en el genético se emplea la comparación de electroferogramas, la cual permite estimar la variabilidad genética de las poblaciones mediante el examen de las variantes proteínicas expresadas por los distintos individuos (Ayala, 1978). Este método es recomendable ya que permite con cierta precisión (Avisé, 1974) el análisis simultáneo y rápido de varios genes en el mismo individuo (Pasteur et al., 1988).

## II. ANTECEDENTES

Se han realizado diversos estudios en moluscos tomando en cuenta las características morfométricas de la concha y las características genéticas. Entre éstos podemos mencionar el estudio de Brock (1978), que se realizó con el fin de proponer un criterio morfológico y bioquímico para la separación taxonómica de dos especies de *Cardium*; el de Beaumont y Khamdan (1991) para definir el grado de parentesco de diversas poblaciones de la ostra perlera *Pinctada radiata* y el de Dillon y Davis (1980) en el cual se revisan las relaciones morfométrico-genéticas de varias poblaciones del prosobranquio dulceacuícola *Goniobasis*. Algunos otros estudios han observado la variabilidad en estos caracteres, para dos especies y sus zonas de hibridación, como el de Dillon y Manzi (1989), con las almejas *Mercenaria mercenaria* y *M. campechiensis*.

Sin embargo, los estudios genéticos en relación a otros aspectos de la biología de moluscos han sido más variados y numerosos: se han utilizado para diferenciar poblaciones en función de su polimorfismo proteínico (Burton, 1983) y para establecer relaciones con la fecundidad (Gardner y Skibiński, 1990) y con el aislamiento reproductivo (Johnson et al., 1977). También se han usado para analizar la variación génica

en poblaciones afectadas por derrames de petróleo (Cole, 1978), conocer la divergencia de especies simpátricas ecológicamente similares (Murphy, 1976) y la dirección de la migración larval (Burocker, 1983). Así como también, para revelar la influencia en la escultura de la concha (Largen, 1971), la distribución por zonas en el litoral (Wilkins, 1977), la relación con la distribución geográfica a lo largo de la costa (Gooch *et al.*, 1972), o bien para establecer relaciones filogenéticas (Burocker *et al.*, 1979).

En el caso particular de *Littorina* se han realizado diversos estudios a nivel morfológico (Behrens, 1972; Vermeij, 1973; Chow 1987), genético (Berger, 1972; Wilkins y O'Regan, 1980; Mastro *et al.*, 1982) y ecológico (Janson, 1982)

Struhsaker (1968) señala que la variación intraespecífica en la escultura de la concha de *Littorina picta* está genéticamente asociada con ciertas variaciones fisiológicas e indica que ambos tipos de variación se correlacionan a ambientes particulares del intermareal: las poblaciones con conchas lisas predominan en las partes bajas donde el choque de las olas es fuerte, y las formas esculpidas se encuentran sobre las zonas con choque ligero de las olas y de rocío. El estudio muestra que la progenie de padres de conchas ornamentadas tienen tasas de crecimiento

más elevadas y menor mortalidad y concluye que los principales factores de selección para las variaciones de la concha son la acción de las olas, la sumersión prolongada, la desecación, la alta temperatura y la salinidad extrema.

Behrens (1972), con apoyo en estudios de campo y laboratorio, indica que *Littorina scutulata* es menos fácil de ser movida por la acción de las olas que *L. sitkana* que, con su forma redondeada y los surcos de su concha, ofrece más resistencia a las olas.

Vermeij (1973) en un estudio sobre los patrones morfológicos de la concha en gasterópodos herbívoros del intermareal concluye que existen gradientes morfológicos en varias familias, incluida la de los Littorinidae. Es posible distinguir en algunas especies de litorínidos tropicales un incremento en el desarrollo de esculturas externas en la concha, así como un aumento en la altura de la espira siguiendo un gradiente desde las partes bajas del intermareal a las altas. Este gradiente se hace también evidente desde las latitudes templadas a las tropicales.

Janson y Sundberg (1983) comparan morfométricamente dos poblaciones de *L. saxatilis*, una proveniente de una costa protegida y otra expuesta, relativamente cercanas entre sí.

Las poblaciones se encontraron separadas fenotípicamente sin traslape alguno. Sin embargo, otra población geográfica y ambientalmente intermedia abarcó biométricamente a las dos, indicando una variación morfológica clinal del ambiente expuesto al protegido.

Chow (1987) al analizar morfológicamente conchas de *Littorina scutulata* y *L. plena* encuentra que existen considerables variaciones intraespecíficas de tipo geográfico y de habitat, lo cual hace difícil la separación taxonómica de estas especies, cuando se consideran localidades diferentes. Sin embargo, mediante funciones estadísticas discriminantes, logró establecer para una localidad con costa expuesta, que cerca del 92% de los especímenes pueden ser correctamente separados.

El método resulta de escasa efectividad cuando se toman en cuenta costas protegidas en el caso de *L. plena*, pero no con *L. scutulata*, donde la clasificación correcta tiene una efectividad del 86%.

El género *Littorina* es un excelente grupo de organismos para estudiar los efectos de la dispersión sobre la diferenciación genética entre poblaciones, ya que las especies del género tienen ciclos de vida con diferentes grados de dispersión larval (Purchon, 1968, citado por

Gaines, et al., 1974). Por ejemplo, *L. saxatilis* es ovovivíparo (Gooch, 1975), con un desarrollo completo que ocurre en la cavidad corporal de la hembra; *L. angulifera* es parcialmente ovovivípara, con desarrollo larval en la cavidad corporal de la hembra hasta que en la etapa de veliger es liberada a la columna de agua; *L. littorea* libera huevos directamente a la columna de agua, donde ocurre el desarrollo completo (Gaines et al., 1974).

Las especies de este estudio, *L. keenae* y *L. scutulata*, junto con *L. plena* presentan un desarrollo planctónico (Behrens, 1992).

En un estudio sobre la heterogeneidad interpoblacional de *L. saxatilis* y *L. littorea* se encontró una gran diferenciación geográfica en relación a las frecuencias alélicas de tres loci esterasa. La diferenciación geográfica fue mayor en la primer especie con respecto a la segunda (Berger, 1972, 1973).

Gaines et al. (1974) hallaron para 20 poblaciones de *L. angulifera* la existencia de diferencias significativas en las frecuencias génicas del loci esterasa-2. No se encontró una asociación entre la distancia de las localidades muestreadas (islas) y la heterogeneidad genética, aunque las diferencias

fueron notables entre poblaciones a menos de 300 m de distancia. Sin embargo, se pudo establecer una asociación entre la latitud y una clina en la frecuencia de genes.

Beardmore y Morris (1978) analizaron las relaciones entre la coexistencia de *L. littorea* y *L. rudis* en siete localidades y la variación genética en diez loci. Encontraron una mayor heterocigosis (.244) en la segunda especie y que los niveles de heterocigosis en ambas especies (junto con *L. nigrolineata*) son elevados en la parte alta de la costa.

Wilkins y O'Regan (1980) comparan siete especies europeas de *Littorina* en función de los loci glucosa fosfato isomerasa (GPI) y fosfoglucomutasa (PGM). Para las especies gemelas *L. rudis*, *L. neglecta* y *L. nigrolineata* encuentran en ambos loci algunas diferencias en las frecuencias alélicas, pero en las especies simpátricas *L. obtusata* y *L. mariae* las diferencias en ambos loci son significativas. A su vez la variabilidad geográfica en estos loci es grande en *L. rudis* y *L. littorea*. Las altas heterocigosis en *L. rudis* y *L. neglecta* en GPI (.395 y .413, respectivamente) y PGM (.582 y .495, respectivamente) indican que la selección natural mantiene una alta variabilidad en estas especies.

Janson (1982) al estudiar poblaciones dimórficas de *L. saxatilis* en localidades expuestas y protegidas distingue diferencias en las tasas de crecimiento de las conchas entre los dos morfos de la especie en un mismo habitat y también encuentra diferencias dentro de cada morfo entre ambientes protegidos y expuestos. Señala que aunque las tasas de crecimiento tienen un componente ambiental, las divergencias entre los dos morfos indican diferencias evidentemente genéticas.

El estudio de Mastro et al. (1982) confirma por electroforesis la separación taxonómica basada en diferencias morfológicas y de desarrollo de *L. scutulata* y *L. plena*. Estos autores indican que de diez loci analizados ocho son polimórficos y que la similitud genética interespecífica es consistentemente más baja que la intraespecífica, promediando .707. Los loci fosfatasa ácida (ACP) y aspartato aminotransferasa (AAT) fueron monomórficos.

Vard y Johnson (1985) al analizar morfométrica y genéticamente subpoblaciones simpátricas de *L. saxatilis* y *L. arcana* concluyen que aunque existen diferencias en las conchas de las mismas especies en sitios diferentes, en un mismo sitio el traslape morfológico entre especies es muy ligero. De todas formas, cuando se muestrean especímenes de

dos sitios puede realizarse una razonable separación de las dos especies. Encuentran que *L. saxatilis* posee en sus subpoblaciones una mayor heterocigosis media por loci que *L. arcana* y que de siete loci considerados un promedio de 88% de la variación se atribuye a la diversidad génica dentro de subpoblaciones y un 12% a la diversidad entre subpoblaciones. No se encontraron diferencias interespecíficas para las enzimas aspartato aminotransferasa (AAT) y fosfoglucomutasa (PGM), pero se notaron diferencias marcadas en las frecuencias fenotípicas de esterasa-2. La heterocigosis en *L. saxatilis* fue de .361 y en la de *L. arcana* resultó ser de .253.

### III. OBJETIVOS

Comparar las características biométricas de la concha en las poblaciones de *Littorina keenae* y *L. scutulata* en dos localidades de la costa de Ensenada, Baja California, México.

Conocer la variación, distancia y similitud genética de las poblaciones de ambas especies.

#### IV. ASPECTOS BIOLÓGICOS DE *Littorina keenae* y *L. scutulata*

Los litorínidos se hallan entre los caracoles marinos más comunes del mundo y pocas son las áreas costeras rocosas que no los poseen adheridos desde el nivel medio de marea hasta la línea de marea alta y nivel de rocío de marea. Probablemente sean un linaje ancestral para algunos de los caracoles terrestres actuales (Keen, 1971).

El género *Littorina* aparece en la escala del tiempo geológico desde el Liásico (capas inferiores del Jurásico) hasta la actualidad (Black, 1976).

La branquia ranopectinada se encuentra colocada al frente dentro de la concha, la cual es brillante. La superfamilia tiene como características una concha turbinada, de tamaño pequeño a mediano, lisa o con una escultura de incipiente a nodulosa, nunca espinosa. La abertura es completa y el opérculo es paucispiral (Keen, 1971).

El opérculo bloquea efectivamente la abertura y de esta forma permite mantener dentro de la concha la suficiente humedad cuando el animal se encuentra retraído. Se alimentan de cobertura vegetal microscópica en la superficie de las rocas (Keen, op. cit.).

De acuerdo al Dr. Reid, del Museo Británico de Historia Natural (comunicación personal), *Littorina keenae* se caracteriza por una espiral de la concha baja, patrones negros y blancos irregulares, a veces bandeados; área desgastada en la zona parietal de la concha cercana a la columela; usualmente dos glándulas peniales en el macho. *L. scutulata* presenta una espiral alta, patrones de coloración formando un mosaico azul y gris sobre un fondo olivo, a veces negro o blanco; usualmente la banda paleal basal está ausente y el pene presenta un filamento corto.

En el anexo se incluye una síntesis comparativa de la morfología y la distribución en el intermareal de *L. keenae* y *L. scutulata* de acuerdo a la literatura y este estudio.

#### **IV.1 Ubicación taxonómica.**

La clasificación taxonómica de *L. keenae* y *L. scutulata* según Keen (1971) y Keen y Coan (1974) es la siguiente:

Clase Gastropoda

Subclase Prosobranchia

Orden Mesogastropoda

Superfamilia Littorinacea

Familia Littorinidae

Género *Littorina*

Especies *L. keenae* Rosewater, 1978

*L. scutulata* Gould, 1849

#### IV.2 Distribución de especies de *Littorina* en la zona.

En la Tabla I se indican las especies de *Littorina* distribuídas en la zona, según Ricketts y Calvin (1968), Keen (1971), Reid (1990a) y Behrens (1992).

Tabla I. Distribución geográfica de las especies de *Littorina* presentes en la costa noroccidental de Baja California.

ESPECIES	DISTRIBUCION
<i>L. keenae</i> Rosewater	Oregon a Baja California.
<i>L. modesta</i> Philippi	Ensenada, Baja California a Ecuador.
<i>L. plena</i> Gould	Columbia Británica a Ensenada Baja California.*
<i>L. scutulata</i> Gould	Alaska a Baja California.

\* La distribución en Ensenada, B. C. es indicada por carta del Dr. Reid al Dr. Voltolina en 1991. Con autorización del Dr. Voltolina.

## V. AREA DE ESTUDIO

Organismos de ambas especies fueron colectados en las localidades de Punta Morro (PM) y el área sur de La Bufadora (BU), ambas ubicadas en la costa noroccidental del municipio de Ensenada, Baja California, México (Fig. 1).

La primer localidad se encuentra en los  $31^{\circ} 52'$  de latitud norte y en los  $116^{\circ} 40'$  de longitud oeste, y la segunda en los  $31^{\circ} 44'$  de latitud norte y en los  $116^{\circ} 44'$  de longitud oeste.

La localidad PM se ubica en la zona norte dentro de la Bahía de Todos Santos y la BU fuera de la Bahía, hacia el sureste de Punta Banda. En ambos sitios según CETENAL (1976, 1977) el intermareal posee rocas basálticas.

En el anexo se describen las características específicas de los sitios donde se encontraron los organismos.

El área de estudio recibe influencias de diversas corrientes. La corriente de California originada cerca de la frontera de los Estados Unidos de Norteamérica y Canadá, contiene características de aguas subárticas. Al desplazarse hacia el sur por la costa, las aguas superficiales van

modificándose por el calentamiento solar, la influencia de ríos y el intercambio con otras masas de agua procedentes de esteros y bahías. En las costas del norte de Baja California la porción principal de la corriente de California se dirige al sureste y el flujo se divide en dos ramas; la contracorriente del sur de California, la cual regresa al norte formando la parte costera del giro del sur de California; y otra que se dirige al sur y continúa a lo largo de la península de Baja California. Estas aguas frías y de baja salinidad, son alteradas por eventos de surgencias que prevalecen desde mediados de febrero hasta finales de julio. Son procesos mediante los cuales la componente del viento paralela a la costa (NO) aleja de ella el agua superficial que es sustituida por masas de aguas profundas, frías y de salinidad relativamente alta (U.S. Dept. Int., 1978).

Particularmente en la Bahía de Todos Santos, los eventos de surgencias ocurren principalmente en primavera y verano (Chávez-De Ochoa, 1975).

A una profundidad mayor de 30 metros y con viento del norte, la circulación superficial en la bahía involucra dos giros, uno anticiclónico en la parte norte y otro ciclónico en la parte sur (Argote-Espinoza et al., 1975).

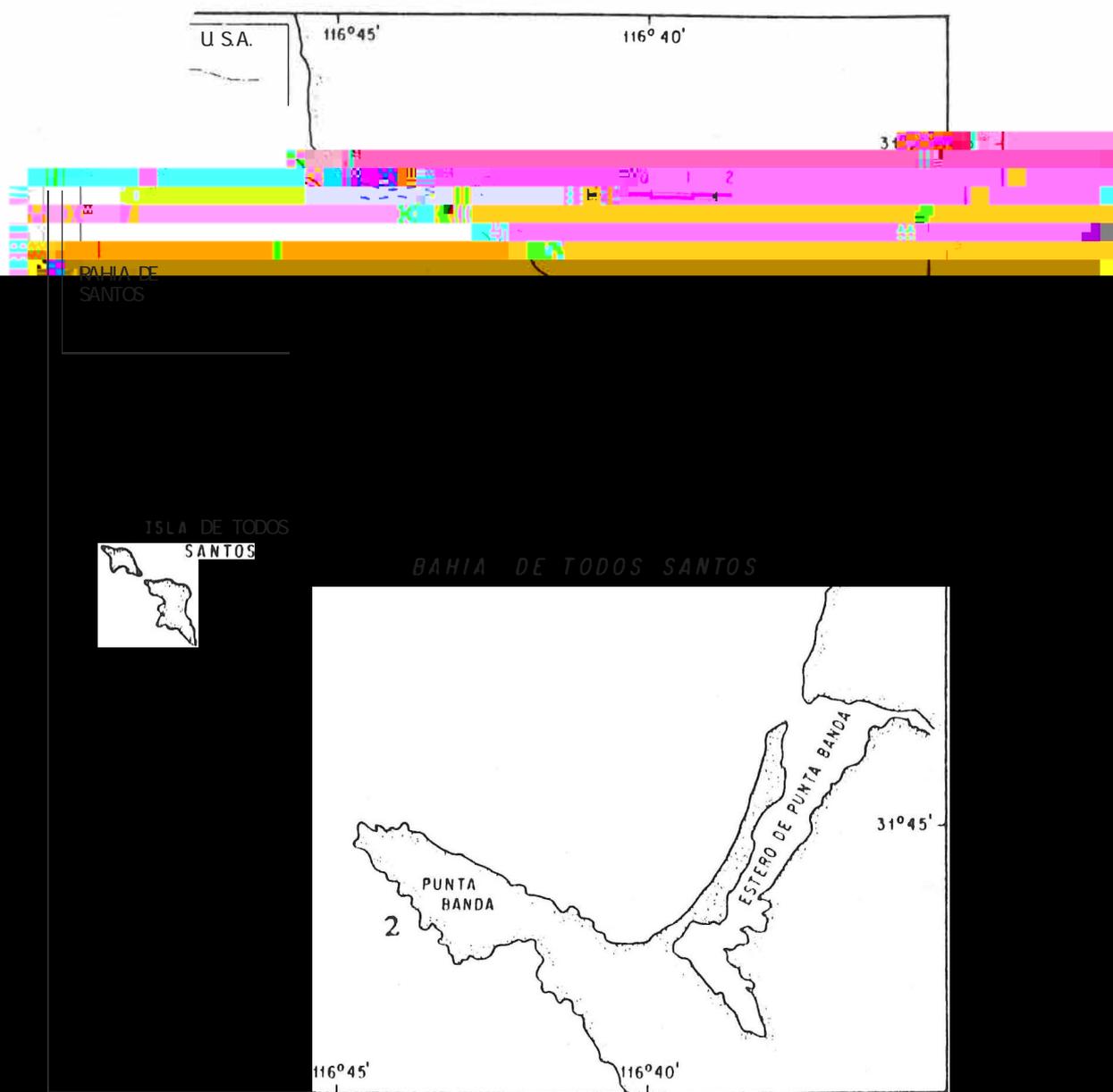


Fig. 1. Sitios de colecta en el intermareal rocoso, dentro y fuera de la Bahía de Todos Santos, B. C., México : 1) Punta Morro y 2) área sur de La Bufadora.

## VI. METODOLOGIA

### VI.1 Obtención de material biológico y transporte.

La localidad de Punta Morro fue visitada el 23 de septiembre de 1993 y el área sur de La Bufadora, el 27 del mismo mes. Ambas localidades fueron visitadas nuevamente el 17 y 22 de octubre con el fin de obtener material biológico adicional para ampliar la comparación morfométrica en el caso de *Littorina keenae*, según su ubicación en el intermareal.

Los caracoles se colocaron en recipientes de plástico con tapa perforada, y se transportaron vivos al laboratorio de Acuicultura del CI CESE.

La nomenclatura para las muestras obtenidas es la siguiente: 1 KM = *L. keenae* - Punta Morro; 2 KB = *L. keenae* - área sur de La Bufadora; 3 SM = *L. scutulata* - Punta Morro; 4 SB = *L. scutulata* - área sur de La Bufadora; 5 KM = *L. keenae* - Punta Morro - nivel medio de marea; 6 KB = *L. keenae* - área sur de La Bufadora - nivel medio de marea.

## VI.2 Biometría

La obtención de datos (a décimas de milímetro) se realizó bajo un microscopio esteroscópico marca Olympus con reglilla ocular. Se consideraron las siguientes medidas : longitud y diámetro total de la concha, longitud y diámetro de la abertura y el número de espiras. Con el fin de comparar la forma de la concha se obtuvieron las siguientes razones de acuerdo a Dillon y Davis (1980) y Chow (1987): longitud de la concha/ diámetro de la concha, diámetro de la abertura/ diámetro de la concha y longitud de la abertura/ longitud de la concha. Además se obtuvo la razón número de espiras/ longitud de la concha.

Se revisaron 55 organismos de cada especie para cada localidad y además dos lotes adicionales de 55 especímenes de *Littorina keenae*, cada uno del nivel medio de marea de ambas localidades, para un total de 330 conchas.

Para el análisis y comparación de los datos se usaron los paquetes estadísticos Sigma Stat versión 1 y Statgraphics versión 4. Se realizaron pruebas de normalidad de los datos y se practicó un análisis de varianza de una vía no paramétrico de Kruskal-Wallis ( $P < .001$ ). Además se aplicaron pruebas de comparación múltiple de Student-Newman-Keuls ( $P < .05$ ) para

2BC. /: 202AO OD. : 2BO 120 : =BO 6AD? =BO 120 1. C=BO ; =BCA. / . <O  
1842A2<08. B, O

### VI.3 Preparación de material biológico para electroforesis.

#### VI.3.1 Lavado y congelación.

, <OC=C. : O120' >>H=A6. <8B; =BO1200. 1. O2B?208200=<B812A. <1=O  
.; / . BO : =O. : 81. 12BO fl i l O 8<18E81D=BO 2<O C=C. : ~ °O B2O O=: =O. A=<O  
8<18E81D. : ; 2<C2O 2<O O2: 1. BO <D, 2A. 1. BO 120 C2: . O ; =B@D8C2A. O 120  
?: I BC80= 'O : . BOOD. : 2BOB2OB2: . . A=< , O #2<CA=O120D<O2BC. <@D2°O : . BO  
O2: 1. BOB2O129. A=<O?. AO8. : ; 2<C2OBD; 2A681. BOO=<O. 6D. O120; . AO2<O  
O8AOD. . O8M4O1DA. <C2OCA2BO1K. B°O B26N<O: =OBD62A81=O? =AO( . BCA=O  
et al. fižt fl' °O \$BC=OB2OA2. : 8GMDO=<O2: O58<O1202: 8; 8<. AOA2BC=BO  
. : 8; 2<C808=BO 12: O CA. OC=O 1862BC8E=O 120 : =BO O. A. O=: 2BO @D2O  
?=1AL. <O 62<2A. AO 5. : B=BO ?=B8C8E=BO 2<O 2: O . <l : 8B8BO  
2: 2OCA=4=AJ C80= , O

\* =BC2A8=A; 2<C2°O O. 1. O =A6. <8B; =O 5D2O CA. <B52A81=O . O D<. O  
/=: B. O120?: I BC80=O 2C8@D2C. 1. O?A2E8. ; 2<C2OFOB200=: =O. A=<O2<O  
782: =O?. A. OBDCA. <B? =AC. O8M4O. : O' . / =A. C=A8=O120%2<JC80. O12: O  
&<BC8CDC=O 120 &<E2BC86. O8=<2BO )O2. <=: M680. BO 120: . O -ž! " , O +2O  
?DB82A=<O2<OO=<62: . O8M4O. O" Ł1 ° 3OB26N<O2: OOA8C2A8=O120žF. : . OFO

Valentine (1974), hasta el momento de iniciar la elaboración de los homogenizados, al día siguiente.

### **VI.3.2 Homogenizado.**

Cada caracol fue desconchado en baño de hielo para evitar la descomposición de los tejidos. En las mismas condiciones se obtuvo un homogenizado de cada uno de los organismos completos (dado el tamaño pequeño) en tubos de vidrio con interior esmerilado. Este consiste en un rompimiento de los tejidos en dos volúmenes de una solución amortiguadora de tris-ácido clorhídrico .5 M a pH 7.1 (Mastro *et al.*, 1982).

Los homogenizados se colocaron en microtubos de plástico con tapa etiquetada, y se congelaron a  $-70^{\circ}$  C nuevamente, hasta la realización de los análisis electroforéticos.

### **VI.4 Electroforesis**

Se realizaron electroforesis horizontales en gel de almidón, de acuerdo a los principios señalados por Ayala (1978) y Harris y Hopkinson (1978) y según el método empleado por Escobar-Fernández (1991). Se hicieron ligeras

modificaciones al método, que se describen a continuación. El procedimiento fue el siguiente :

a) En una plancha se calentaron hasta ebullición 300 ml de solución amortiguadora para gel (Tabla II).

b) En forma separada se mezclaron en un matraz kitasato para filtración de 2000 ml y a temperatura ambiente 52.8 g de almidón hidrolizado y 140 ml de solución amortiguadora, agitando hasta obtener una suspensión homogénea.

c) Se mezcló la solución amortiguadora en ebullición con la solución de almidón y se agitó vigorosamente hasta una completa suspensión.

d) Se eliminó el aire atrapado en el gel aplicando vacío durante 45 segundos.

e) El gel se vació rápidamente en el centro de un contenedor perfectamente limpio constituido por una base de vidrio y un marco de acrílico de 25x15x1 cm. Rápidamente se cubrió con otro vidrio evitando atrapar burbujas de aire, ya que éstas pueden interferir en el análisis electroforético. Los geles se elaboraron la noche anterior al corrimiento.

f) Con los homogenizados (descongelados y en baño de hielo) se saturaron individualmente 25 mechas de papel filtro Whatman número 3 de 1x.3 cm las cuales se insertaron en el corte longitudinal del gel a 3.5 cm del borde catódico. Una mecha adicional saturada con azul de bromofenol al .0002 % se sembró en la parte media del gel para indicar el avance de la electroforesis.

g) Se reintegró la porción menor del gel aprisionando las mechas, se colocó nuevamente el marco de acrílico y se puso el gel en la celda de electroforesis. A esta se le agregaron previamente 500 ml de amortiguador del electrodo en los recipientes anódico y catódico.

h) La solución amortiguadora del electrodo y el gel se pusieron en contacto por medio de mechas de papel filtro Whatman número 1 de 25x9 cm con las cuales se transmitió la corriente eléctrica. Se colocaron ocho mechas empalmadas tanto en el lado anódico como en el catódico, y se empaparon del amortiguador con una pipeta Pasteur. Se colocó nuevamente la cubierta de vidrio sin atrapar burbujas de aire.

i) La celda electroforética se tapó y se introdujo a un refrigerador REVCO a temperatura constante de 4° C y se conectó a la fuente de poder HBI. A ésta se le aplicaron de

acuerdo a los amortiguadores empleados, los valores de voltaje, amperaje, wattaje y tiempo (Tabla III). Se usaron simultáneamente cuatro celdas (100 individuos) y se aplicaron 50 miliamperes por cada una.

j) Luego de 20 minutos se detuvo el paso de corriente y se retiraron con pinzas de disección todas las mechas pequeñas de los geles.

k) Treinta minutos antes de terminar el corrimiento se prepararon las mezclas de tinción respectivas para cada sistema enzimático (Tabla IV).

l) Finalmente se retiró el vidrio de cubierta, se eliminaron las mechas del electrodo y se retiró el marco de acrílico. Del gel se obtuvieron tres rebanadas por medio de una cuerda tensada. La rebanada media se colocó en una charola y se agregó la mezcla de tinción correspondiente. Se incubó a 37° C hasta la aparición de las bandas, excepto para las esterases, que se incubó a temperatura ambiente. Se eliminó la mezcla de tinción y el gel se fijó en una solución de metanol, ácido acético y agua (3:1:6, v:v:v).

Tabla II. Relación de sistemas amortiguadores para gel y electrodo empleados en los corrimientos electroforéticos.

A. Continuo TRI S-BORATO-EDTA  
(Avala *et al.*, 1973)

Gel y electrodo :	Tris	.087 M
	Acido bórico	.0087M
	EDTA-Na	.001 M

B. Continuo TRI S-CITRATO-EDTA  
{Avala *et al.*, 1973)

Gel: Dilución 1-15 del amortiguador del electrodo

Electrodo :	Tris	.135 M
	Acido cítrico	.045 M
	EDTA-Na	.0012M
	pH 7	

C. Discontinuo, TRI S-CITRATO/BORATO-LiOH  
{Selander *et al.*, 1971)

Gel: Proporción de 9 a 1 de solución A y de amortiguador de electrodo.

Solución A :	Tris	.05 M
	Acido cítrico	.008 M
	pH 8.4	

Electrodo :	Acido bórico	.19 M	pH8
	LiOH	.03 M	
	pH 8.1		

D. Continuo, TRI S-MALEATO-EDTA  
(Selander *et al.*, 1971)

Gel: Dilución 1-9 del amortiguador del electrodo.

Electrodo :	Tris	.1 M
	Acido maléico	.1 M
	EDTA-Na	.01 M
	MgCl	.01
	pH 7.4	

(continuación Tabla II)

E. Continuo, TRIS-CITRATO (Selander et al., 1972)		
TRIS	TRIS	1.000 g
	TRIS-CITRATO	1.000 g
	TRIS	1.000 g
Control:	TRIS	1.000 g
	TRIS-CITRATO	1.000 g
	TRIS	1.000 g
F. Continuo, TRIS-CITRATO (Selander et al., 1972)		
TRIS	TRIS	1.000 g
	TRIS-CITRATO	1.000 g
	TRIS	1.000 g
Control:	TRIS	1.000 g
	TRIS-CITRATO	1.000 g
	TRIS	1.000 g

Tabla III. Condiciones electroforéticas utilizadas para cada sistema amortiguador.

Sistema Amortiguador	Voltaje (V)	Corriente Aplicada (mA)	Potencia Eléctrica (W)	Tiempo (Horas)
A	200	50	40	5
B	100	50	30	6
C	100	50	30	14
D	100	50	30	5*, 8** y 13***
E	100	50	20	6
F	200	50	40	5

\* Para glucosa fosfato isomerasa.

\*\* Para Esterasa-1.

\*\*\* Para Esterasa-2.

Tabla IV. Sistemas enzimáticos analizados, amortiguadores, mezclas de tinción empleadas y número de loci expresados.

Enzimas	Amortiguador	No. de loci	Tinción
Fosfatasa ácida (ACP)	A	1	Shaw y Prasad(1970)
Isocitrato deshidrogenasa (IDH)	B	2	Abreu (1983)
Malato deshidrogenasa (MDH)	C	2	Schaal y Anderson (1974)
Glucosa fosfato isomerasa (GPI)	D	1	Pasteur et al. (1988)
Esterasa (EST)	E	2	Shaw y Prasad(1970)
Aspartato amino transferasa (AAT)	E	1	Schaal y Anderson (1974)
Fosfatasa alcalina (AKP)	F	1	Shaw y Koen (1968)

Se analizaron diez loci, pertenecientes a siete sistemas enzimáticos.

La lectura de los geles con las bandas de tinción conocidas como zimogramas (Pasteur et al., 1988) fueron realizados con base en las recomendaciones de Harris y Hopkinson (1978), Dobzhansky et al. (1980) y Dillon (1991).

El procesamiento de datos se realizó por medio del programa BIOSYS-1 (Swofford y Selander, 1989) con el cual se obtiene lo siguiente:

a) Frecuencias génicas. - Número de veces que se presenta un alelo en el total de alelos en la población (Ayala y Kiger, 1984).

b) Polimorfismo. - Número de loci polimórficos entre el total de loci analizados, considerando que si el alelo más común tiene una frecuencia  $\leq 0.05$  se trata de un locus polimórfico (Ayala y Kiger, op. cit.).

c) Heterocigosis.

c.1) Heterocigosis observada ( $H_o$ ). - Número de organismos heterocigóticos por locus sobre la media de los

loci analizados en la muestra poblacional (Ayala y Kiger, op. cit.).

c.2) Heterocigosis esperada ( $H_e$ ).- Se basa en el equilibrio teórico de Hardy-Weinberg. Se calcula para cada locus y para todos los loci.

Por locus .-  $h_e = 1 - \sum(X_i^2)$ , donde  $X_i$  = frecuencia del  $i$ -ésimo alelo del locus.

Para todos los loci.-  $H_e = \sum_{j=1}^n (h_e/n)_j$ , donde  $j$  =  $j$ -ésimo locus.

d) Prueba de bondad de ajuste de ji-cuadrada. Se usa para comparar las frecuencias genotípicas observadas con las esperadas, donde los grados de libertad son iguales al mínimo de genotipos menos el número de alelos. En caso de más de dos alelos el programa agrupa tres clases: a) homocigotos para el alelo más común, b) heterocigotos para el alelo más común con algún otro alelo y c) genotipos restantes.

e) Deficiencia de heterocigotos.- Según Koen *et al.* (1971) es igual a la diferencia entre la heterocigosis observada y esperada sobre la esperada.

f) Similitud genética entre las poblaciones. Con la prueba sin sesgo de Nei (1978):

$$I = \sum x_i y_i / \sqrt{[\sum x_i^2 + (1 - \sum x_i^2) / 2n_x][\sum y_i^2 + (1 - \sum y_i^2) / 2n_y]}$$

Donde  $x_i$  = frecuencia del alelo  $i$  en la muestra poblacional X.

$y_i$  = frecuencia del alelo  $i$  en la muestra poblacional Y.

$n_x$  y  $n_y$  = número de individuos muestreados de la población X o Y, respectivamente.

g) Distancia genética entre poblaciones. De acuerdo a Nei (1978).

$$D = -\ln I.$$

h) Con el estadístico F de Wight (1965) se efectúa el análisis de la diferenciación genética de las muestras poblacionales (Nei, 1973).

Donde  $F_{IT}$  es homogeneidad poblacional en relación a las otras poblaciones, y  $F_{IS}$  homogeneidad intrapoblacional.

Ambas son correlaciones entre dos gametos al azar producidas por un individuo en relación con la subpoblación  $F_{IS}$  y la población total en  $F_{IT}$ .  $F_{ST}$  es la correlación de gametos al azar de cada una de las subpoblaciones, respecto a la población total. Esto es,  $F_{ST}$  es igual a  $\sigma_{pi}^2 / \bar{p}(1-\bar{p})$ , donde  $\bar{p}$  representa la media ponderada de las frecuencias génicas, y  $\sigma_{pi}^2$  es la suma ponderada de las desviaciones al cuadrado de las frecuencias alélicas de las subpoblaciones individuales, y de la media de las frecuencias alélicas, dividida entre el número de subpoblaciones. Es decir,  $\sigma_{pi}^2$  es igual a  $(\bar{p}-p_i)^2 / n$  (Burocker, 1983).

#### VI.5 Corroboración taxonómica de especies.

Para llevar a cabo la corroboración taxonómica de las especies analizadas se realizaron disecciones al microscopio estereoscópico, para la obtención y observación de la morfología de penes y la presencia o ausencia de filamentos o glándulas en éstos. Estas observaciones se realizaron con la ayuda de las notas proporcionadas por el Dr. David G. Reid del Museo Británico de Historia Natural. Además se observaron las rádulas, que en ambas especies son de tipo moderado, de

acuerdo a los criterios establecidos por Rosewater (1979). Las disecciones se practicaron para las seis muestras poblacionales analizadas, incluyéndose los dos lotes adicionales de *Littorina keenae*.

Por otra parte, material adicional de *L. keenae* y *L. scutulata* de las dos localidades muestreadas fue enviado para corroboración al Dr. Reid, cuyas observaciones y notas, gentilmente enviadas por el mismo, se encuentran en el anexo excepto el material ilustrativo, el cual forma parte de un tratado sobre litorínidos del Pacífico Americano y el Atlántico, todavía inédito.

## VII. RESULTADOS

### VII.1 Biometría.

Los conjuntos de datos obtenidos de cada una de las medidas de las conchas y las respectivas razones biométricas de las distintas poblaciones de *Littorina keenae* y de *L. scutulata* no mostraron normalidad en su distribución. El análisis de varianza de una vía de Kruskal-Wallis mostró diferencias significativas ( $P < .001$ ) en todos los casos, incluyendo los lotes adicionales de *L. keenae* del nivel medio de marea.

La mayoría de las comparaciones múltiples de Student-Newman-Keuls para los conjuntos de medidas (Tabla V) muestran también diferencias significativas ( $P < .05$ ). Las excepciones fueron la longitud total para las muestras 2KB (*L. keenae* - área sur de La Bufadora) y 4SB (*L. scutulata* - área sur de La Bufadora), el diámetro total entre 1KM (*L. keenae* - Punta Morro) y 4SB y el número de espiras entre 1KM y 4SB. Es decir, las poblaciones en su conjunto, no traslapan sus dimensiones. Sólo dos poblaciones, una de cada especie, traslapan hasta cierto punto dos de las variables medidas (diámetro total y número de espiras) pero en localidades distintas.

Tabla V. Estadísticos descriptivos de cada una de las medidas (en mm) de las conchas en las cuatro poblaciones. Los asteriscos alineados que unen los grupos de datos de cada población indican igualdad de acuerdo al método de comparación múltiple de Student-Newman-Keuls (SNK) ( $P < .05$ ). M = Mediana; E.E. = Error estándar; D.E.= Desviación estándar; VMM = Valor mínimo y máximo;  $\bar{X}$  = Media; 1KM = *Littorina keenae* - Punta Morro; 2KB = *L. keenae* - área sur de La Bufadora; 3SM = *L. scutulata* - Punta Morro; 4SB= *L. scutulata* - área sur de La Bufadora.

## LONGITUD TOTAL

Población	M	E.E.	D.E.	VMM	$\bar{X}$	
1 KM	7.4	.11	.87	6.2-11.0	7.49	*
2 KB	8.1	.11	.82	6.8-10.2	8.26	*
3 SM	6.2	.08	.61	5.3- 8.2	6.34	*
4 SB	8.0	.09	.67	7.0-10.1	7.99	*

## DIAMETRO TOTAL

Población	M	E.E.	D.E.	VMM	$\bar{X}$	
1 KM	5.8	.09	.72	5.0- 8.4	5.89	*
2 KB	6.5	.08	.65	5.4- 8.1	6.64	*
3 SM	4.5	.04	.33	3.7- 5.3	4.39	**
4 SB	5.9	.06	.46	5.0- 7.2	5.84	

(continuación Tabla V)

## LONGITUD ABERTURA

Población	M	E.E.	D.E.	VMM	$\bar{X}$	
1 KM	5.0	.08	.62	4.2- 7.5	5.09	*
2 KB	5.5	.80	.59	3.9- 7.6	5.44	*
3 SM	3.5	.04	.29	2.9- 4.1	3.49	*
4 SB	4.5	.05	.39	3.9- 5.5	4.48	*

## DIAMETRO ABERTURA

Población	M	E.E.	D.E.	VMM	$\bar{X}$	
1 KM	3.9	.05	.43	3.2- 5.8	3.90	*
2 KB	4.2	.10	.80	3.5- 7.9	4.48	*
3 SM	2.8	.05	.40	2.2- 4.1	2.77	*
4 SB	3.4	.05	.38	3.0- 4.8	3.53	*

(continuación Tabla V)

## NUMERO DE ESPIRAS

Población	M	E.E.	D.E.	VMM	$\bar{X}$	
1 KM	3.7	.03	.23	3.0- 4.5	3.8	*
2 KS	4.0	.05	.37	2.7- 4.5	3.8	*
3 SM	4.0	.04	.30	3.5- 4.7	4.1	*
4 SB	4.0	.04	.56	3.2- 4.7	3.9	*

En términos generales las conchas de ambas especies del área sur de La Bufadora son más grandes que las de Punta Morro.

Por otro lado, al tomar en cuenta los lotes adicionales de *L. keenae* (Tabla VI) sólo las comparaciones de 1KM y 6KB en diámetro total de la concha, y diámetro de la abertura no mostraron diferencias significativas.

En las comparaciones de las razones biométricas de *L. keenae* y *L. scutulata* (Tabla VII) en todos los casos las poblaciones de la primera especie no mostraron diferencias. En el caso de *L. scutulata*, por otro lado, las poblaciones resultaron iguales solo en la razón de longitud de abertura/longitud total.

Por otra parte, al considerar los lotes adicionales de *L. keenae* (Tabla VIII) las poblaciones 1KM (nivel de rocío de marea) y 5KM (nivel medio) no mostraron diferencias en las razones de longitud de abertura/longitud total y número de espiras/longitud total. Sólo en la razón de diámetro de abertura/diámetro total las poblaciones 1KM y 6KB (nivel medio) resultaron iguales.

Tabla VI. Comparación de 1KM y 2KB con los lotes adicionales de *L. keenae*. 5KM = *L. keenae* - Punta Morro-nivel medio de marea; 6KB = *L. keenae* - área sur de La Bufadora-nivel medio de marea. El resto de la notación es similar a la de la Tabla V.

## LONGITUD TOTAL

Población	M	E.E	D.E	VMM	$\bar{X}$	
1 KM	7.4	.11	.87	6.2-11.0	7.49	*
2 KB	8.1	.11	.82	6.8-10.2	8.26	*
5 KM	6.9	.11	.88	5.9-11.0	7.03	*
6 KB	6.3	.08	.61	5.5- 8.1	6.41	*

## DIAMETRO TOTAL

Población	M	E.E	D.E	VMM	$\bar{X}$	
1 KM	5.8	.09	.72	5.0- 8.4	5.89	†
2 KB	6.5	.08	.65	5.4- 8.1	6.64	*
5 KM	5.8	.08	.63	4.9- 8.5	5.87	*
6 KB	5.7	.06	.47	4.9- 7.5	5.73	*

(continuación Tabla VI)

## LONGITUD ABERTURA

Población	M	E.E	D.E	VMM	$\bar{X}$	
1 KM	5.0	.08	.62	4.2- 7.5	5.09	*
2 KB	5.5	.08	.59	3.9- 7.6	5.44	*
5 KM	4.5	.07	.57	3.9- 7.0	4.62	*
6 KB	4.3	.08	.61	3.5- 5.1	4.33	*

## DIAMETRO ABERTURA

Población	M	E.E	D.E	VMM	$\bar{X}$	
1 KM	3.9	.05	.43	3.2- 5.8	3.90	
2 KB	4.2	.10	.80	3.5- 7.9	4.48	*
5 KM	3.8	.06	.46	3.2- 5.7	3.87	*
6 KB	3.6	.04	.36	2.9- 4.7	3.66	

(continuación Tabla VI)

## NUMERO DE ESPIRAS

Población	M	E.E	D.E	VMM	$\bar{X}$	
1 KM	3.7	.03	.23	3.0- 4.5	3.8	*
2 KB	4.0	.05	.37	2.7- 4.5	3.8	*
5 KM	3.7	.02	.18	3.0- 4.0	3.7	*
6 KB	3.5	.03	.24	3.0- 4.0	3.4	*

Tabla VII. Estadísticos descriptivos de cada una de las razones biométricas obtenidos a partir de las medidas de las conchas en las cuatro poblaciones. La notación es similar a la de la Tabla V.

#### LONGITUD TOTAL/DIAMETRO TOTAL

Población	$\bar{X}$	E. E.	Q. E.	VMM	$\bar{X}$	
1 KM	1.29	.01	.08	.94-1.41	1.27	*
2 KB	1.24	.01	.08	1.06-1.51	1.25	*
3 SM	1.43	.01	.11	1.23-1.95	1.44	*
4 SB	1.38	.01	.08	1.12-1.56	1.37	*

#### DIAMETRO ABERTURA/DIAMETRO TOTAL

Población	$\bar{X}$	E. E.	Q. E.	VMM	$\bar{X}$	
1 KM	0.67	.01	.04	0.51-0.75	0.66	*
2 KB	0.66	.01	.10	0.56-1.41	0.67	*
3 SM	0.62	.01	.08	0.52-0.89	0.63	*
4 SB	0.60	.01	.04	0.48-0.71	0.60	*

(continuación Tabla VII)

## LONGITUD ABERTURA/LONGITUD TOTAL

Población	M	E.E.	D.E.	VMM	$\bar{X}$	
1 KM	0.68	.01	.05	0.60-0.97	0.68	*
2 KB	0.66	.01	.07	0.51-1.01	0.66	*
3 SM	0.55	.00	.04	0.43-0.66	0.55	*
4 SB	0.56	.00	.04	0.46-0.70	0.56	*

## NUMERO DE ESPIRAS/LONGITUD TOTAL

Población	M	E.E.	D.E.	VMM	$\bar{X}$	
1 KM	0.51	.01	.06	0.34-0.64	0.51	*
2 KS	0.48	.01	.06	0.32-0.59	0.47	*
3 SM	0.65	.01	.07	0.49-0.85	0.66	*
4 SB	0.50	.01	.05	0.40-0.60	0.50	*

Tabla VIII. Comparación de las razones biométricas de 1KM y 2KB con los lotes adicionales de *L. keenae*. Notación similar a la de la Tabla VI.

LONGITUD TOTAL/DIAMETRO TOTAL

Población	M	E.E	D.E	VMM	$\bar{X}$	
1 KM	1.29	.01	.08	.94-1.41	1.27	*
2 KB	1.24	.01	.08	1.06-1.51	1.25	*
5 KM	1.19	.01	.06	1.08-1.34	1.20	*
6 KB	1.12	.01	.06	0.97-1.27	1.12	*

DIAMETRO ABERTURA/DIAMETRO TOTAL

Población	M	E.E	D.E	VMM	$\bar{X}$	
1 KM	0.67	.01	.04	0.51-0.75	0.66	*
2 KB	0.66	.01	.10	0.56-1.14	0.67	*
5 KM	0.66	.00	.03	0.57-0.73	0.66	*
6 KB	0.64	.00	.03	0.56-0.71	0.64	*

(continuación Tabla VIII)

## LONGITUD ABERTURA/LONGITUD TOTAL

Población	M	E.E	D.E	VMM	$\bar{X}$	
1 KM	0.68	.00	.05	0.60-0.97	0.68	*
2 KB	0.66	.01	.07	0.51-1.01	0.66	*
5 KM	0.66	.01	.04	0.57-0.84	0.66	*
6 KB	0.67	.01	.05	0.60-0.82	0.68	*

## NUMERO DE ESPIRAS/LONGITUD TOTAL

Población	M	E.E	D.E	VMM	$\bar{X}$	
1 KM	0.51	.01	.06	0.34-0.64	0.51	*
2 KB	0.48	.01	.06	0.32-0.59	0.47	*
5 KM	0.56	.01	.06	0.34-0.64	0.55	*
6 KB	0.54	.01	.04	0.43-0.64	0.54	*

## VII.2 Variabilidad génica, polimorfismo y heterocigosis.

De los 10 loci analizados para las dos poblaciones de *Littorina keenae* y *L. scutulata* ocho fueron monomórficos en la primera especie (AAT-1, ACP-1, EST-1, GPI-1, IDH-1, IDH-2, MDH-1, MDH-2).

En la segunda especie, además de los loci anteriores, EST-2 también resultó ser monomórfica para distintos alelos, en cada localidad (Tabla IX). En EST-1 el monomorfismo para las dos especies de *Littorina* se dió para diferentes alelos.

Los loci polimórficos en *L. keenae* fueron AKP-1 y EST-2, y en *L. scutulata* sólo AKP-1. Aunque en la localidad del área sur de La Bufadora (BU) esta última especie presentó un cierto grado de polimorfismo en GPI-1, el valor alcanzado no es suficiente de acuerdo al criterio de Beardmore y Morris (1978). Una enzima se puede considerar polimórfica solo si la frecuencia del alelo más común es menor que .95 en una o más de las poblaciones analizadas. En este caso la frecuencia del alelo más común en GPI-1 para *L. scutulata* en BU fue de .97.

En el locus polimórfico AKP-1 en ambas especies y localidades el alelo más común es A. El locus polimórfico

EST-2 de *L. keenae* tiene en la presencia del alelo más común (B) un patrón similar en ambas localidades.

Como resultado de todo lo anterior el polimorfismo (P) en *L. keenae* y *L. scutulata* fue del 20 y del 10%, respectivamente (Tabla X).

Los valores de heterocigosis observada ( $H_o$ ) en las poblaciones PM y BU de *L. keenae* fueron de .013 y .018, respectivamente. En las de *L. scutulata* fueron de .000 y .004. Los valores correspondientes a heterocigosis esperada ( $H_e$ ) fueron en el mismo orden, .102, .097, .013 y .021 respectivamente. La población 3SM presentó los valores de  $H_o$  y  $H_e$  más bajos. El promedio general de alelos presentes por locus en las cuatro poblaciones fue de 1.3.

En todas las poblaciones los valores de  $H_o$  son menores que  $H_e$  lo cual implica un desequilibrio de Hardy-Weinberg, el que a su vez puede estar dado por una deficiencia o exceso de heterocigotos.

Lo anterior se confirma al aplicar la prueba de bondad de ajuste de ji-cuadrada para comparar las frecuencias genotípicas en los loci polimórficos.

La prueba nos indica diferencias significativas en todos los loci polimórficos con un nivel de significancia de .001 aún en EST-2 con agrupamientos de valores. Todos los valores del estadígrafo D fueron altos y negativos (AKP-1: -1.000 en todas las poblaciones excepto en 4SB que fue de -.846; EST-2: -.756 en 1KM, -.752 en 2KB), lo cual nos muestra que las diferencias se deben a la deficiencia, a veces completa, de heterocigotos.

Tabla IX. Variación génica en las poblaciones de *Littorina keenae* y *L. scutulata*. N es el número de organismos analizados; Ho es la heterocigosis observada por locus; He es la heterocigosis esperada por locus. 1KM y 2KB se refiere a *L. keenae* en Punta Morro y área sur de La Bufadora. 3SM y 4SB se refiere a *L. scutulata* en las mismas localidades.

LOCUS	ALELO	1KM	2KB	3SM	4SB
AAT-1	n	49	50	48	50
	A	1.000	1.000	1.000	1.000
	Ho	0.000	0.000	0.000	0.000
	He	0.000	0.000	0.000	0.000
ACP-1	n	41	50	30	32
	A	1.000	1.000	1.000	1.000
	Ho	0.000	0.000	0.000	0.000
	He	0.000	0.000	0.000	0.000
AKP-1	n	50	50	44	42
	A	0.600	0.860	0.932	0.917
	B	0.400	0.140	0.068	0.083
	Ho	0.000	0.000	0.000	0.024
	He	0.480	0.241	0.127	0.153
EST-1	n	50	50	50	50
	A	1.000	1.000	0.000	0.000
	B	0.000	0.000	1.000	1.000
	Ho	0.000	0.000	0.000	0.000
	He	0.000	0.000	0.000	0.000

(continuación de la Tabla IX)

LOCUS	ALELO	1KM	2KB	3SM	4SB
EST-2	n	46	50	50	50
	A	0.033	0.120	0.000	0.000
	B	0.522	0.430	0.000	0.000
	C	0.446	0.170	0.000	0.000
	D	0.000	0.220	1.000	0.000
	E	0.000	0.060	0.000	0.000
	F	0.000	0.000	0.000	1.000
	Ho	0.130	0.180	0.000	0.000
	He	0.528	0.720	0.000	0.000
GPI-1	n	50	50	50	50
	A	1.000	1.000	0.000	0.020
	B	0.000	0.000	0.000	0.010
	C	0.000	0.000	1.000	0.970
	Ho	0.000	0.000	0.000	0.020
	He	0.000	0.000	0.000	0.059
IDH-1	n	35	50	49	50
	A	1.000	1.000	1.000	1.000
	Ho	0.000	0.000	0.000	0.000
	He	0.000	0.000	0.000	0.000
IDH-2	n	23	39	26	27
	A	1.000	1.000	1.000	1.000
	Ho	0.000	0.000	0.000	0.000
	He	0.000	0.000	0.000	0.000
MDH-1	n	50	46	50	42
	A	1.000	1.000	1.000	1.000
	Ho	0.000	0.000	0.000	0.000
	He	0.000	0.000	0.000	0.000
MDH-2	n	41	49	50	42
	A	1.000	1.000	1.000	1.000
	Ho	0.000	0.000	0.000	0.000
	He	0.000	0.000	0.000	0.000

Tabla X. Polimorfismo y heterocigosis promedio en *L. keenae* y *L. scutulata* en dos localidades del noroeste de Baja California.  $P$  es la proporción de loci polimórficos con el criterio de la frecuencia de alelo más común menor o igual a .95;  $H_o$  = Heterocigosis media observada;  $H_e$  = Heterocigosis media; e. e. = Error estándar.

POBLACION	1KM	2KB	3SM	4SB
No. de loci estudiados	10	10	10	10
No. promedio de organismos analizados (e. e.)	43.5 (2.8)	48.1 (1.1)	44.7 (2.9)	43.5 (2.6)
No. promedio de alelos por locus (e. e.)	1.3 (.2)	1.5 (.4)	1.1 (.1)	1.3 (.2)
$P \leq .95$	20	20	10	10
$H_o$ (e. e.)	.013 (.013)	.018 (.018)	.000 (.000)	.004 (.003)
$H_e$ (e. e.)	.102 (.068)	.097 (.074)	.013 (.013)	.021 (.016)

### VII.3 Similitud y distancia genética.

Los valores de similitud genética (Tabla XI) son altos intraespecíficamente (.986 entre 1KM y 2KB; .898 entre 3SM y 4SB).

Interespecíficamente los valores muestran una apreciable diferenciación genética (desde .699 entre 1KM y 3SM, hasta .745 entre 2KB y 3SM).

Los valores de similitud en el locus AKP-1 (Tabla XII) son altos inter e intraespecíficamente, y se llega a una similitud total (1.000) entre 4SB y 2KB, y entre 4SB y 3SM.

En EST-1 (Tabla XIII) la similitud es completa intraespecíficamente y nula interespecíficamente.

La misma situación se presenta en GPI-1 (Tabla XIV) en un grado ligeramente menor.

En EST-2 la similitud es alta entre las poblaciones de *L. keenae*, pero en las de *L. scutulata* es cero (Tabla XV).

El dendrograma (Fig. 2) de acuerdo al análisis de agrupamiento con base en los valores de identidad genética,

muestra una separación clara de *L. keenae* y *L. scutulata*. Indica también una diferenciación comparativamente mayor entre las poblaciones de *L. scutulata*.

En las Tablas XVI y XVII se dan los valores para cada especie obtenidos con el estadístico F de Wright para conocer el grado de estructuración intra e interpoblacional y la divergencia intrapoblacional en la escala de cero a uno. Un valor de uno, por ejemplo en  $F_{IT}$  para alguna de las especies, nos indicaría que las dos poblaciones analizadas no tienen diferencias genéticas entre sí.

Los valores de  $F_{IS}$  y  $F_{IT}$  en ambas especies son altos. En *L. keenae* son .842 y .853 respectivamente. En *L. scutulata* son .871 y .967 respectivamente. El valor de  $F_{ST}$  para *L. keenae* es de sólo 6.6% y en *L. scutulata* es de 74.7%.

Tabla XI. Coeficientes de similitud y de distancia genéticas (sin sesgo de Nei, 1978) para *Littorina keenae* y *L. scutulata* en los 10 loci analizados. Debajo de la diagonal la distancia y sobre la diagonal la similitud

POBLACIONES	1KM	2KB	3SM	4SB
1 KM	*	0.986	0.699	0.704
2 KB	0.014	*	0.745	0.725
3 SM	0.357	0.295	*	0.898
4 SB	0.350	0.321	0.107	*

Tabla XII. Coeficiente de similitud genética (sin sesgo de Nei, 1978) interespecifica e inter poblacional de *L. keenae* y *L. scutulata* en el locus AKP-1.

POBLACIONES	1 KM	2KB	JSM	4SB
1 KM	*			
2 KB	0.916	*		
3 SM	0.875	0.999	*	
4 SB	0.884	1.000	1.000	*

Tabla XIII. Coeficiente de similitud genética (sin sesgo de Nei, 1978) interespecífica e interpoblacional de *L. keenae* y *L. scutulata* en el locus EST-1.

POBLACIONES	1KM	2KB	3SM	4SB
1 KM	*			
2 KB	1.000	*		
3 SM	0.000	0.000	*	
4 SB	0.000	0.000	1.000	*

Tabla XIV. Coeficiente de similitud genética (sin sesgo de Nei, 1978) interespecífica e interpoblacional de *L. keenae* y *L. scutulata* en el locus GPI-1\*.

POBLACIONES	1 KM	2 KB	3 SM	4 SB
1 KM	*			
2 KB	1.000	*		
3 SM	0.000	0.000	*	
4 SB	0.021	0.021	1.000	*

\* Este locus no es polimórfico al criterio de P > .95

Tabla XV. Coeficiente de similitud genética (sin sesgo de Nei, 1978) interespecífica e interpoblacional de *L. keenae* y *L. scutulata* en el locus EST-2.

POBLACIONES	1 KM	2KB	3SM	4SB
1 KM	*			
2 KB	0.852	*		
3 SM	0.000	0.421	*	
4 SB	0.000	0.000	0.000	*

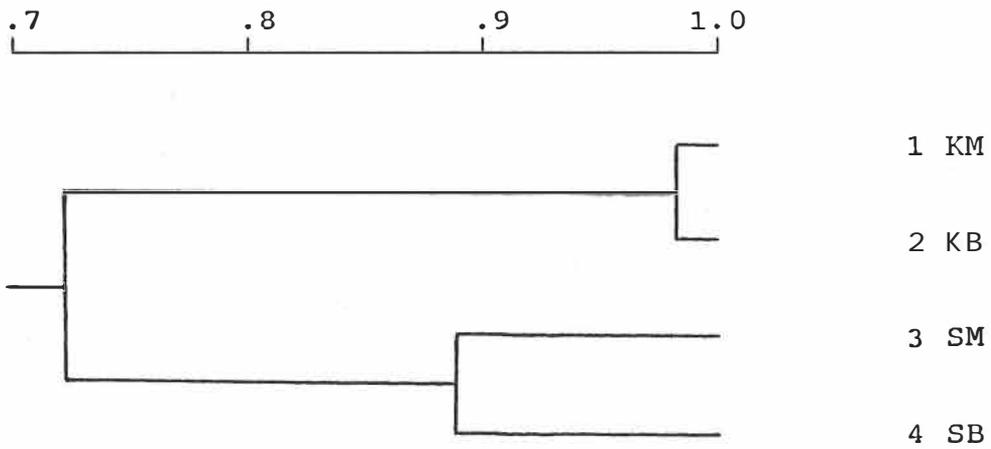


Fig. 2. Dendrograma de acuerdo al análisis de agrupamiento en función de los coeficientes de identidad genética sin sesgo de Nei (1978).

Tabla XVI. Valores obtenidos con el estadístico F de Wight y su promedio para *Littorina keenae* en dos localidades de la costa noroccidental de Ensenada, Baja California, México.  $F_{IS}$  es la homogeneidad intrapoblacional;  $F_{IT}$  es la homogeneidad de una población respecto a la otra;  $F_{ST}$  es la estructuración genética intrapoblacional o porcentaje de loci heterogéneos respecto a la frecuencia de sus alelos entre las poblaciones.

LOCUS	$F_{IS}$	$F_{IT}$	$F_{ST}$
AKP-1	1	1	0.086
EST-2	0.751	0.765	0.055
PROMEDIO	0.842	0.853	0.066

Tabla XVII. Valores obtenidos con el estadístico F de Wright y su promedio para *Littorina scutulata*. La notación es similar a la de la Tabla XVI.

LOCUS	$F_{IS}$	$F_{IT}$	$F_{ST}$
AKP-1	0.915	0.915	0.001
EST-2	-----	1.000	1.000
GPI-1	0.659	0.663	0.012
PROMEDIO	0.871	0.967	0.747

## VIII. DISCUSIÓN

La considerable variación de las dimensiones de la concha de los litorínidos locales se muestra al traslaparse el diámetro total y el número de espiras en poblaciones de distinta especie y localidad. Esto dificulta la separación taxonómica si se consideran solo estas variables y es aún más difícil si se considera que estas variaciones son intra e interespecíficas y que *L. keenae* y *L. scutulata* traslapan su distribución en el nivel medio de marea.

El polimorfismo fenotípico en *Littorina* y particularmente de su concha ha sido documentado anteriormente (Gooch, 1975; Raffaelli, 1979). La concha tiene influencias multifactoriales como se ha señalado para *L. mariae* y *L. obtusata* (Murray, 1975). Esta variabilidad ha sido relacionada con factores ambientales (Struhsaker, 1968; Behrens, 1972; Janson, 1982) y geográficos (Vermeij, 1973; Chow, 1987). Incluso se han encontrado considerables diferencias intraespecíficas a distancias tan cortas como 30 m (Janson y Sundberg, 1983).

El hecho de que las conchas del área sur de La Bufanda

ambientales que pueden influir en las variaciones del tamaño de la concha, en *Littorina* (Struhsaker, 1968). Este autor menciona que los principales factores son probablemente la acción de las olas, inmersión prolongada, desecación, alta temperatura y salinidad extrema. A estas pudiéramos agregar además la disponibilidad de alimento, depredadores, parásitos, existencia de refugios, además de otros factores físicos o químicos del medio.

Sin embargo, cabe mencionar que al considerar las razones de las medidas de las conchas, las poblaciones de *L. keenae* de ambas localidades no presentaron diferencias morfológicas. A su vez, fue evidente una mayor variabilidad en la forma de la concha en *L. scutulata*, ya que sólo en la razón longitud de abertura/longitud total no hubo diferencias.

En cuanto a las comparaciones de las poblaciones de *L. keenae* de ambas localidades con los lotes adicionales del nivel medio de marea de la misma especie, se observan diferencias en el tamaño de la concha, de acuerdo a la posición en que se ubica una población en el intermareal. Estas diferencias están dadas en las dos localidades por valores promedio mayores de todas las variables para los

organismos del nivel alto y de rocío de marea con respecto al nivel medio.

Peterson (1964, citado por Behrens, 1992) encontró una relación directa entre el límite inferior de *L. keenae* y la intensidad del movimiento del agua. North (1954) demostró que los individuos grandes de *L. keenae* y *L. scutulata* son removidos más fácilmente por la corriente. Es decir, éstas ofrecen menos resistencia al movimiento del agua. Esto probablemente explica la distribución de tallas en las localidades de este estudio.

Sin embargo, un factor adicional a considerar, además de los varios ya señalados anteriormente, es el de la edad, la cual puede afectar en cierto grado la distribución de los organismos en el intermareal (Struhsaker, 1968).

Por otro lado, al considerar las razones biométricas de *L. keenae* incluídas las poblaciones del nivel medio de marea, se observa que la variabilidad morfológica es menor en la localidad de Punta Morro, pues en dos de las razones hubo igualdad (longitud de abertura/longitud total y número de espiras/longitud total). Por el contrario, en la localidad del área sur de La Bufadora las diferencias morfológicas son mayores entre las poblaciones del nivel alto de marea y el

nivel medio, ya que en todas las razones obtenidas hubo diferencias.

Por todo lo anterior, estudios integrales que consideren los diversos factores locales relacionados al tamaño y forma de la concha y a la distribución en el intermareal, son recomendables.

Las dimensiones que presentan las conchas de *L. keenae* y *L. scutulata* en el área de estudio se pueden ubicar dentro de los valores más pequeños que se han reportado para algunos litorínidos en la costa del Pacífico Americano (Tabla XVIII).

Tabla XVIII.- Longitud (en mm) de la concha de litorínidos adultos en la costa del Pacífico Americano.

Isla de Vancouver, Canadá

<i>Littorina scutulata</i>	9.5-9.8	*
<i>L. sitkana</i>	8.0-12.4	*

California

<i>L. keenae</i>	9.2-15.3	**
<i>L. scutulata</i>	7.3-12.2	**

Ensenada, Baja California, México

<i>L. keenae</i>	5.5-11.0	***
<i>L. scutulata</i>	5.3-10.1	***

Isla Naos, Zona del Canal de Panamá

<i>L. modesta</i>	8.5-12.4	**
<i>L. aspera</i>	10.1-14.1	**

Estación Biológica Darwin, Galápagos

<i>Nodilittorina galapagensis</i>	7.5-8.7	**
<i>L. modesta paytensis</i>	5.8-7.8	**
<i>L. astrata</i>	4.8-5.7	**

Punta Cornero, Ecuador

<i>L. modesta paytensis</i>	7.9-14.1	**
-----------------------------	----------	----

(continuación de la Tabla XVIII)

Isla San Lorenzo, Perú

<i>L. peruviana</i>	8.0-11.7	**
---------------------	----------	----

Monterar, Chile

<i>L. peruviana</i>	8.6-16.0	**
---------------------	----------	----

\* Sacchi y Voltolina (1987)

\*\* Verreij (1973)

\*\*\* Este estudio

En cuanto a los aspectos genéticos de este estudio los valores de P obtenidos son inferiores de los reportados para *L. scutulata* y *L. plena* en cinco localidades de la costa oeste de Estados Unidos de Norteamérica y sur de Canadá por Mastro *et al.* (1982) al analizar 10 loci. En su caso, el valor de P fue de 80% en ambas especies.

Por otro lado, los valores de  $H_o$  y de  $H_e$  obtenidos para *L. keenae* y *L. scutulata* en este trabajo son bajos si se comparan con los de otras especies de *Littorina* (Beardmore y Morris, 1978 y Ward y Janson, 1985). Por ejemplo para *L. littorea*, *L. nigrolineata* y *L. arcana* los valores de  $H_o$  son .117, .080 y .219 respectivamente (Tabla XIX).

Los valores de  $H_o$  y  $H_e$  de *L. keenae* y *L. scutulata* también son bajos si se comparan con los de otras especies de gasterópodos marinos como *Astraea undosa*, con valores de .128 y .164, respectivamente (Fernández-Apango, 1992), *Crepidula onyx*, con valores de .106 y .195, respectivamente (Woodrof, 1986), *Patella vulgata*, con .122 y .128, respectivamente (Wilkins, 1977) y *P. aspera*, con .177 y .368, respectivamente (Wilkins, *op. cit.*).

Aunque la proporción de loci polimórficos (P) puede emplearse para estimar la variabilidad de una población, este

estadístico es hasta cierto punto arbitrario, ya que si se usara como criterio la frecuencia del alelo más común igual o inferior a .99 (Dobzhanski et al., 1980) en vez de .95, *L. scutulata* tendría un polimorfismo de 20% en la localidad BU, ya que PGI-1 sería un locus polimórfico.

Una estimación más precisa de la variación génica se logra por medio de la heterocigosis, ya que esta refleja el grado de diversidad génica entre los loci analizados, y su valor puede variar sustancialmente cuando se estudian distintos conjuntos de loci (Dobzhansky et al., op. cit.)

De acuerdo a esto último, los valores de P y H en este estudio quizá fueron bajos por el sesgo que implicó una elección arbitraria de los loci en función de una buena resolución. Variarán también, y probablemente los valores se incrementarán, si se amplía el número de loci a analizar, más que el número de individuos por locus.

Los promedios generales de heterocigosis observada y esperada para el género *Littorina* obtenidos de diversos estudios (Beardmore y Morris, 1978; Wilkins y O'Regan, 1980; Ward y Janson, 1985) son .217 y .170 respectivamente.

Tabla XIX. Comparación de la variabilidad genética entre diversas especies de *Littorina*. PA es el número de poblaciones analizadas; NL es el número de loci analizados; NA es el número promedio de alelos por locus; Ho es la heterocigosis observada promedio; He es la heterocigosis esperada promedio.

ESPECIE	PA	NL	NA	Ho	He	
<i>L. littorea</i>	9 <sup>a</sup>	10	-	.117	.127	*
<i>L. nigrolineata</i>	3 <sup>b</sup>	10	-	.080	.091	*
<i>L. rudis</i>	9 <sup>c</sup>	10	-	.209	.244	*
<i>L. arcana</i>	4	7	2.1	.219	.253	**
<i>L. saxatilis</i>	5	7	2.3	.339	.361	**
<i>L. keenae</i>	2	10	1.4	.015	.099	***
<i>L. scutulata</i>	2	10	1.2	.002	.017	***

\* Beardmore y Morris (1978)

\*\* Ward y Janson (1985)

\*\*\* Este estudio

a y c. - Poblaciones en función del nivel de marea.  $\bar{X} = 1.8$  poblaciones por localidad en cinco localidades.

b. - Poblaciones en función del nivel de marea.  $\bar{X} = 1.8$  / localidad (2).

Por otra parte, para tratar de explicar la deficiencia de heterocigotos es necesario tener en cuenta algunas consideraciones:

La composición y variabilidad genética de las poblaciones es determinada por múltiples factores como selección natural, mutaciones, deriva y flujo génico (Ayala y Kiger, 1984; Cook, 1991; Dobzhansky et al., 1980).

La evolución se produce al modificarse el equilibrio génico por los cambios ambientales. Estas modificaciones permiten mantener una alta variabilidad genética, la cual se mide por el número de loci heterocigotos. La heterocigosis no sólo tiene valor adaptativo si no que constituye una reserva de variabilidad que puede utilizarse cuando se presentan los cambios (Fontdevila, 1978). La ventaja del heterocigoto se puede manifestar, entre otras formas, cuando la selección es disruptiva o periódica (diferentes genotipos seleccionados en diferentes tiempos y lugares, en ambientes variables) (Fincham, 1972).

Además, si la selección natural sobre el genotipo es constante, entonces el equilibrio estable también indica ventaja de heterocigotos (Cook, 1991).

En el caso particular del género *Littorina* los diversos estudios realizados hasta ahora han llegado a diferentes conclusiones al analizar la variabilidad genética. Algunos han encontrado una notable diferenciación geográfica inter e intraespecíficamente en las frecuencias alélicas de algunos loci (Berger, 1972, 1973). Por otra parte, otros estudios han demostrado una gran homogeneidad en algunos loci a grandes distancias (Mastro *et al.*, 1982). Sin embargo, con la escasa cantidad de información disponible en la actualidad sólo se podrían caracterizar genéticamente de manera parcial algunas especies europeas. Para la zona de estudio y las regiones cercanas aún existe una evidente falta de información.

Dentro de este contexto se pueden señalar algunas posibles causas de la deficiencia de heterocigotos en algunas especies de *Littorina*. Por ejemplo, Beardmore y Morris (1978) la atribuyen al traslape en la distribución y consecuentemente la reducción del nicho de *L. littorea* y *L. rudis*.

Gaines *et al.* (1974) se lo adjudica al efecto de Walhund, al estudiar a *L. angulifera* en poblaciones dispersas en diferentes islas relativamente cercanas.

Particularmente, *L. keenae* y *L. scutulata* traslapan su distribución en el área de estudio en el nivel medio de marea. Pero se carece de alguna evidencia que indique selección natural en relación a la deficiencia de heterocigotos como podrían ser interacciones biológicas aún con otras especies. Algunas de estas interacciones que pueden presentarse en estos organismos son la competencia y la depredación, además de factores físicos o la interacción de todos éstos (Scheltema, 1978). Bingham (1972) señala como ejemplos de factores del medio que afectan a *L. irrorata* la escasa humedad o variaciones en la salinidad.

Una variabilidad génica menor entendida como la fijación de alelos flexibles que operan en ambientes oscilantes (Valentine, 1978), podría también explicar la deficiencia de heterocigotos. Este tipo de proceso ya ha sido señalado en otros gasterópodos marinos como *Patella vulgata* (Wilkins, 1977).

Sobre el efecto de Walhund, que se refiere a la existencia de poblaciones cercanas de las mismas especies con diferentes frecuencias alélicas, que al mezclarse producen deficiencias de heterocigotos, es difícil opinar por la poca información disponible.

Por otra parte, la condición dióica de *L. keenae* y *L. scutulata* (Murray, 1979; Sacchi y Voltolina, 1987; Reid, 1990b), su desarrollo planctónico (Behrens, 1977, 1989, 1992) y las densidades poblacionales elevadas (en ambas localidades y especies las densidades alcanzaban en ocasiones hasta más de 300 individuos por metro cuadrado) nos dan elementos para suponer que la probabilidad de endogamia es limitada, y por lo tanto no es la explicación más exacta.

Factores adicionales a considerar para explicar la deficiencia de heterocigotos son la subestimación de la cantidad de variación génica por electroforesis (Pasteur et al., 1988) y los errores o el sesgo contra heterocigotos que pueden presentarse en la lectura de los geles (Ayala et al., 1973). Además, las variantes alélicas no detectables por este método (Dobzhansky et al., 1980), ya que sólo una tercera parte de todas las sustituciones de aminoácidos son detectables por electroforesis, según Lewontin (1974, citado por Dobzhansky et al., 1980).

La enzima del locus polimórfico EST-2 para *L. keenae* se ubica dentro de aquellas que emplean sustratos originados del ambiente, los cuales pueden presentar considerable variación en su disponibilidad, concentración o ambos. Por esta razón, estas enzimas son también más variables o polimórficas que

aquellas que usan sustratos específicos. Tanto esterasa como fosfatasa alcalina (AKP-1) en *Drosophila* y el hombre usan sustratos variables y lo mismo se ha demostrado, para la esterasa en pequeños vertebrados. Este polimorfismo puede presentarse como alelos múltiples (Johnson, 1974), y los productos de variantes alélicas difieren en sus propiedades adaptativas (Koehn, 1969). AKP-1 es el locus polimórfico en *L. scutulata*.

Las variantes alélicas en *L. keenae* para EST-2 son ligeramente mayores en la localidad BU, lo cual puede significar alguna diferencia en las condiciones tróficas.

Los valores altos de similitud genética indican que intraespecíficamente no existe aislamiento reproductivo, y que existe flujo génico, aunque con algún grado de diferenciación o interrupción sobre todo en *L. scutulata*.

Particularmente en el locus AKP-1, los valores de similitud son altos entre especies, lo cual puede sugerir una selección ligera de alelos diferentes.

Con base en que la similitud intraespecífica es completa y entre especies es de cero, podría sugerirse a EST-1 y GPI-1



vista genético. El valor de  $F_{ST}$ , que en *L. scutulata* es de 74.7%, se deriva de la influencia de las diferencias alélicas ya señaladas de un solo locus, esterasa-2. Este valor indica una elevada estructuración genética intrapoblacional.

Sin embargo, un solo locus, que además es monomórfico, no posee información suficiente para discernir sobre las estructuras de las poblaciones de una especie, pues aún un locus polimórfico puede proporcionar una información débil (Burton, 1983). Asimismo, es posible que a muestras mayores de 50 individuos se puedan detectar más variantes alélicas. Y por otra parte, se carece de información suficiente de otras zonas aledañas sobre la variabilidad de este locus.

Por todo lo anterior resulta difícil una conclusión definitiva en este aspecto.

Aunque la relación entre datos morfológicos y genéticos ha sido estudiada anteriormente en otros grupos animales (Schell et al., 1978, citado por Dillon y Davis, 1980) y en *Littorina* (Newkirk y Doyle, 1975; Janson, 1982; Janson y Ward, 1984), en general se ha encontrado poca evidencia de la misma (Dillon y Davis, 1980).

Los tamaños de la concha de *L. keenae* y *L. scutulata* no muestran relación con las características genéticas. Pero al considerar las razones biométricas se podría sugerir una relación entre la falta de diferencias morfológicas de las poblaciones de *L. keenae* en ambas localidades y su mayor similitud genética. Igualmente, las diferencias observadas en las razones entre variables morfométricas apoyarían la mayor distancia genética entre las dos poblaciones de *L. scutulata*.

Sin embargo, para establecer con mayor precisión alguna relación morfométrico-genética, son necesarios un mayor número de experimentos, en los cuales también se analice la influencia de los factores ambientales, en un mayor número de localidades.

## IX. CONCLUSIONES.

Existe una considerable variación en las dimensiones de la concha tanto de *Littorina keenae* como de *L. scutulata*, y particularmente la primera especie presenta diferencias en función de su ubicación en el intermareal. Ambas situaciones reflejan diferencias locales.

Morfológicamente las poblaciones de *L. keenae* no presentaron diferencias entre localidades. En la localidad de Punta Morro las variaciones entre el nivel de rocío de marea y el nivel medio fueron menores.

Las poblaciones analizadas de *L. keenae* y *L. scutulata* tienen valores comparativamente bajos de variabilidad genética respecto de otras especies del género, en función de la muestra genética analizada.

Ambas especies muestran intraespecíficamente una alta similitud genética e interespecíficamente una apreciable diferenciación. A su vez *L. keenae* presenta una escasa estructuración genética entre sus poblaciones y *L. scutulata* una elevada estructuración, la cual se debe a la influencia de un solo locus (esterasa-2) y puede estar asociada al tamaño de la muestra.

## LITERATURA CITADA

- ABREU-GROBOIS, A. 1983. Population genetics of *Artemia*. Tesis Doc. Univ. College of Swansea. Great Britain. 438 pp.
- ARGOTE-ESPINOZA. M. L., A. Amador y C. Morales. 1975. Distribución de los parámetros salinidad y temperatura y tendencias de circulación en la Bahía de Todos Santos, B. C. Mem. Primera Reunión CIBCASIO: 3-30.
- AVISE, J. C. 1974. Systematic value of electrophoretic data. Syst. Zool. 23 : 465-481.
- AYALA, F. J. 1978. Mecanismos de la evolución. Investigación y Ciencia 26 : 18-33.
- AYALA, F. J., D. Hedgecock, G. S. Zummalt & J. W. Valentine. 1973. Genetic variation in *Tridacna maxima* an ecological analog of some unsuccessful evolutionary lineages. Evolution 27 (2): 177-191.
- AYALA, F. J. y J. A. Kiger, Jr. 1984. Genética Moderna. Ed. Fondo Educativo Interamericano, S.A. México. 813 pp.

- AYALA, F. J., J. W. Valentine. 1974. Genetic variability in the cosmopolitan deep-water ophiuran *Ophiosmusium lymani*. Mar. Biol. 27: 51-57.
- BEARDMORE, J. A. y S. R. Morris. 1978. Genetic variation and species coexistence in *Littorina*. En: Marine organisms. Genetics, ecology and evolution. Battaglia, B. y J. A. Beardmore (Eds.) Plenum Press. New York. 123-140.
- BEAUMONT, A. R. y S. A. A. Khamdan. 1991. Electrophoretic and morphometric characters in population differentiation of the pearl oyster, *Pinctada radiata* (Leach), from around Bahrain. J. Moll. Stud. 57: 433-441.
- BEHRENS, S. 1972. The role of wave impact and desiccation on the distribution of *Littorina sitkana* Philippi, 1845. The Veliger 15 (2): 129-132.
- BEHRENS, S. 1977. Geographic range limitation of the intertidal gastropods *Littorina sitkana* and *L. planaxis*. Mar. Biol. 39: 61-65.
- BEHRENS, S. 1989. Are direct developers more locally adapted than planktonic developers?. Mar. Biol. 103: 403-411.

- BEHRENS, S. 1992. Niche relationship in northeastern Pacific littorines. Proc. Third Int. Symp. on Littorinid Biol. London. 281-291.
- BERGER, E. M. 1972. The distribution of genetic variation in three species of *Littorina*. Biol. Bull. 143: 455.
- BERGER, E. M. 1973. Gene enzyme variation in three sympatric species of *Littorina*. Biol. Bull. 145: 83 - 90.
- BINGHAM, F. O. 1972. The mucus holdfast of *Littorina irrorata* and its relationship to relative humidity and salinity. The Veliger 15(1): 48-50
- BLACK, R. M. 1976. Elementos de paleontología. Fondo de Cultura Económica. Mexico, D. F. 400 pp.
- BROCK, V. 1978. Morphological and biochemical criteria for the separation of *Cardium glaucum* (Bruguiere) from *C. edule* (L.) Ophelia 17(2): 207-214.
- BUROCKER, N. E. 1983. Population genetics of the American oyster *Crassostrea virginica* along the Atlantic Coast and the Gulf of Mexico. Mar. Biol. 75: 99-112.

- BUROCKER, N. E., W. K. Hershberger y K. K. Chaw 1979. Population genetics of the family Ostreidae. II. Interspecific studies of the genera *Crassostrea* and *Saccostrea*. Mar. Biol. 54: 171- 184.
- BURTON, R. S. 1983. Protein polymorphisms and genetic differentiation of marine invertebrate populations. Mar. Biol. Lett. 4: 193 - 206.
- CHAVEZ-DE OCHOA, C. 1975. Algunas condiciones de surgencia durante la primavera de 1974, para el área adyacente a Punta Banda, Baja California. Ciencias Marinas 2(2): 111 - 124.
- CHOW v. 1987. Morphological classification of sibling species of *Littorina* (Gastropoda: Prosobranchia): Discretionary use of discriminant analysis. The Veliger 29(4) : 359-366.
- COLE, T. J. 1978. Preliminary ecological-genetic comparison between unperturbed and oil-impacted *Urosalpinx cinerea* (Prosobranchia : Gastropoda) populations: Nobska Point (Woods Hole) and Wild Harbor (West Falmouth), Massachusetts. J. Fish. Res. Board Can. 35 : 624-629.

- COMISION DE ESTUDIOS DEL TERRITORIO NACIONAL. 1976. Carta geológica H11B12. Escala 1:50,000. Secretaria de Programación y Presupuesto. México.
- COMISION DE ESTUDIOS DEL TERRITORIO NACIONAL. 1977. Carta geológica H11B22. Escala 1:50,000. Secretaria de Programación y Presupuesto. México.
- COOK, L. M. 1991. Genetic and ecological diversity. The sport of nature. Chapman & Hall. 192 pp.
- DILLON, R. 1991. Electrophoresis-2. How to read a gel. *World Aquaculture* 22(4): 60-61.
- DILLON, R. T. y G. M. Davis. 1980. The *Goniobasis* of southern Virginia and northwestern North Carolina: genetic and shell morphometric relationships. *Malacologia* 20(1): 83-98.
- DILLON, R. T. y J. J. Manzi. 1987. Hard clam, *Mercenaria mercenaria* Broodstocks: genetic drift and loss of rare alleles without reduction in heterozygosity. *Aquaculture* 60: 99-105.

DILLON R. T. Jr y J. J. Manzi. 1989. Genetics and shell morphology in a hybrid zone between the hard clams *Mercenaria mercenaria* and *M. campechiensis*. Mar. Biol. 100: 217-222.

DIXON, D. R. 1983. Methods for assessing the effects of chemicals on reproductive function in marine molluscs. En: Methods for assessing the effects of chemicals on reproductive functions. V. B. Vouk & P. J. Sheehan (eds.): 439-457.

DOBZHANSKY, T., F. J. Ayala, G. L. Stebbins y J. W. Valentine. 1980. Evolución. Primera Edición. Omega. Barcelona, España. 558 pp.

ESCOBAR-FERNANDEZ, R. 1991. Variabilidad genética en dos poblaciones distintas del camarón café (*Penaeus californiensis* Holmes, 1900) en el Golfo de California. Tesis Maestría en Ciencias. CICESE. Ensenada, México. 100 pp.

FERNANDEZ-APANGO J. A. 1992. Caracterización genética del caracol *Astraea undosa* (Mollusca : Gasteropoda) de la costa oeste de la península de Baja California,

México. Tesis Maestría en Ciencias. FCM-UABC.  
Ensenada, México. 80 pp.

FINCHAM, J. R. S. 1972. Heterozigous advantage as a likely general basis for enzyme polymorphism. *Heredity* 28: 387-391.

FONTDEVILA, A. 1978. El mantenimiento de la variabilidad genética de las poblaciones. *Investigación y Ciencia* 20: 94-103.

GAINES, M. S., J. Caldwell y A. M. vivas. 1974. Genetic variation in the mangrove periwinkle *Littorina angulifera*. *Mar. Biol.* 27 : 327-332.

GARDNER, J. P. A. y D. O. F. Skibinski. 1990. Genotype dependent fecundity and temporal variation of spawning in hybrid mussel (*Mytilus*) populations. *Mar. Biol.* 105 :153-162.

GOOCH, J. L. 1975. Mechanisms of evolution and population genetics. En: *Marine Ecology*. O. Kinne (ed.) Cap. 6. Vol. II. Part I :349-409.

- HARRIS, H. y D. A. Hopkinson. 1978. Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics. Supplement. North-Holland. Publ. Co. Amsterdam
- JANSON, K. 1982. Genetic and environment effects on the growth rate of *Littorina saxatilis*. Mar. Biol. 69 :73 - 78.
- JANSON, K. 1985. Variation in the occurrence of abnormal embryos in females of the intertidal gastropod *Littorina saxatilis* Olivi. J. Mollusc. Stud. 51: 64-68.
- JANSON, K. y P. Sundberg. 1983. Multivariate morphometric analysis of two varieties of *Littorina saxatilis* from the Swedish west coast. Mar. Biol. 74 : 49-53.
- JANSON, K. y R. D. Ward. 1984. Microgeographic variation in allozyme and shell characters in *Littorina saxatilis* Olivi (Prosobranchia: Littorinidae). Biol. J. Linn. Soc. 22 : 289-307.
- JENSEN, J. T. 1981. Distribution, activity, and food habits of juvenile *Tegula funebris* and *Littorina scutulata*

as they relate to resource partitioning. *The Veliger* 23(4) : 333-338.

JOHNSON, G. B. 1974. Enzyme polymorphism and metabolism. *Science* 184: 28-37.

JOHNSON, M. S., B. CLARKE y J. Murray. 1977. Genetic variation and reproductive isolation in *Partula*. *Evolution* 31 :116-126.

KEEN, A. M. 1971. Sea shells of tropical West America. Marine mollusks from Baja California to Peru. Segunda edición. Stanford University Press. California. 1064 pp.

KEEN, A. M. y E. Coan. 1974. Marine mollusca genera of western North America. An illustrated key. Stanford. Univ. Press. Cal.208 pp.

KOEHN, R. K. 1969. Esterase heterogeneity: dynamics of a polymorphism. *Science* 163: 943-944.

KOEHN, R. K., J. E. Pérez y R. B. Merritt. 1971. Esterase enzyme function and genetical structure of populations

of the freshwater fish, *Notropis stramineus*. Am. Natur. 105: 51-69.

LARGEN, M. J. 1971. Genetic and environmental influences upon the expression of shell sculpture in the dog whelk (*Nucella lapillus*). Proc. Malac. Soc. Lon. 39:383-388.

MASTRO, E., V. Chow y D. Hedgecock, 1982. *Littorina scutulata* and *Littorina plena*: sibling species status of two prosobranch gastropod species confirmed by electrophoresis. The Veliger 24(3): 239-246.

MORRIS, P. A. 1974. A field guide to Pacific coast shells, including shells of Hawaii and the Gulf of California. Segunda edición. National Audubon Society y National Wildlife Federation. Boston. 297 pp.

MURPHY, P. G. 1976. Electrophoretic evidence that selection reduces ecological overlap in marine limpets. Nature 261:228-230.

MURRAY, J. 1975. The genetics of the Mollusca. En: Handbook of genetics. King, R. C. (ed.). Vol. 3, chap. 1. Plenum Press. New York and London : 3-31.



- PIANKA, E. R. 1982. Ecología evolutiva. Primera edición. Omega. Barcelona, España. 365 pp.
- RAFAELLI, D. G. 1979. Taxonomy of the *Littorina saxatilis* species complex, with particular reference to the systematic status of *Littorina patula* Jeffreys. Zool. J. Linn. Soc. 65: 219-232.
- REID, D. G. 1990a. Trans-artic migration and speciation induced by climatic change: the biogeography of *Littorina* (Mollusca : Gastropoda). Bull. Mar. Sci. 47(1): 35-49.
- REID, D. G. 1990b. A cladistic phylogeny of the genus *Littorina* (Gastropoda): implications for evolution of reproductive strategies and for clasification. Hydrobiologia. 193: 1-19.
- RICKETTS, E. F. y J. Calvin, 1968. Between pacific tides. Stanford Univ. Press. Stanford, Cal. 614 pp.
- ROSEWATER, J. 1979. A close look at *Littorina radulae*. Bull. Mal. Union. 1979: 5-8.

SACCHI, C. F. y D. Voltolina. 1987. Recherches sur l'ecologie comparee des littorines (Gastropoda-Prosobranchia) dans l'ile de Vancouver (British Columbia, Canada). Atti Soc. Ital. Sci. Nat. 128 : 209-234.

SCHAAL, B. A. y W. W. Anderson. 1974. An outline of techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from the American oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. Tech. Rep. Ser. Georgia. Mar. Sci. Cent. 74(3): 1-18.

SHELTEMA, R. S. 1978. On the relationship between dispersal of pelagic veliger larvae and the evolution of marine prosobranchy gastropods. En : Marine organisms. genetics, ecology and evolution. Battaglia, B. and J. A. Beardmore (eds.). Plenum Press. New York. 303-322.

SELANDER, R. K. , M. H. Smith, S. Y. Yang, W. E. Johnson y J. B. Gentry. 1971. IV. Biochemical polymorphism and systematics in the genus *Peromyscus*. I. Variation in the old field mouse (*Peromyscus polionatus*). Stud. Genet. 6. Univ. Texas Publ. 7103 : 49-90.

SELANDER, R. K., S. Y. YANG, R. C. LEWONTIN, W. E. JOHNSON. 1970. Genetic variation in the horseshoe crab (*Limulus*

*polyphemus*) a phylogenetic "relic". *Evolution* 24: 402-414.

SHAW, C.R. y A. L. Koen. 1968. Starch gel zone electrophoresis of enzymes. En: *Chromatographic and Electrophoresis Techniques*, Chapter 9, Vol. II. Smith, i. (ed.). Interscience. Publ. N. Y. 325-364.

SHAW, C. R. y R. Prasad. 1970. Starch gel electrophoresis of enzymes. A compilation of recipes. *Biochem. Genet.* 4: 297-320.

SNYDER, T. y GOOCH, J. L. 1973. Genetic differentiation in *Littorina saxatilis* (Gastropoda). *Mar. Biol.* 22: 177-182.

STRUHSAKER, J. W. 1968. Selection mechanisms associated with intraspecific shell variation in *Littorina picta* (Prosobranchia : Mesogastropoda). *Evolution* 22 : 459 - 480.

SWOFFORD, D. L. y R. B. Selander. 1989. BIOSYS-1. A computer program for the analysis of allelic variation in population genetic and biochemical systematics. Univ. of Illinois. 42 pp.

U.S. Department of the Interior. 1978. Description of the Coastal Environment from Point Reyes to Punta Eugenia. Reference Paper No. II. Vol. 1 - 3.

VALENTINE, J. 1978. Adaptative strategies in the sea. En: Marine organisms, genetics, ecology and evolution. Battaglia, B. y J. Beardmore (eds.) Plenum Press, New York and London. 323-345.

VERMEIJ, G. J. 1973. Morphological patterns in high-intertidal gastropods : adaptive strategies and their limitations. Mar. Biol. 20 : 319-346.

VOLTOLINA, D. y C. F. Sacchi. 1990. Field observations on the feeding habits of *Littorina scutulata* Gould and *L. sitkana* Philippi (Gastropoda, Prosobranchia) of southern Vancouver Island (British Columbia, Canada). Hydrobiologia 193 : 147-154.

WARD, R. D. y K. Janson. 1985. A genetic analysis of sympatric subpopulations of the sibling species *Littorina saxatilis* (Olivi) and *Littorina arcana* Hannaford Ellis. J. Mollusc. Stud. 51: 86-94.

WILKINS, N. P. 1977. Genetic variability in littoral gastropods: phosphoglucose isomerase and phosphoglucomutase in *Patella vulgata* and *P. aspera*. Mar. Biol. 40: 151-155.

WILKINS, N. P. y D. O'REGAN. 1980. Genetic variation in sympatric sibling species of *Littorina*. The Veliger 22(4): 355-359.

WOODRUFF, D. S., L. L. McMeekin, M. Mulvey y M. P. Carpenter. 1986. Population genetics of *Crepidula onyx*: variation in californian slipper snail recently established in China. The Veliger 29(1): 53-63.

WRIGHT, S. 1965. The interpretation of population structure by F - statistics with special regard to systems of mating. Evolution 19: 395-420.

## ANEXO

Tabla XX. Síntesis comparativa de la distribución y morfología de *Littorina keenae* y *L. scutulata*. Se incluye información obtenida en este estudio. a = *L. keenae*; b = *L. scutulata*.

Nivel de marea	Microhabitat	Espiral de la concha
a Alto y rocío de marea (1)	Grietas y superficies uniformes (*).	Baja (4)
b Bajo, medio y alto (1)	Superficies rocosas uniformes (1,2). Pozas de rocío de marea en rocas (1). Sobre algunas algas (6).	Moderadamente alta (3)

Forma de concha	Area desgastada en zona parietal de la concha	Estructura en pene
Globosa (*)	Presente (4)	0-3, usualmente 2 glándulas peniales (4)
Cónica (*)	Ausente (4)	Filamento corto (4)

(continuación de la Tabla XX).

Tipo de rádula	Cápsula de huevos	Desarrollo	Período de vida (años)
Moderada (5)	Pelágica (7)	Planctónico (1)	15 (1)
Moderada (5)	Pelágica (7)	Planctónico (1)	7 (1)

- (1) Behrens (1992)  
 (2) Voltolina y Sacchi (1990)  
 (3) Morris (1974)  
 (4) Comunicación personal del Dr. Reid  
 (5) Rosewater (1979)  
 (6) Jensen (1981)  
 (7) Murray (1979)  
 (\*) Este estudio.

Tabla XXI. Características en las que se colectó *Littorina keenae*, (a) y *L. scutulata* (b) en las localidades visitadas para este estudio.

PM (Punta Morro)		BU (La Bufadora)		
Nivel de Marea	Microhabitat	Nivel de Marea	Microhabitat	
a)	Rocío de Marea	Superficies expuestas uniformes y grietas de rocas.	Alto	Superficies expuestas uniformes, grietas y agujeros de rocas.
b)	Medio	Depresiones y agujeros de roca.	Medio	Depresiones y agujeros de roca. Pozas de marea en rocas.

Tabla XXII. Características en las que se colectaron los lotes adicionales de *L. keenae*.

	PM	BU
Nivel de marea	Medio	Medio
Micro-habitat	Especímenes escasos en agujeros de rocas. Algunos en zonas expuestas al oleaje.	En grietas, agujeros y áreas protegidas de rocas. Pocos en zonas expuestas. En pozas de marea algunos especímenes. Más abundantes en grietas adyacentes afuera de las pozas de marea.