

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



**“CARACTERIZACIÓN MORFOMÉTRICA Y GENÉTICA DE *Littorina keenae*
(Rosewater 1978) DE ISLA GUADALUPE E ISLA CEDROS, B.C., MÉXICO”**

TESIS

**QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER
EL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

PRESENTA

JOSÉ ALFREDO ORTIZ SARTORIUS

ENSENADA, B.C., MÉXICO

JUNIO 2018

Resumen

En el presente estudio se realizó la caracterización de la morfometría y de la variabilidad genética a nivel alozímico del gasterópodo del intermareal rocoso *L. keenae* de Isla de Cedros e Isla de Guadalupe. El análisis morfométrico se realizó empleando el Análisis de Componentes Principales (ACP) y la creación de Funciones Empíricas Ortogonales (FEO) donde la correlación Canónica mostró tres grupos homogéneos entre sí, pero heterogéneos con respecto al otro, reflejando cada uno el resultado sinérgico de variables ambientales como: la temperatura, el oleaje, la pendiente y la influencia de la Corriente de California. Los resultados del análisis morfométrico presentan una buena herramienta como aproximación ya que reduce el sesgo debido a las diferencias de talla de organismos y de esta manera se propone el uso de ACP y la creación de FEO como un método taxonómico alternativo o complementario para diferenciar entre especies cuando no se cuenta con especies tipo. En el análisis de variabilidad genética de 11 loci provenientes de 3 sistemas enzimáticos se obtuvieron los principales estimadores genéticos (H_o , H_e , Deficiencia de heterocigotos, Distancia e identidad de Nei y los estadísticos de F Wright). Los valores de F_{ST} y el Nm por generación por pares de poblaciones con el fin de determinar la dirección y la intensidad del flujo génico. LKCESA fue la única población que mostro deficiencia significativa de heterocigotos y, por ende, en desequilibrio de Hardy Weimberg. Los valores de F_{ST} oscilaron de 0.002 ($Nm = 124.7$ por generación) hasta 0.029 ($Nm = 8.37$). No obstante que se presentan distancias geográficas considerables el valor de Identidad genética más bajo fue de 0.954, esto debido principalmente a la influencia de la Corriente de California y las estrategias reproductivas de la especie. La relación entre distancia génica de Nei (1978) y distancia geográfica fue positiva y significativa ($R^2 = 0.404$, $P = 0.011$), demostrando que en este estudio se cumplen parcialmente los principios de teoría de islas (MacArthur y Wilson (1967)). Este estudio contribuye con el conocimiento desde la perspectiva ecológica, sistemática y genética de *Littorina keenae*.

Palabras clave: *Littorina keenae*, Análisis morfométrico, Análisis de Componentes Principales, Funciones Empíricas Ortogonales, genética de poblaciones, diversidad genética.

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



CARACTERIZACIÓN MORFOMÉTRICA Y GENÉTICA DE *Littorina keenae*
(Rosewater 1978) DE ISLA GUADALUPE E ISLA CEDROS, B.C., MÉXICO"

TESIS

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER
EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

PRESENTA

JOSÉ ALFREDO ORTIZ SARTORIUS

Dr. Francisco Correa Sandoval
Director

Dra. Ivon Giffard Mena
Sinodal

Dr. Eduardo Santamaría Del Ángel
Sinodal

Dr. Faustino Camarena Rosal
Sinodal

Ensenada B.C. México.

Junio 2018.

Agradecimientos.

Agradezco a los miembros del comité:

Dr. Francisco Correa Sandoval por darme una oportunidad cuando me aceptó como director de tesis y me permitió trabajar en el laboratorio de Genética y Biología Molecular, por enseñarme tanto, apoyarme en las labores de laboratorio, por sus sugerencias que me ayudaron a ver las cosas desde otra perspectiva y por su paciencia y tiempo empleado en la realización de este trabajo.

Dra. Ivone Giffard, Dr. Faustino Camarena y Dr. Eduardo Santamaría Del Ángel, por su disposición, su apoyo, sus observaciones, sugerencias y tiempo dedicado a la revisión del presente estudio.

Al programa de Posgrado de Oceanografía Costera de la Facultad de Ciencias Marinas y al Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la UABC de quienes recibí cátedras, apoyo y dirección en mi formación profesional.

Al CONACYT por otorgarme la beca de maestría en ciencias, sin la cual indudablemente no habría sido posible continuar con mis estudios.

A mis padres y hermanos por apoyarme y creer ciegamente en este sueño y aventura.

A mis suegros y cuñado por sus consejos y buenos deseos.

A mi esposa Talía, por compartir el amor a la ciencia, seguirme y apoyarme en la búsqueda de un sueño.

Contenido

	Pagina
1.- Introducción	1
2.- Antecedentes	5
2.1 Características generales de <i>L. keenae</i> Rosewater, 1978.....	5
2.2 Estrés térmico en <i>Littorina</i>	6
2.3 Uso de alozimas en Litorínidos.....	8
2.4 Características del área de estudio.....	10
2.4.1 Isla de Guadalupe.....	10
2.4.2 Isla de Cedros.....	12
3.- Objetivos	13
4.- Materiales y Métodos	14
4.1 Análisis morfométrico.....	15
4.1.1 Análisis de Componentes Principales.....	16
4.1.2 Creación de Funciones Empíricas Ortogonales.....	17
4.2 Análisis genético.....	17
4.2.1 Extracción de proteínas solubles.....	17
4.2.2 Análisis electroforéticos.....	18
4.2.3 Electroforesis en Geles de BIS-poliacrilamida.....	20
4.2.4 Tinción e Interpretación de los zimogramas.....	20
4.3 Análisis de Datos.....	24
4.3.1 Variabilidad genética.....	24
4.3.2 Equilibrio de Hardy-Weinberg.....	25
4.3.3 Coeficiente de endogamia.....	25
4.3.4 Diferenciación poblacional y flujo genético.....	27
5.- Resultados y discusión	27
5.1.1 Caracteres morfométricos asociados a los componentes principales (ACP).....	27
5.1.2 Prototipo de poblaciones (FEO).....	32
5.1.3 Prototipo de organismos (FEO) para diferenciar entre especies de Litorínidos.....	35
5.2.1 Análisis genético.....	45
5.2.2 Diferenciación poblacional.....	58
5.2.3 Flujo genético y aislamiento por distancia.....	66
6.- Discusión general	71
7.- Conclusiones	79
8.- Futuras líneas de investigación	81
9.- Literatura citada	83
10.- Anexos	93

Lista de Figuras

	Pagina
Figura 1. Estructura general de <i>Littorina keenae</i>	5
Figura 2. Batimetría de Isla de Guadalupe.....	11
Figura 3. Batimetría de Isla de Cedros.....	12
Figura 4. Ubicación geográfica del área de estudio.....	14
Figura 5. Parámetros fenéticos en mm. de organismos de <i>Littorina keenae</i>	15
Figura 6. Ejemplo de las variaciones alozímicas en las proteínas según su estructura cuaternaria.....	21
Figura 7. Revisión, análisis e interpretación individual de geles de los sistemas enzimáticos.....	22
Figura 8. Resumen esquemático del análisis genético en laboratorio.....	23
Figura 9. Distribución espacial de los dos componentes principales de las seis localidades de acuerdo al ACP, según sus similitudes en las medidas transformadas de los cuatro parámetros: Altura de la concha (A-B), ancho de la concha (C-D), altura de la apertura (E-B) y ancho de la apertura (F-D), de organismos de <i>L. keenae</i>	30
Figura 10. Análisis de Clúster de similitud de organismos “prototipo” de <i>L. keenae</i> generados con las FEO estandarizadas de las seis localidades: LKCEPM (P. Morro), LKCESA (S. Agustín), LKCEPP (P. Prieta), LKCEPN (P. Norte), LKGUCO (Isla de Gpe. Campo Oeste) y LKGUPS (Isla de Gpe. Sur).....	32
Figura 11. Distribución espacial de los dos componentes principales de las poblaciones de <i>L. keenae</i> y <i>L. plena</i> de acuerdo a los promedios de medidas merísticas de los organismos de las diferentes localidades.....	36
Figura 12. Distribución espacial de los dos componentes principales de la razón de medidas con respecto a la altura de la concha (AB/EB, AB/CD, AB/FD) de los organismos de <i>L. keenae</i> y <i>L. plena</i>	39
Figura 13. Distribución espacial de los dos componentes principales de la razón de medidas con respecto al ancho de la concha (CD/FD Y CD/EB) de los organismos de <i>L. keenae</i> y <i>L. plena</i>	39
Figura 14. Distribución espacial de los dos componentes principales de la razón de medidas producto de la resta referente a la altura de la concha AE y con respecto al ancho de la concha CF de los organismos de <i>L. keenae</i> y <i>L. plena</i>	42
Figura 15. Distribución espacial de los dos componentes principales, empleando una rotación VARIMAX en la razón de medidas producto de la resta referente a la altura de la concha AE y con respecto al ancho de la concha CF de los organismos de <i>L. keenae</i> y <i>L. plena</i>	42

Figura 16. Análisis de Clúster de similitud de medidas AE y CF de <i>L. keenae</i> en las seis localidades: LKCEPM (P. Morro), LKCESA (S. Agustín), LKCEPP (P. Prieta), LKCEPN (P. Norte), LKGUCO (Isla de Gpe. Campo Oeste), LKGUPS (Isla de Gpe. Sur). y <i>L. plena</i> en una solaLocalidad.....	43
Figura 17. Representación esquemática de la variación alélica en 6 poblaciones de <i>Littorina keenae</i> en el Pacifico mexicano. Alelos observados A y B para Isla de Guadalupe: LKGUCO (Campo Oeste) y LKGUPS (Punta Sur) y para isla de Cedros: LKCESA (San Agustín), LKCEPN (Punta Norte), LKCEPM (Punta Morro) y LKCEPP (Punta Prieta).....	49
Figura 18. Representación esquemática de la variación genotípica en 6 poblaciones de <i>Littorina keenae</i> en el Pacifico mexicano. Genotipos observados AA, AB y BB. Para Isla de Guadalupe: LKGUCO (Campo Oeste) y LKGUPS (Punta Sur) y para isla de Cedros: LKCESA (San Agustín), LKCEPN (Punta Norte), LKCEPM (Punta Morro) y LKCEPP (Punta Prieta).....	51
Figura 19. Relación entre divergencia genética (F_{ST}) y distancia geográfica entre las poblaciones de <i>Littorina keenae</i> en el Pacifico mexicano.....	68
Figura 20. Relación entre distancia genética (Nei, 1978) y distancia geográfica entre las poblaciones de <i>Littorina keenae</i> en el Pacifico mexicano.....	68
Figura 21. Patrón de circulación superficial de la Corriente de California	70

Lista de Tablas

	Pagina
Tabla I. Condiciones eléctricas y numero de loci resueltos por medio del análisis electroforético en geles de bis-acrilamida en proteínas de organismos provenientes de 2 localidades de Isla Guadalupe y 4 de Isla de Cedros.....	18
Tabla II. Valores de los dos Componentes Principales por carácter morfométrico.....	28
Tabla III. Valores de los dos Componentes Principales de cada una de las localidades con varianza y porcentaje de varianza de cada población de <i>L. keenae</i>	30
Tabla IV. Valores en promedio de los caracteres merísticos de las diferentes poblaciones de <i>L. keenae</i> . y <i>L. plena</i> . (valores expresados en mm).....	36
Tabla V. Valores de los Componentes Principales de razones morfométricas en relación a la altura y ancho de la concha en individuos de <i>L. keenae</i> y <i>L. plena</i>	40
Tabla VI. Frecuencias alélicas de 11 loci en 6 poblaciones de <i>Littorina keenae</i> en el Pacifico mexicano.....	47
Tabla VII. Variación genotípica de 11 loci en 6 poblaciones de <i>Littorina keenae</i> en el Pacifico mexicano.....	51
Tabla VIII. Comparación de la variabilidad genética entre diversas especies de <i>Littorina</i> en estudios realizados con anterioridad. (1)Bearmore y Morris 1979, (2)Ward y Janson 1985 y (3)Correa-Sandoval 1994.....	56
Tabla IX. Comparación de variación alélica por locus entre pares de poblaciones por Método de cadena de Markov.....	60
Tabla X. Comparación de variación genotípica por locus entre pares de poblaciones por Método de cadena de Markov.....	62
Tabla XI. Resumen de estadístico de F de Wright (F_{IS} , F_{IT} y F_{ST}) de seis poblaciones de <i>Littorina keenae</i> en Isla de Guadalupe e Isla de Cedros en el Pacifico mexicano.....	64
Tabla XII. Identidad genética y distancia genética sin sesgo de acuerdo a Nei (1978) entre organismos de seis localidades del Pacifico mexicano.....	66
Tabla XIII. Número de migrantes por generación y valores de F_{ST} por pares de localidades de organismos de <i>Littorina keenae</i>	66
Tabla XIV. Longitud de la concha de <i>Litorínidos</i> en la costa del Pacifico Americano.....	70

1.- Introducción.

Las islas del Océano Pacífico de la Península de Baja California son conocidas por su alta biodiversidad, endemismo de flora y fauna, además de bajos niveles de disturbio antropogénico (Ceballos et al. 1998; Donlan *et al.* 2000). Son sitios únicos para realizar estudios de diversidad biológica, de biogeografía y de evolución debido a su variación en tamaño, distancia al continente, topografía, clima y geología; características que tienen un efecto importante sobre la diversidad de especies y los grados de endemismo (Oberbauer, 2000).

Los estudios ecológicos han utilizado la variabilidad ambiental para explorar y revelar como la heterogeneidad de los factores bióticos y abióticos influyen en la distribución y abundancia de organismos intermareales, así como en la estructura y dinámica de las comunidades (Connell, 1972; Menge y Sutherland, 1976; Lubchenco, 1980; Underwood y Denley, 1984; Underwood, 2000; Menge y Branch, 2001; Ritter, 2005). Factores físicos como la temperatura, la altura de la marea, la exposición al oleaje, el tipo y la heterogeneidad del sustrato pueden afectar la abundancia y distribución de las especies que habitan en la zona del intermareal. Evaluar estos factores provee el respaldo para tratar de comprender cómo ocurren las interacciones biológicas y cómo la presencia o ausencia de una especie en particular en la comunidad, está en función de las condiciones ambientales apropiadas (Murray *et al.*, 2002; Almada y Faria 2004; Ritter 2008).

El área de distribución de una especie, está determinada por una serie de eventos históricos, donde están presentes las barreras biogeográficas (Alcock, 1979). Estas barreras, pueden ser muy conspicuas o poco evidentes y pueden influir en la dispersión de las especies. De acuerdo con lo anterior, el área que ocupa una especie, está determinada por el sitio donde probablemente se originó, así como por el tipo y la escala de las barreras que encontró al dispersarse. Debido a que las especies son originadas en tiempos diferentes y que las barreras aparecen y desaparecen, las combinaciones posibles para el principio teórico descrito, son numerosas (Slatkin, 1987). Por esta razón, es difícil determinar con exactitud los límites distribucionales de una especie o intentar explicar la razón por la que se distribuye en un área particular (Pielou, 1979). Esta dificultad radica, en identificar

los mecanismos mediante los cuales los factores ambientales (corrientes marinas, temperatura, etc.) y las interacciones bióticas (competencia, depredación, simbiosis, etc.), afectan los procesos de crecimiento y colonización de las poblaciones (Brown y Gibson, 1983; Myers y Giller, 1988; Myers y Giller, 1990).

La franja litoral rocosa en las islas, así como en el continente, es un ambiente de amplia complejidad física y biológica, resultado de la alta variación en las condiciones ambientales durante el ciclo diario de mareas, que se caracteriza por presentar una gran variedad de organismos, principalmente sésiles o de lento movimiento (Raffaelli y Hawkins, 1999; Murray, 2001). Los invertebrados son un componente sobresaliente de los hábitats intermareales rocosos, que se encuentran distribuidos en los tres niveles de marea y que abarcan una amplia gama de grupos funcionales por lo que son, en gran medida, responsables de la transferencia de energía dentro de la comunidad y entre biomas vecinos. Presentan una gran variedad morfológica así como en tamaño, resultado de las adaptaciones a las condiciones de nivel de marea (Nybakken, 2005).

La distribución, número y densidad de especies de estos organismos, al igual que de toda la comunidad, están influenciados tanto por factores físicos como biológicos. Entre los factores físicos más importantes se encuentran la exposición al oleaje, la temperatura, la orientación y la pendiente de la costa, la estructura del hábitat, la sedimentación y la salinidad. La comunidad del intermareal rocoso de las islas, así como todas comunidades marinas de agua somera, se caracterizan por presentar un número menor de especies, con respecto al continente, lo cual es debido a las bajas tasas de inmigración y especiación y a la alta tasa de extinción, que dependen del tamaño de la isla, la productividad del sistema y de la distancia entre la isla y las regiones potenciales de recurso de inmigrantes (Vermeij, 2004).

Los ecosistemas intermareales han demostrado menor diversidad relativa en grupos mayores (familias de mayores niveles taxonómicos) comparado con otros sistemas marinos o terrestres, probablemente debido a la dificultad que involucran

las adaptaciones evolutivas necesarias para sobrevivir en el intermareal. (Raffaelli y Hawkins 1996). Esta variación o zonación vertical también actúa como un factor ecológico que afecta en la interacción y adaptación en cada nivel del litoral (Sanford y Kelly 2011). En el caso del intermareal rocoso, los niveles más elevados usualmente presentan menor riqueza de especies debido a que las especies marinas alcanzan sus límites fisiológicos por debajo de estos ambientes más parecidos a los terrestres (Harley y Helmuth 2003).

Bajo este contexto, la mayoría de los estudios básicos de los recursos marinos que se han propuesto a nivel nacional y regional, aún continúan siendo postergados y relegados en nuestro país otorgándoles mayor relevancia a aquellos estudios en los cuales se contemple abordar las demandas y problemas específicos los cuales son “prioritarios” para un sector de la sociedad muy reducido, pero con gran poder económico. Para resolver un problema a menudo se ofrecen soluciones o alternativas que al poco tiempo resultan ser contraproducentes. La raíz de esto es la ausencia prácticamente total de conocimientos básicos de los elementos que participan, de la forma en que se distribuyen los organismos en el tiempo y espacio y de los factores que influyen con mayor o menor grado en el medio.

De acuerdo con lo anterior, el estudio de los organismos marinos ha contribuido considerablemente a la comprensión de muchos problemas biológicos generales (Correa, F. 2014), es por ello que la oceanografía biológica considera a los fenómenos biológicos como partes integrales de todos los procesos que se llevan a cabo en el mar. Estos procesos incluyen la forma en que los organismos vivos están regulados por factores de tipo abiótico y los de tipo biótico. La interacción de estos componentes y la forma en que los organismos se desempeñan en su entorno son los que determinan la estructura y la dinámica de las poblaciones y comunidades a una escala ecológica (Correa, F. 2014).

En una escala regional o geográfica, los principales mecanismos que definen la distribución latitudinal de los organismos marinos bentónicos, son los patrones de circulación oceánica y los gradientes de temperatura (Briggs 1974, Glynn y Wellington 1983, Gaylord y Gaines 2000). Aunque también, eventos oceanográficos de macroescala (e.g. El Niño Oscilación del Sur) pueden expandir o disminuir los límites de distribución de las especies (Hubbs 1960, Blanchette *et al.* 2008).

2.- Antecedentes.

2.1 Características generales de *L. keenae* Rosewater, 1978

El género *Littorina* comprende 18 especies de las cuales 6 son nativas del Atlántico Norte y 12 del Océano Pacífico (Reid *et al.* 2012) y representa probablemente el género de gasterópodos más estudiado. El género *Littorina* habita típicamente el intermareal rocoso y es generalmente el organismo más abundante de este tipo de hábitat representando más del 85% de la biomasa en estas áreas (Adey y Hayek 2005)

L. keenae, anteriormente conocida como *L. planaxis*, presenta tamaños de 1 cm a 7 cm. Es una especie común en la zona superior del intermareal rocoso en las costas del Pacífico Nororiental. Se caracteriza por presentar un área aplanada y erosionada sobre el giro del cuerpo justo al lado de la columna (Abbott, 1974).

Se alimentan de microalgas epílicas y esporofitos de algas marinas y también se ha visto alimentándose de algas muertas (Norton *et al.*, 1990). A pesar de ser versátil el género son pastoreadores altamente selectivos, prefiriendo unas especies de algas sobre otras. El proceso digestivo en litorínidos es bajo ya que se ha encontrado restos de algas en sus heces; en *L. keenae* se ha reportado una eficiencia de asimilación de 36% del material ingerido en peso seco (Norton *et al.*, 1990). Estos gasterópodos presentan ritmos de actividad conductual (forrajeo) debido al flujo y reflujo de las mareas. Otros factores que regulan estos ritmos son

la temperatura, la humedad, la salinidad, la estación en la que se encuentre y la exposición al aire. La remoción de estos moluscos en algunas regiones ha provocado un incremento notable en las comunidades algales así como cambios en su composición. Se plantea que son los pastoreadores más importantes en las costas del noroeste de Estados Unidos (Norton *et al.*, 1990).

La copulación en *L. keenae* ocurre en los meses de marzo a Julio, se ha observado una fuerte periodicidad semilunar en la conducta copulatoria con las actividades máximas en luna llena y nueva (Jiang *et al.* 2013). El desove también presenta una alta periodicidad lunar con la mayoría de las hembras desovando en luna nueva y llena durante verano y primavera. El desove ocurre mediante la liberación de una masa de gel con huevos embebidos en capsulas gelatinosas de 5-15 mm. donde cada masa de gel contiene varios cientos de huevos y una sola hembra puede liberar varias cápsulas durante un solo evento de desove. Las masas de huevos son liberadas del sustrato al mar por las mareas y la acción de las olas (Schmidt, 1979).

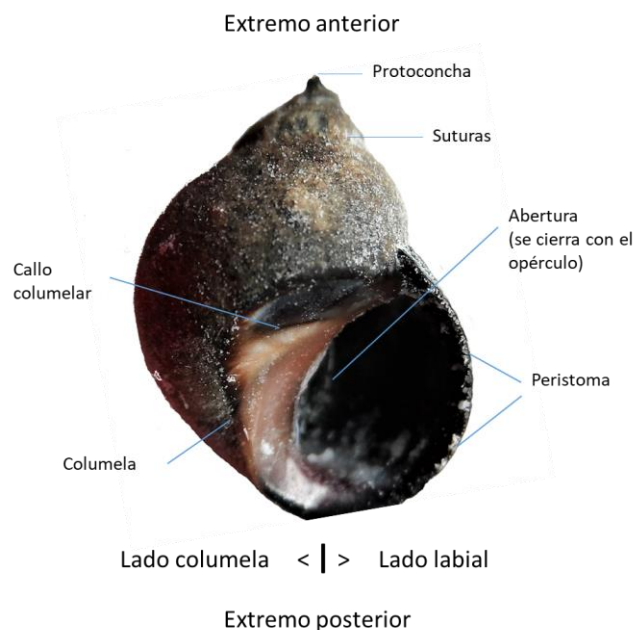


Figura 1. Estructura general de *Littorina keenae*.

Los huevos eclosionan a los 2-9 días en una larva velíger similar a la de la mayoría de los moluscos. Esta larva se mantiene en la columna de agua de 28-61 días hasta que ocurre su metamorfosis en pequeños caracoles. Este desarrollo de tipo planctónico les permite un alto flujo de genes lo que conlleva a una menor diferenciación genética y, por ende, menor estructuración entre las poblaciones de *L. keenae*. Lo anterior es debido principalmente a la eliminación de la diferenciación por deriva genética y al retraso de la evolución de genotipos especializados en cada microambiente (Schmidt 1979).

Otra característica de estos organismos es la edad y tamaño de madurez; Reid (1996) encontró que los adultos de poblaciones australes viven de 1 a 3 años en el caso de *L. obtusata*, *L. fabalis* y *L. saxatilis*; mientras que, en las poblaciones más al norte del hemisferio puede ser hasta de más de 8 años.

2.2 Estrés térmico en *Littorina*

En el intermareal rocoso se ha registrado temperaturas corporales en litorinidos de 10-14°C hasta 40°C, lo cual puede conllevar a consecuencias fisiológicas adversas. Se ha reportado que estos organismos pasan de 2,300-11,000 minutos por año a una altura de 2 m. sobre el nivel del mar con temperaturas por encima de los 30 grados Celsius por lo que se puede decir que se encuentran sometidos en ocasiones a altos niveles de estrés térmico (Miller, 2008; Miller y Denny, 2011). El estrés térmico puede variar con la altura de las costas debido al ciclo de las mareas y el efecto de la acción de las olas. Aquellos litorinidos que habitan en la zona alta del intermareal como *L. keenae* muestran diferentes patrones de tolerancia a la temperatura y a la desecación que aquellos que habitan en la zona baja (Vermeij, 2004.). Caracoles más pequeños presentan espirales más altas lo que puede reducir el estrés térmico, así como un menor tamaño del pie lo que disminuye el flujo de calor del sustrato (McMahon, 1990).

Para disminuir la temperatura corporal y evitar la desecación, los littorinidos presentan dos conductas importantes. La primera consiste en la remoción del pie del sustrato hacia dentro de la concha y el cierre hermético a través de un opérculo (a temperaturas mayores de 35 grados y/o más de 3 horas sin agua) (Miller 2008). Para mantener su posición en la costa segregan un mucus que se seca rápido y permite al organismo fijarse firmemente. El efecto de quitar el pie del sustrato puede disminuir la temperatura corporal de 1 a 2 grados Celsius. La segunda conducta consiste en levantar la concha para esperar la marea alta lo que provoca una disminución de la temperatura corporal. Este comportamiento les permite que el cuerpo alcance temperaturas de 50 grados (pueden durar hasta 8 horas de exposición al sol) mientras que el sustrato alcanza temperaturas máximas de 65. Las conchas con 55 grados empiezan a morir después de los 30 minutos (Miller, 2008.).

Miller y Denny, 2011.) Implementaron un modelo biofísico para predecir las temperaturas corporales de littorinidos durante exposiciones extremas de temperatura. Obtuvieron que las conductas para disminuir la temperatura corporal que presentan estos organismos son más importantes que el color y la forma de la concha en la zona estudiada (Pacífico Noreste).

La temperatura también puede impactar la tasa metabólica teniendo efectos de cascada sobre el crecimiento y la reproducción. Esto ocurre debido a que, al incrementar la temperatura, las moléculas químicas alcanzan la energía de activación necesaria más rápido para llevar a cabo una reacción química, lo que se traduce en un mayor procesamiento de los sustratos e incrementándose así la respiración. En *Littorina* se ha observado que las tasas de respiración fluctúan en conjunto con las variaciones en temperatura; éstas difieren dentro y entre especies, época del año, localidad y tamaño (Hochachka y Somero, 2002). En estudios donde se analiza el efecto de la temperatura en el metabolismo de *Littorina* se obtuvo una disminución general en la tasa metabólica y que depende de la latitud en que se mida obteniéndose en zonas templadas una menor disminución que en las zonas subárticas (Sokolova y Portner, 2003).

2.3 Uso de alozimas en litorínidos

La estimación de la variación genética, a partir de información de las proteínas como marcador molecular, se basa en el análisis de la heterogeneidad de los productos de los genes estructurales de las poblaciones. El polimorfismo que presentan las proteínas presumiblemente es el resultado del balance entre los procesos de mutación, migración, deriva génica y selección natural, cuando operan sobre poblaciones que se encuentran en ambientes temporal o espacialmente variables. La variabilidad latitudinal en los caracteres fenotípicos de la especie, no siempre presenta un valor adaptativo en las poblaciones y ésta se percibe como la respuesta a un factor ambiental, pero sin influir en la supervivencia de los individuos. Cuando esta variación da lugar a adaptaciones, se considera como respuesta a los ambientes locales presentes a lo largo de una clina (Rolan-Alvarez, *et al* 1977). En este sentido, la variabilidad genética es probable que sea el producto de la reacción de las poblaciones, ante los cambios ambientales y puede conducirles eventualmente hacia la adaptación. Cuando una población u organismo se adapta, su eficacia biológica se encuentra determinada por la interacción sinérgica entre los fenotipos que la integran y el medio que los rodea (Rolan-Alvarez *et al* 1975).

La variabilidad genética de una población, es descrita al detectar y enumerar las variables alélicas a partir de una muestra al azar del genoma, donde los genes son asignados a clases discretas y distinguibles del fenotipo (Hewitt, 2004). Esta variabilidad puede ser examinada a través de diversas fuentes, entre ellas las proteínas. El término alozima se emplea para designar a las diferentes formas de una enzima codificadas por alelos diferentes del mismo locus génico (Zouros, 1975; de la Rosa-Velez, 1986). Caracterizar la estructura genética de varias poblaciones de una especie, en el ámbito geográfico de su distribución, permite establecer su nivel de variabilidad genética e inferir aspectos biológicos y evolutivos básicos de la misma (Ayala 1983).

Se ha encontrado que la actividad enzimática de las enzimas aspartato-aminotransferasa (AsAT) y alaninaaminotransferasa (AIAT) mostraron una resistencia al estrés térmico mayor en la zona alta del intermareal que en la zona baja. Asimismo, Sokolova y Portner (2003) encontraron actividades enzimáticas más altas en las zonas inferiores en comparación a la zona superior. Panova y Johannesson (2004) encontraron la mayor actividad enzimática en homocigotos para Aat de zona baja, seguido de los heterocigotos y, por último, los homocigotos de la zona alta. El locus Aat también se ha encontrado relacionado con la exposición al oleaje por lo que se sugiere que Aat pudiera tener en moluscos, un rol central en la producción de energía aeróbica durante períodos de mareas bajas (Wilson y Gosling, 1998; Rolán-Álvarez, 2015). En *L. obtusata* se ha encontrado patrones geográficos en los loci aspartato quinasa (Ark) y la manosa fosfato isomerasa (Mpi), así como un microsatélite, lo cual indica que existen genotipos particulares ligados a la supervivencia. En *L. fabalis* se encontró algo similar con Ark con una clina al tamaño y a la exposición a las olas. Plantean que Ark está directamente relacionada con el suministro de energía al pie para la resistencia al oleaje y Mpi puede estar relacionado al balance de energía durante períodos de estrés debido a que su ruta podría desviarse hacia la producción de ATP (Johannesson y Mikhailova, 2004; Schmidt *et al.*, 2007).

Un polimorfismo clinal fuerte se ha encontrado para Ark con diferentes grados de exposición al oleaje y se correlacionó significativamente con la tasa de crecimiento, color de la concha y conducta de migración (Tatarenkov y Johannesson, 1994). Johannesson y Tatarenkov (1997) analizaron el efecto de la distancia geográfica y la selección natural (microhábitat) en 5 islas utilizando 8 loci polimórficos 42 poblaciones con 15 km entre cada una; en su estudio encontraron que Aat y la fosfoglucomutasa (Pgm-2) respondían fuertemente a la selección mientras que Mpi y la peptidasa (Pep) respondían a la variación geográfica, los demás a la interacción de ambos factores. Johannesson *et al.* (2004) realizaron un estudio similar con 9 loci de ADN mitocondrial obteniendo resultados similares: con 3 respondiendo a microhábitat y 3 a la distancia geográfica.

2.4 Características del área de estudio.

2.4.1 Isla de Guadalupe.

Es una isla oceánica de origen volcánico de terreno extremadamente pedregoso, formada por la erupción de lava surgida de las profundidades del piso oceánico hace aproximadamente siete millones de años, por lo que nunca ha estado conectada al continente (Moran, 1999). Dos calderas colapsadas forman la isla: una en el sur que constituye el Monte Picacho, y otra en el norte que constituye el Monte Augusta.

La disponibilidad de agua es limitada, sobre todo en las zonas más elevadas en el extremo norte que, en el Monte Augusta, alcanzan 1298 metros sobre el nivel del mar. Su longitud en sentido norte-sur es de 35 kilómetros con un ancho máximo de 12 kilómetros, comprendiendo una superficie total de 250 Km² (Moran, 1999).

La Isla Guadalupe es la más extensa posesión insular oceánica de México. Se ubica en el océano Pacífico a 260 kilómetros al oeste de la península de Baja California, entre los 28°50' y 29°12' latitud norte y los 118°13' y 118°22' de longitud oeste, y se encuentra separada del continente por profundidades oceánicas de más de 3600 metros (Moran 1996).

Su clima es árido a semi cálido con invierno fresco, temperatura media anual de $15.9 \pm 1.77^{\circ}\text{C}$ al nivel del mar y de $12 \pm 6^{\circ}\text{C}$ en las partes medias y altas, y régimen de lluvias de invierno. Presenta una insolación de 30 a 40% y una humedad relativa promedio de 65% con oscilaciones de 8% distribuyéndose en forma discontinua debido a la geomorfología y tamaño de la isla. Los vientos dominantes del noroeste tienen gran influencia sobre el suelo y la vegetación (Moran 1996).

De acuerdo con la clasificación de Köppen modificada por E. García, para alturas de 800 a 1000 metros sobre el nivel del mar se presenta clima templado moderado y medio lluvioso, precipitación media de 148 mm y máxima de 693 mm, con temperatura en el mes más frío entre 3 y 18°C, extremoso con verano seco y

caluroso con temperatura del mes más cálido de 22°C. Corresponde a la clasificación de climas BWks y BWhs (Moran 1999).

El clima varía mucho de una parte a otra de la isla. El extremo sur, con una exposición meridional, es comparativamente más caliente y seco que el extremo norte, por lo que las plantas son desérticas. Sin embargo, la niebla es frecuente y la precipitación es de 125 mm al año, por lo que se pueden observar algunos líquenes sobre las rocas.

La parte norte de la isla recibe una precipitación pluvial considerable durante el invierno, aunque no cuenta con registros climáticos. La vertiente noroccidental, con más lluvia y menos luz solar directa debido a la acumulación de nubes traídas por los vientos dominantes del noroeste, es más húmeda que el sur y el oriente de la isla, y su vegetación incluye pinos, encinos y palmas. Cuando las nubes se acumulan sobre la región norte y se desplazan sobre la cordillera del noroeste, se disipan al llegar al sur más seco y caliente, por ello, los pinos crecen sobre la ladera noroeste, llegando hasta la cima de la cordillera, pero no más allá (Moran 1999).

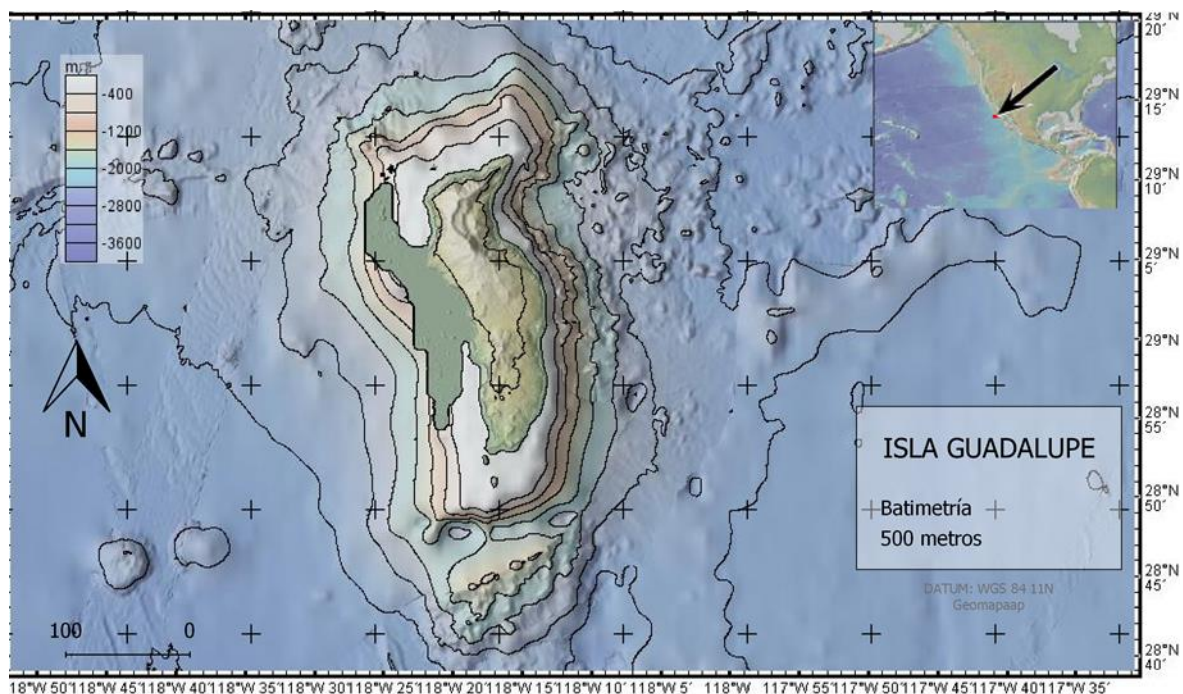


Figura 2. Batimetría de Isla de Guadalupe en el Pacífico mexicano.

2.4.2 Isla de Cedros

Isla de Cedros se encuentra localizada en el océano Pacífico, a 24 Km de Punta Eugenia, al noroeste de la costa del estado mexicano de Baja California Sur y 425 Km al sur de Ensenada, B.C. Cuenta con una superficie de 347 Km². Gran parte de la costa de Isla de Cedros, B.C., se caracteriza por tener playas rocosas y presencia de bosque de macroalgas en las inmediaciones de la costa, como lo observado en Punta San Agustín, lo cual representa un peligro para la navegación de embarcaciones menores. (SEMAR, 2015).

Se ubica frente Poblado de Cedros, B.C., y colinda al Norte, Sur y Este con la Bahía Vizcaíno (SEMAR, 2015).

El clima de la región es semicálido muy árido, con período de lluvias en invierno, máximos en enero y febrero. La precipitación media anual es menor a 100 mm y la mayor parte de la lluvia se presenta durante el invierno. La isla es a menudo envuelta en la niebla, lo cual les permite a algunas plantas captar la humedad (SEMAR, 2015).

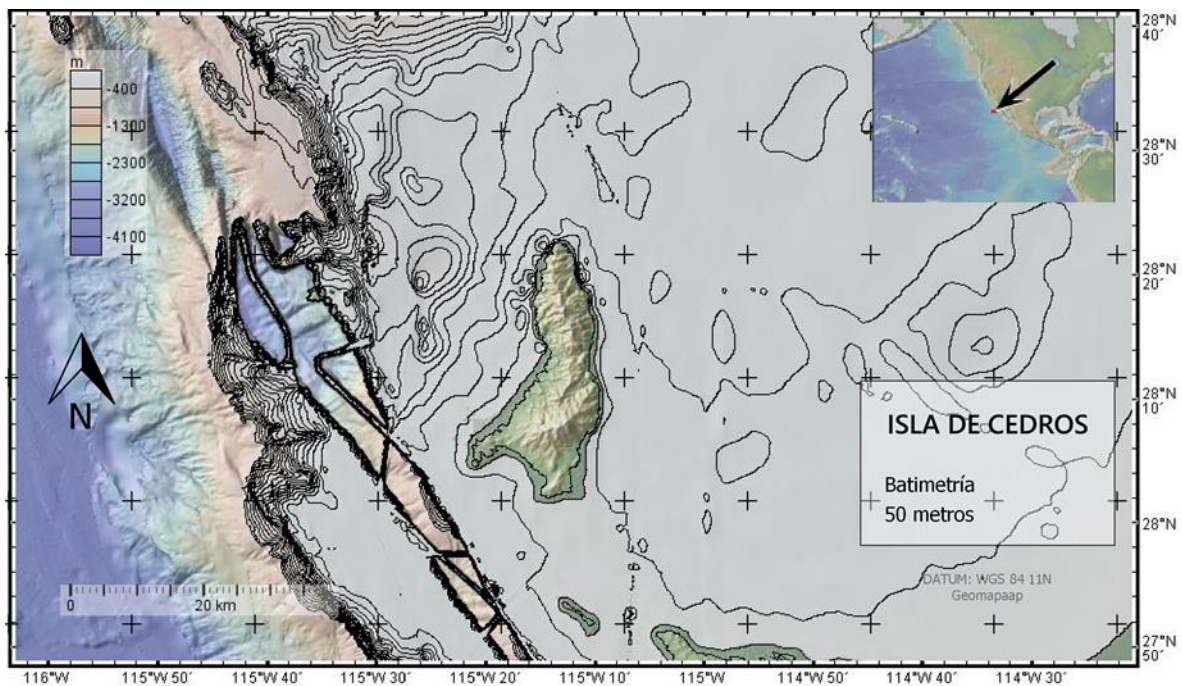


Figura 3. Batimetría de Isla de Cedros en el Pacífico mexicano.

3.- Objetivos.

Objetivo general:

- Caracterizar morfológica y genéticamente a los organismos de *L. keenae* proveniente de la isla de Cedros e Isla de Guadalupe.

Objetivos particulares.

- ✓ Analizar el grado de similitud morfológica de los organismos de *L. keenae* entre las islas estudiadas y la costa de Baja California.
- ✓ Determinar y comparar genéticamente a los organismos de *L. keenae* a partir del análisis alozímico de 11 loci codificados por 3 sistemas enzimáticos.

4.- Material y Método.

Se recolectaron manualmente a los organismos de *L. keenae* en la zona media-alta del intermareal rocoso, en cuatro localidades de la Isla de Cedros: San Agustín (LKCESA), Punta Norte (LKCEPN), Punta Morro (LKCEPM) y Punta Prieta (LKCEPP) en el mes de noviembre del 2011 y de dos localidades situadas en Isla de Guadalupe: Campo Oeste de la Isla (LKGUCO) y Punta Sur (LKGUPS) durante el mes de febrero del 2017. También se recolectaron organismos de *L. plena* de la costa rocosa en Punta Morro frente al Instituto de Investigaciones Oceanológicas. Posteriormente se colocaron en una solución saturada de sal en una bolsa ziplock para luego depositarlos en un contenedor con una mezcla de hielo, Cloruro de Sodio (NaCl) y alcohol etílico para mantener la temperatura por debajo de los -15 °C hasta su transporte y disección en el laboratorio de Genética de Poblaciones y Biología Molecular del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO), de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC).

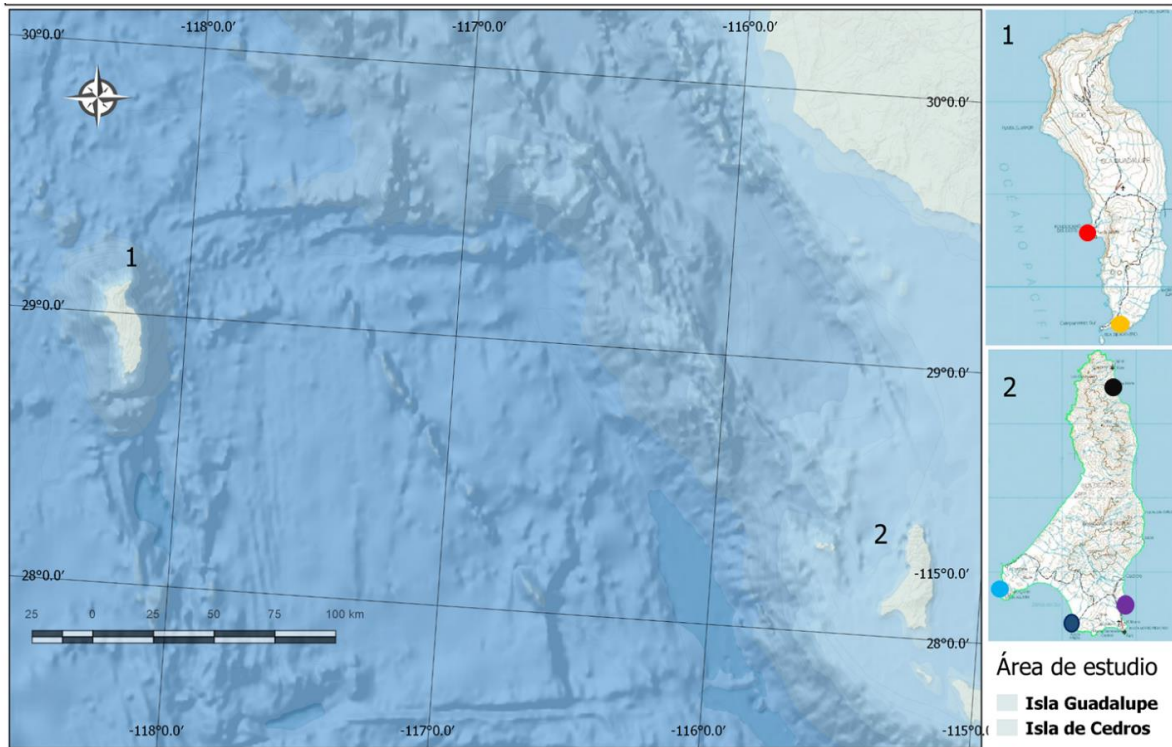


Figura 4. Ubicación geográfica del área de estudio. Los puntos indican las localidades donde se capturaron organismos de *L. keenae*: Isla Guadalupe Campo Oeste (rojo), Isla Guadalupe Punta Sur (amarillo), en Isla de Cedros: Punta Norte (negro), Punta Morro (morado), Punta Prieta (azul oscuro) y San Agustín (azul claro).

4.1 Análisis morfométrico.

El análisis morfométrico se llevó a cabo mediante la medición de la concha de organismos de *L. keenae* y *L. plena* con un vernier metálico modelo Ultra-Cal Mark III y marca Sylvac. Se obtuvieron las distancias entre varios puntos de la concha: largo de la concha (A-B), ancho de la concha (C-D), altura de la apertura (A-E) y ancho de la apertura (F-D) en milímetros en figura 5.

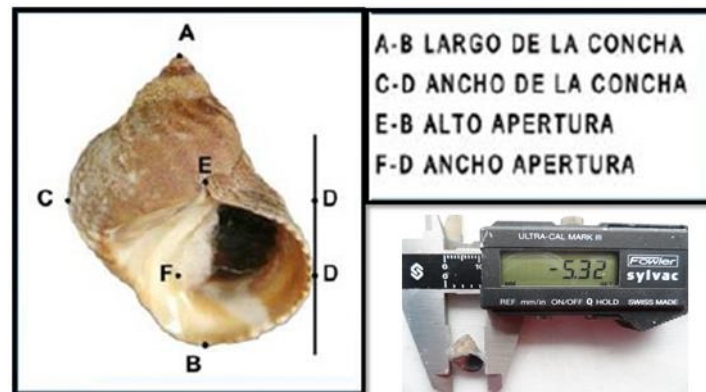


Figura 5. Parámetros fenéticos en mm. de organismos de *Littorina keenae*.

Una vez registrados obtenidos los datos morfométricos por población de cada localidad y de cada isla, éstos fueron organizados en matrices en la cual se ubicaron los caracteres morfométricos en los renglones y los individuos en las columnas. Con el objetivo de establecer las relaciones morfométricas entre las poblaciones de *L. keenae* en ambas islas y la población de *L. plena*, referente, se empleó el Análisis de Componentes Principales (ACP). Para realizar el ACP, se utilizó la muestra heterogénea de los datos cuantitativos estandarizados (ecuación 1), donde Z es la anomalía estandarizada, X es el valor observado de la variable, \bar{X} y SD son el promedio y la desviación estándar respectivamente. Esta transformación indica el número de desviaciones estándar en las que ocurren las variaciones con respecto al promedio. Si es negativo, indica que el valor de la variable está por debajo del promedio, contrario a los valores positivos que indican que el valor medido está por arriba del promedio.

$$Z = \frac{(x-\bar{x})}{SD} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Esta muestra, se constituyó de la matriz que integró a los valores de cuatro caracteres del total de individuos de las cuatro poblaciones examinadas de isla de Cedros, dos poblaciones para Isla de Guadalupe y una población de *L. plena* en Punta Morro. La función del ACP fue separar dichas poblaciones en grupos relativamente homogéneos y distintos unos de otros (Santamaría-del Ángel, *et al* 2015).

Esta separación, es originada por los componentes que genera el ACP, los cuales son la mejor combinación lineal de los caracteres originales y reducen el grupo de datos multivariados, a unas pocas variables, pero sin pérdida de la información contenida en los datos originales (James y McCulloch, 1990; Santamaría-del Ángel, 1994).

4.1.1 Análisis de Componentes Principales.

La aproximación matemática del ACP implica realizar el cálculo de los componentes, expresados como una ecuación polinomial de primer orden. El cálculo inicia a partir de una matriz rectangular que integra a j variables (caracteres morfométricos) con ni observaciones (individuos). Esta matriz permite calcular la matriz de correlación, que es cuadrática y simétrica, a partir de la cual, se calculan los valores propios (eigen valor) y los vectores propios (eigen vectores) (Santamaría-del Ángel, *et al* 2015).

Mediante los eigen valores, se identificó el número de componentes que fueron estadísticamente significativos en la aproximación matemática del ACP, o cuyo valor propio fue ≥ 1.0 . Los coeficientes de la ecuación polinomial, con la que son expresados los componentes, son los vectores propios. Así, los componentes principales I y II, pueden describirse por la ecuación 2.

$$\begin{aligned} \text{CP I} &= b_{1a}A + b_{1b}B + b_{1c}C + b_{1d}D + \dots + b_{1j}j \\ \text{CP II} &= b_{2a}A + b_{2b}B + b_{2c}C + b_{2d}D + \dots + b_{2j}j \end{aligned} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Se graficaron los valores del ACP I y II con la finalidad de obtener grupos de poblaciones con características similares entre ellas, pero diferentes entre otras, es por ello que se agregaron datos de poblaciones de *L. plena* ya que por ser una especie diferente sirvió como control de la sensibilidad del método, así como proporcionar los argumentos que permitan diferenciar las especies sin ser propiamente rasgos fenéticos con carácter taxonómico.

4.1.2 Creación de Funciones Empíricas Ortogonales.

Con objeto de caracterizar la riqueza morfométrica de las poblaciones de *L. keenae* y *L. plena*, se construyeron sus Funciones Empíricas Ortogonales (FEO). Las FEO, se calcularon mediante el Análisis de Componentes Principales (ACP) y su función fue recrear los prototipos morfométricos de las poblaciones, así como, permitir que se efectuaran comparaciones entre las poblaciones.

Debido a que el componente 1 del ACP de cada población es la mejor combinación lineal de los 4 caracteres morfométricos analizados (ya que expresa la mayor proporción de la varianza del modelo y se caracteriza por ser ortogonal con respecto al resto de componentes significativos generados), se le seleccionó como la SFEO o “prototipo” de cada población. Posteriormente, se construyó un dendrograma para agrupar los prototipos de los organismos de cada sitio, de acuerdo a las características que presentaron (Santamaría-del Ángel *et al* 2015), como respuesta a la interacción con el medio ambiente.

4.2 Análisis genético.

4.2.1 Extracción de proteínas solubles.

Los organismos de *Littorina keenae* fueron descongelados gradualmente pero siempre se mantuvieron en un medio frío. El primer paso para romper el tejido y liberar las enzimas fue triturar de manera manual con una varilla de vidrio la

totalidad de la concha con los organismos y posteriormente se utilizó un homogenizador de tejidos "Tissue Terator" de velocidad variable, empleando una solución amortiguadora compuesta de Tris-HCl 0.1 M pH 7.8, con fenil-metil-sulfonilcloruro (6 mg/100 ml), para inhibir a las proteasas; la relación tejido-buffer fue de 1:1 y el proceso se realizó en un recipiente con hielo con el fin de disminuir el aumento de temperatura generado por la fricción en el medio, buscando evitar la desnaturalización de las proteínas por el calor generado en el proceso. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 10,000 rpm (10,000 g) a 2 °C por 20 minutos.

Una vez centrifugadas, se extrajeron los sobrenadantes con las proteínas concentradas los cuales se subdividieron en 3 muestras de 100µl cada uno y se depositaron en tubos Eppendorf de 200µl y se almacenaron a -80 °C en un ultracongelador REVCOR hasta su análisis electroforético.

4.2.2 Análisis electroforéticos.

En el proceso de estandarización de la técnica se obtuvieron 5 sistemas enzimáticos para las muestras de Isla de Guadalupe (Mdh, Me, Idh, Pgm y Pgi) y 6 sistemas enzimáticos para las muestras de Isla de Cedros (Mdh, Idh, Pep, Hk, Pgm y Pgi) que resolvieron satisfactoriamente en los geles de bis-acrilamida. Debido al desfase de tiempo durante el análisis, la disponibilidad de reactivos y la cantidad de datos obtenidos, solo tres de los sistemas con 9 loci coinciden en ambas islas, por lo tanto, sólo esos sistemas fueron considerados en el análisis con la finalidad de poder hacer una comparación más fiel entre las poblaciones (tabla I). A continuación, se describe el procedimiento de preparación de los geles para la electroforesis, así como los sistemas enzimáticos ensayados.

Tabla I. Condiciones eléctricas y numero de loci resueltos por medio del análisis electroforético en geles de bis-acrilamida en proteínas de organismos provenientes de 2 localidades de Isla Guadalupe y 4 de Isla de Cedros. (Loci resueltos para ambas islas y utilizados en este estudio “*”, loci que resolvieron únicamente para Isla de Cedros “†” y loci que resolvieron únicamente para Isla de Guadalupe “^”).

Sistema enzimático	No. E.C.	Est. Cuaternaria	# de Loci Expresados	C. Electroforéticas (x celda)			
				(v)	(mA)	(W)	tiempo
Oxido-reductasas							
Malato deshidrogenasa	1.1.1.37	Dimérica	Mdh 1*, Mdh 2*, Mdh 3*, Mdh 4*, Mdh 5*, Mdh 6*, Mdh 7*, Mdh 8*, Mdh 9*, Mdh 10 [^] , Mdh 11 [^] .	120	400	15	3.5 hrs.
Enzima Málica [^]	1.1.1.40	Tetramérica	Me 1.	120	400	15	3 hrs.
Isocitrato deshidrogenasa [^]	1.1.1.42	Dimérica	ldh 1, ldh 2, ldh 3, ldh 4, ldh 5.	120	10	15	4.5 hrs.
Transferasas							
Hexoquinasa [†]	2.7.1.1	Monomérica	HK 1.	120	400	12	3 hrs.
Fosfo-glucomutasa	2.7.5.1	Monomérica	Pgm 1 [^] . Pgm 2*.	120	400	15	2 hrs.
Hidrolasas							
Peptidasa [†]	3.4.11	Dimérica	Pep 1	120	400	15	3 hrs.
Isomerasas							
Fosfoglucosa - isomerasa	5.3.1.9	Dimérica	Pgi 1*, Pgi 2 [^] , Pgi 3 [^] .	120	400	15	2 hrs.

4.2.3 Electroforesis en Geles de BIS-poliacrilamida

Se emplearon geles discontinuos de bis-acrilamida, constituidos por 80% de gel separador y 20% de gel concentrador aproximadamente. El gel concentrador midió 2 cm de largo por 10 cm de ancho y 1 mm de espesor y el gel separador midió 8 cm de largo por 10 cm de ancho y 1 mm de espesor (anexo 1). Cada gel estuvo constituido por 10 pozos en los que se colocaron individualmente 10 μ l de muestra de sobrenadante de cada individuo de *Littorina keenae* de cada localidad. El sobrenadante estaba constituido por 8 μ l de extracto de centrifugado y 2 μ l de buffer de carga (azul de bromofenol 1%, glicerol y 0.5 M Tris-HCL).

Las muestras de los organismos de cada una de las poblaciones fueron intercaladas para evitar sesgos de lectura en los zimogramas, esto debido a las diferencias en el desplazamiento de las proteínas originadas por la fricción o efecto de capilaridad que se podría generar en las orillas de los geles (anexo 2). El colorante de azul de bromofenol fue empleado como indicador de la migración de las enzimas.

Los geles fueron colocados en cámaras para electroforesis con el buffer para corrimiento 1X y puesto en refrigeración a 4 °C. La electroforesis se llevó a cabo con una fuente de poder programable modelo 3000p VWR Scientific, las condiciones eléctricas y duración de los análisis electroforéticos estuvieron en función de cada sistema enzimático (tabla I).

4.2.4 Tinción e Interpretación de los zimogramas.

Las soluciones de los sustratos específicos se prepararon de acuerdo con los protocolos estándar establecidos (Harris y Hopkinson, 1976) (anexo 3). Cada gel se colocó en 45 ml de solución sustrato y fue incubada a 37 °C en obscuridad hasta observarse las bandas esperadas. Después de que aparecieron los electrómorfos (bandas formadas por la actividad enzimática) fueron digitalizados con una cámara fotográfica con una resolución de 1920 x 2560; los geles fueron

posteriormente fijados en una solución de metanol, ácido acético y agua destilada (3:1:6). Los sistemas enzimáticos que se ensayaron fueron elegidos al azar con respecto a su función metabólica, siendo la única restricción contar con los reactivos específicos y de la calidad en la resolución de los zimogramas. La variación entre los genotipos de un mismo locus, se registró al considerar homocigotos: a aquellos individuos que presentan una sola banda; y heterocigotos: a aquellos individuos que, dependiendo de la estructura cuaternaria de la enzima, presentan varias bandas: dos bandas (monoméricas), o tres bandas (diméricas), y así sucesivamente (fig. 6).

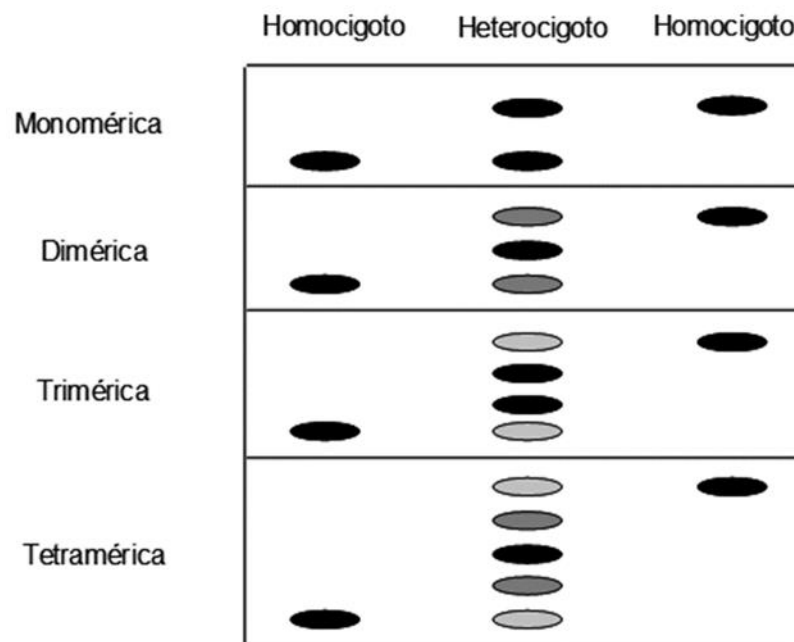


Figura 6. Ejemplo de las variaciones alozimicas en las proteínas según su estructura cuaternaria.

Una vez que se fijaron los geles, se llevó el registro gráfico de las bandas para la determinación del genotipo de los individuos. Las bandas de las alozimas se revelan de acuerdo al sustrato específico en el cual se incuban. Estas bandas pueden ser de color azul o marrón y la nitidez de éstas es controlada por las condiciones eléctricas y el peso molecular (Cossu *et al.*, 2015; Cretella *et al.*, 1994; Fenberg *et al.*, 2010; Hilbish, Carson *et al.*, 2002). El registro se realizó mediante una revisión visual de los geles sobre una lámpara de luz blanca así

como también proyectando la imagen del zimograma sobre un pizarrón como se muestra en la figura 7; se anotó la cantidad y posición de los electromorfos presentes sobre formatos preestablecidos (anexo 4).

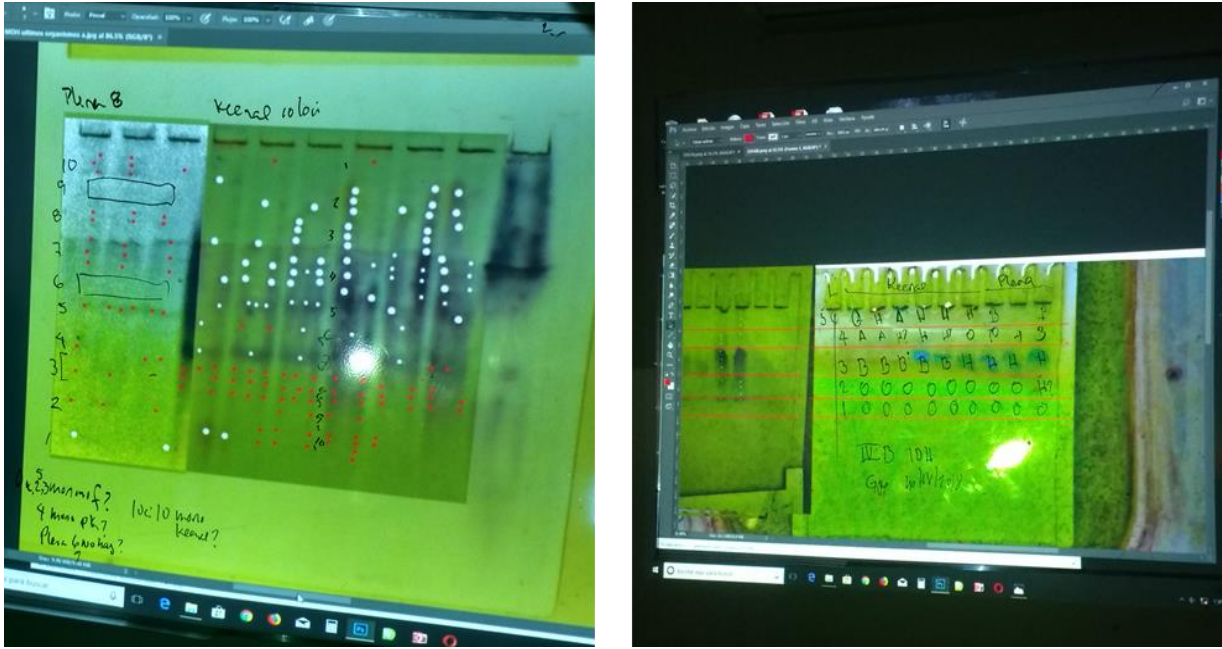


Figura 7. Revisión, análisis e interpretación individual de gels de los sistemas enzimáticos Mdh (izquierda) e Idh (derecha).

Los sistemas enzimáticos con actividad en más de un locus (proteínas con actividades similares codificadas por distintos genes) se designaron enumerándolos en orden ascendente (por ejemplo, Mdh-1, Mdh-2, etc...). Para distinguir las alozimas de un mismo locus se designó como A al alelo con mayor movilidad catódica, B al segundo más móvil y así sucesivamente.

Se consideraron homocigotos a los individuos cuyo electromorfo consistió en una sola banda y heterocigotos a aquellos que, dependiendo de la estructura cuaternaria de la proteína, presentaron dos bandas para las monoméricas o tres para las diméricas (fig. 6).

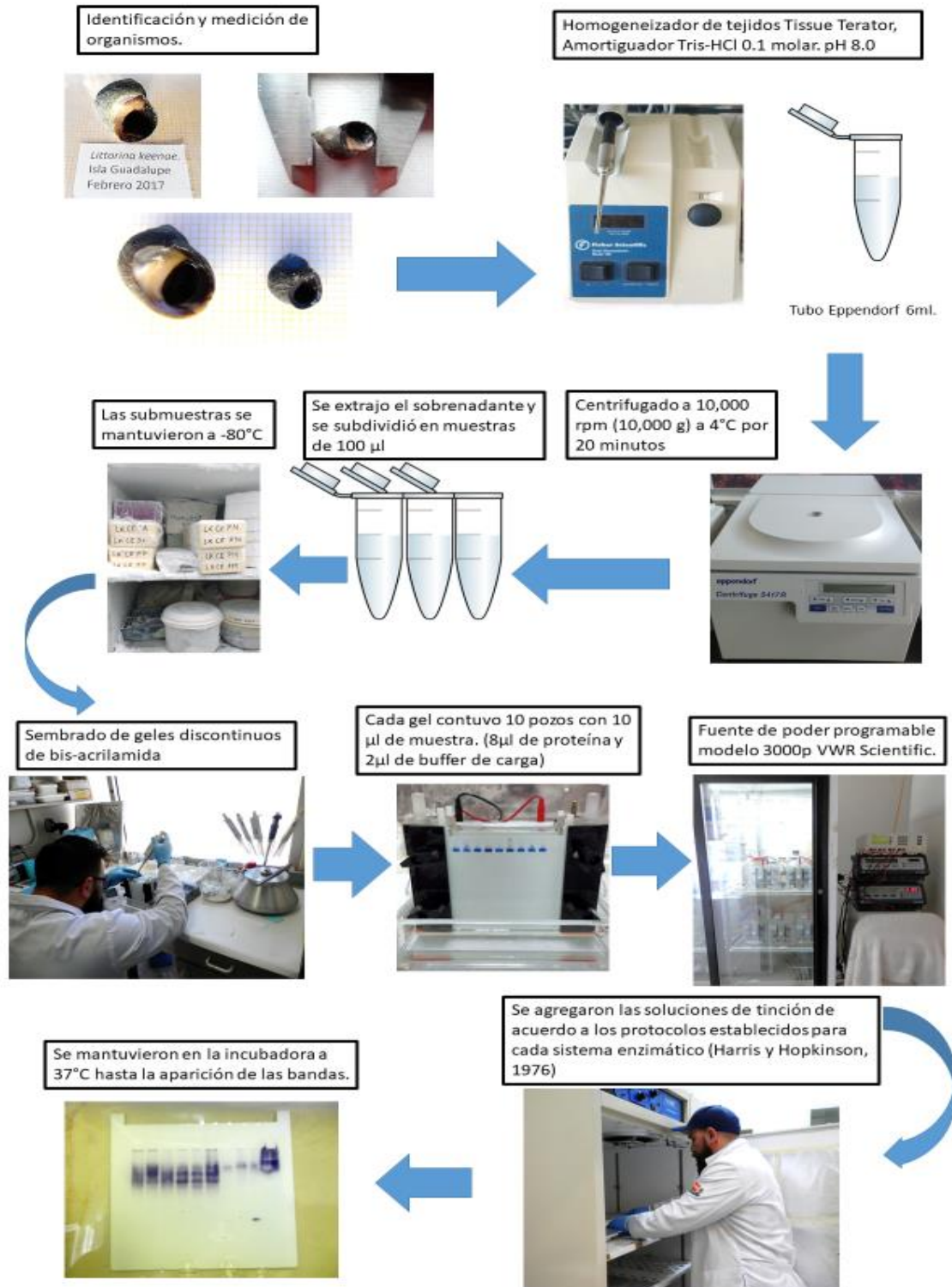


Figura 8. Resumen esquemático del análisis genético en laboratorio.

4.3 Análisis de Datos.

4.3.1 Variabilidad genética

Con la información que se generó a partir de la interpretación de los zimogramas, se empleó el programa BIOSYS-1 (Swofford y Selander, 1981) para obtener los siguientes estimadores genéticos: las frecuencias alélicas y genotípicas, el porcentaje de loci polimórficos, la heterocigocis (H), la heterocigocis esperada (He) (Nei, 1978), la heterocigocis observada (Ho), la deficiencia o exceso de heterocigotos (D), así como la identidad genética de Nei, (1978) (Nei y Masatoshi, 1978).

A. Frecuencias alélicas y genotípicas: las cuales corresponden al número de veces que se presenta un alelo o genotipo en cada locus dentro de una población analizada.

B. Numero promedio de alelos por Locus; es la media del número de alelos por locus considerando todos los locus y todas las poblaciones analizadas.

C. Polimorfismo: razón de loci polimórficos identificados y el total de loci analizados. Se siguió el criterio del 95% para reportar los resultados obtenidos en el presente estudio; esto se refiere a considerar como polimórfico a un locus si el alelo más común se presentó con una frecuencia ≤ 0.95 .

D. Heterocigosis: Es la proporción de individuos que poseen más de un alelo por locus en una población. Se estimó con base en los siguientes criterios:

- **Heterocigosis Observada (H₀).** Obtenidos por conteo directo. Es la proporción de individuos de la muestra que son heterocigotos.

- **Heterocigosis Esperada (H_e).** Se calculó a partir de las frecuencias alélicas mediante la estimación sin sesgo de Nei (1978), asumiendo el equilibrio teórico de Hardy-Weinberg.

E. Deficiencia o exceso de heterocigotos (D) (Selander, 1970): Si el valor del estadístico es negativo indica deficiencia, mientras que uno positivo representa un exceso de heterocigotos. El valor del estadístico es cero si las frecuencias genotípicas están en equilibrio de Hardy-Weimberg.

$$D = \frac{H_o - H_e}{H_e}$$

4.3.2 Equilibrio de Hardy-Weinberg.

Con el fin de contrastar las frecuencias genotípicas observadas con las esperadas por locus. El equilibrio se examinó mediante la prueba de bondad de ajuste de ji-Cuadrada (Sokal y Rohlf, 1995). Los grados de libertad se calcularon al sustraer el número de genotipos del número de alelos (Swofford y Selander, 1981). La prueba se realizó con ayuda del programa GENEPOP 3.4 (Raymond y Rousset, 2003). De igual manera, al nivel de significancia se le aplicó la corrección secuencial de Bonferroni para reducir la posibilidad de errores del tipo 1 (Rice, 1989).

4.3.3 Coeficiente de endogamia.

Con el programa FSTAT v2.8 (Goudet, 2016) se calcularon los estadísticos F de Wright. La definición original de Wright se basa en el coeficiente de endogamia. Así, los estadísticos F pueden ser vistos como la correlación entre genes homólogos tomados de un nivel de la subdivisión, en relación con cualquier otro nivel superior. La correlación entre los genes dentro de los individuos (I) en relación con los genes de la población total (T) es representada por F_{IT} , que corresponde con la endogamia total. La correlación entre genes dentro de los individuos en relación con los de la subpoblación (S) es representada por F_{IS} ,

mientras que la correlación entre los genes dentro de la subpoblación en relación con los de la población total está representada por F_{st} , que es igual a la probabilidad de que dos alelos idénticos por descendencia (identical by descent, provenientes de una población ancestral) se combinen en un cigoto.

Los estadísticos F se relacionan entre sí de la siguiente manera:

$$[1 - F_{it}] = (1 - F_{st}) (1 - F_{is})$$

Y, por lo tanto:

$$F_{st} = (F_{it} - F_{is}) / (1 - F_{is}).$$

La estimación de la F_{ST} es más fácil de visualizar siguiendo la definición de Nei (1973):

$$F_{st} = (H_t - H_s) / H_t$$

donde H_t es el promedio de la heterocigosis esperada en la población total, para todos los loci y H_s es el promedio de la heterocigosis esperada dentro de subpoblaciones para todos los loci. F_{ST} mide la reducción en la heterocigosis debida a diferenciación genética entre poblaciones. También se puede definir la F_{ST} en términos de las varianzas en las frecuencias alélicas entre las poblaciones, lo cual puede ser más intuitivo: (Avice, 1994; Hartl y Clark, 1997).

$$F_{st} = \text{Var}(p) / (p(1-p))$$

entre mayor haya sido la deriva génica, mayor será la varianza (las diferencias entre) las frecuencias alélicas entre poblaciones.

Adicionalmente, es importante mencionar que en la literatura existen variantes en la estimación de la F_{ST} . La F_{ST} tiene varias características que la han hecho atractiva para los biólogos evolutivos. En primer lugar, su interpretación es relativamente sencilla:

Si la $F_{ST} = 0$, indica que las frecuencias alélicas son idénticas en todas las poblaciones estudiadas, o sea que aún no ha existido o se ha registrado diferenciación entre ellas (i.e., $H_t = H_s$). El máximo posible en la F_{ST} es de 1, al que

se llega cuando cada población está fija en alelos diferentes (i.e., $H_s=0$), o sea que son completamente diferentes las frecuencias alélicas de las poblaciones que se estudiaron. Otra ventaja de la F_{ST} es que, como ya se mencionó, a partir de ella se puede obtener una aproximación del número de migrantes (Nm) si se ha llegado al equilibrio entre los procesos de la deriva génica y la migración.

De esta manera, se calcularon los valores de F_{ST} por pares de poblaciones para verificar los niveles de divergencia genética que existen entre las poblaciones debido al flujo genético y a los patrones de circulación oceánica. Se estimó el flujo genético entre poblaciones mediante el número de migrantes por generación: $Nm = [(1/F_{ST})-1]/4$, donde N es el tamaño efectivo poblacional y m es la proporción de migrantes por generación (Ayre y Hughes, 2004).

4.3.4 Diferencia poblacional y flujo genético.

El método de cadena de Markov fue utilizado para examinar las diferencias en las frecuencias alélicas y genotípicas entre los pares de poblaciones, mediante el programa GENEPOP 3.3. La identidad y distancia genética sin sesgo (Nei, 1978) entre las poblaciones fue calculada y a partir de esta se intentó realizar el dendrograma para agrupar los sitios de acuerdo a la similitud o diferencia genética.

5.- Resultados y discusión.

5.1.1 Caracteres morfométricos asociados a los componentes principales (ACP).

Mediante la aproximación del Análisis de Componentes Principales con datos estandarizados se obtuvieron, de acuerdo al principio de Hotelling (valores propios mayores o iguales a 1), un componente significativo para las 2 poblaciones provenientes de Isla de Guadalupe y de igual manera 1 componente significativo para las 4 poblaciones de *L. keenae* provenientes de Isla de Cedros.

La proporción de la varianza explicada por el primer componente siempre fue > 80% con excepción de LKGUCO, y la proporción acumulativa entre el componente I y II siempre fue > 90% con excepción de LKGUPS (89%).

De acuerdo a los valores de correlación se identificó para la población de LKCEPM que tres caracteres estaban asociados al CPI; A-B, C-D y E-B, y variaron directamente entre sí, mientras que al componente II se asoció el carácter F-D. De igual manera se obtuvieron resultados similares para las poblaciones de LKCESA, LKCEPN y LKCECO. (Tabla II).

Para el caso de la población de LKCEPP los caracteres A-B y E-B se asociaron al CPI mientras que C-D y F-D se asociaron al CPII variando directamente entre ellos. En LKGUPS, los caracteres A-B, C-D y F-D se asociaron al CPI mientras que E-B se asoció al CPII y varió inversamente con respecto a los otros caracteres.

De acuerdo a las relaciones encontradas, la característica que fue explicada en general por el CPII es el ancho de la apertura (F-D) de cada individuo de las poblaciones exceptuando el caso de LKGUPS en el que el carácter que se asoció al CPII y varió inversamente a los diferentes caracteres fue la altura de la apertura (E-B), como se muestra en la tabla II.

Tabla II. Valores de los dos Componentes Principales por carácter morfométrico: Altura de la concha (A-B), ancho de la concha (C-D), altura de la apertura (E-B) y ancho de la apertura (F-D), de organismos de *L. keenae* en cada una de las localidades.

	LKGUCO		LKGUPS		LKCEPN		LKCESA		LKCEPP		LKCEPM	
Variable	PC I	PC II	PC I	PC II	PC I	PC II	PC I	PC II	PC I	PC II	PC I	PC II
A-B	0.524	-0.108	0.514	0.035	0.5	-0.497	0.501	-0.495	0.522	-0.094	0.506	-0.136
C-D	0.539	-0.179	0.512	0.388	0.506	-0.141	0.508	-0.318	0.462	-0.747	0.501	-0.238
E-B	0.496	-0.451	0.477	-0.842	0.507	0.175	0.507	0.037	0.533	0.167	0.503	-0.419
F-D	0.435	0.868	0.496	0.373	0.484	0.838	0.484	0.808	0.479	0.637	0.491	0.854

Como se observa en la figura 9, la gráfica del CPI y CPII generó una distribución de localidades basada en las semejanzas de sus parámetros morfométricos, partiendo de un eje central y variando en la amplitud de los ángulos (entre mayor sea la amplitud del ángulo, mayor es la diferencia de las poblaciones y viceversa), obteniendo así tres grupos. El primero muy compuesto por: LKCEPN, LKGUCO e LKGUPS (con valores dentro del plano cartesiano (+,-), el segundo LKCEPP y LKCESA (+,+) y el tercero por LKCEPM (-,-).

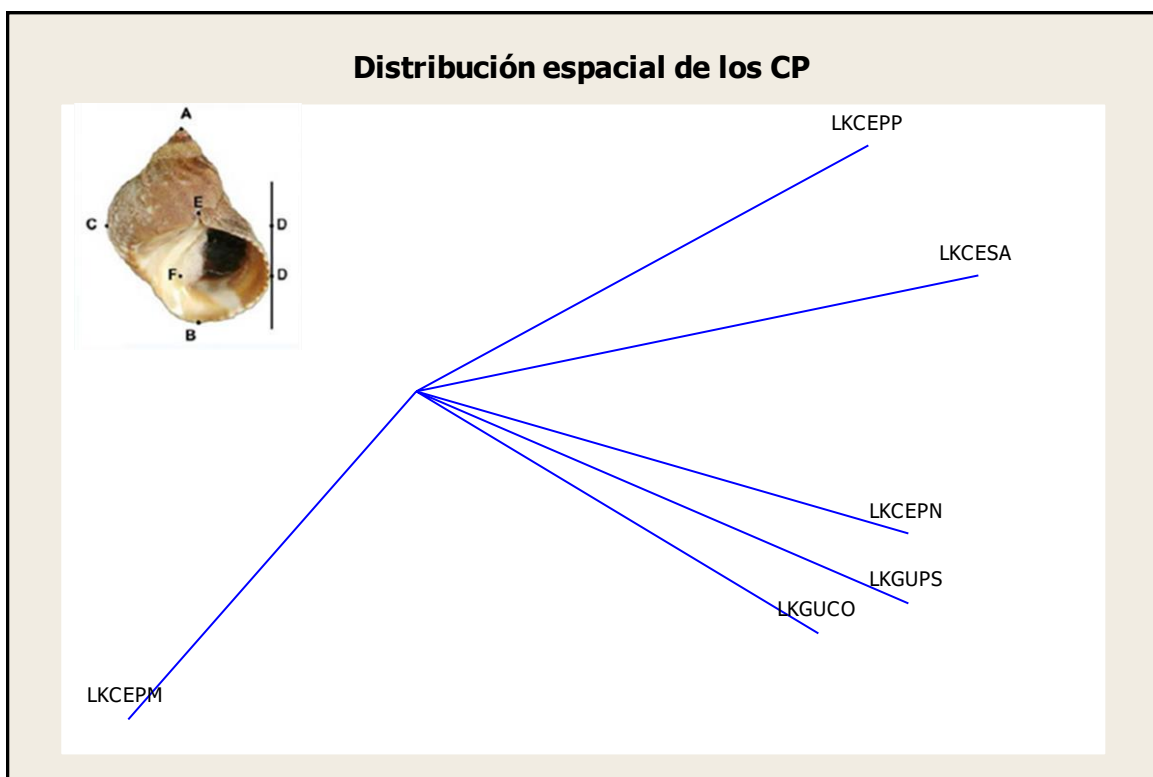


Figura 9. Distribución espacial de los dos componentes principales de las seis localidades de acuerdo al ACP, según sus similitudes en las medidas transformadas de los cuatro parámetros: Altura de la concha (A-B), ancho de la concha (C-D), altura de la apertura (E-B) y ancho de la apertura (F-D), de organismos de *L. keenae*.

En la tabla III, se muestran los valores de los CP I y CPII con una varianza de 3.44 y 2.12 respectivamente y que juntos explican una varianza mayor al 90%. Se puede observar que únicamente la localidad de LKCEPM presenta un valor negativo en el CPI, por lo tanto, varía inversamente a las diferentes localidades; para el caso de LKCESA, LKCEPN Y LKGUPS, su varianza se encuentra mejor explicada por el CPI y con valor positivo lo cual indica una varianza lineal; LKCEPP e Isla LKGUCO presentan valores mayores en el CPII y un valor negativo para el último caso.

Tabla III. Valores de los dos Componentes Principales de cada una de las localidades con varianza y porcentaje de varianza de cada población de *L. keenae*.

Variable	Componente I	Componente II
LKGUCO	0.361	-0.437
LKGUPS	0.441	-0.383
LKCEPN	0.440	-0.257
LKCESA	0.503	0.211
LKCEPP	0.404	0.446
LKCEPM	-0.257	-0.593
<i>Varianza</i>	3.44	2.12
<i>% Varianza.</i>	57	35

5.1.2 Prototipo de poblaciones (FEO).

Las Funciones Empíricas Ortogonales estandarizadas (SFEO) de LKCEPM, LKCESA, LKCEPP, LKCEPN, LKGUCO y LKGUPS, explicaron una proporción de la variancia >96% y presentaron un valor propio (eigenvalue) > a 1, por lo tanto, según el principio de Hotelling, las funciones empíricas ortogonales o los organismos “prototipo” por cada localidad se consideran estadísticamente significativos.

De acuerdo a los coeficientes de correlación existentes entre los organismos prototipo de *L. keenae* de las diferentes localidades, se obtuvo un dendrograma que agrupa de mayor a menor similitud las siguientes localidades: LKGUCO LKGUPS en un 97% de similitud y estos a su vez con LKCEPN en 85.8% de similitud. En un siguiente grupo se encontró a LKCESA y LKCEPP que se asemejan en 94% y a su vez en 69.7% al primer grupo y finalmente LKCEPM que se asemeja 36.2% a los dos grupos anteriores como se muestra en la figura 10.

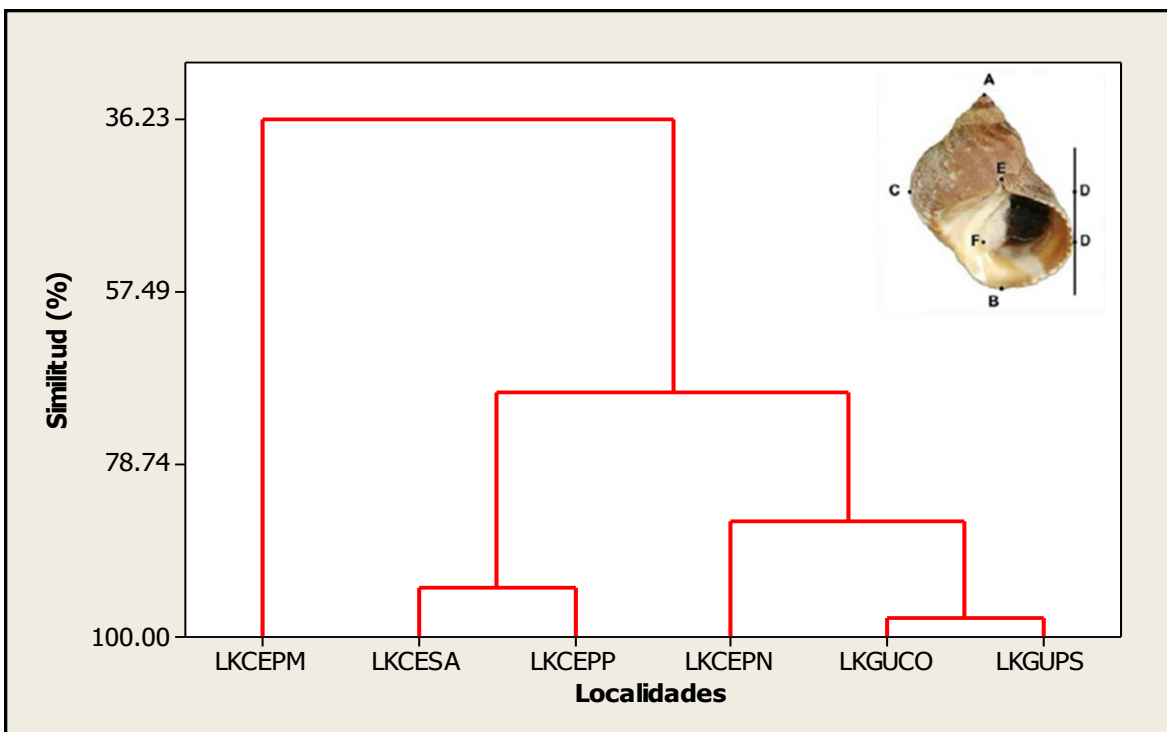


Figura 10. Análisis de Clúster de similitud de organismos “prototipo” de *L. keenae* generados con las FEO estandarizadas de las seis localidades: LKCEPM (P. Morro), LKCESA (S. Agustín), LKCEPP (P. Prieta), LKCEPN (P. Norte), LKGUCO (Isla de Gpe. Campo Oeste) y LKGUPS (Isla de Gpe. Sur).

A partir de los resultados obtenidos del Análisis de Componentes Principales y la creación de Funciones Empíricas Ortogonales estandarizadas, se podría describir el efecto de las condiciones ambientales sobre los organismos estudiados. De acuerdo a las características de temperatura, exposición al oleaje, inclinación de la pendiente, corrientes y diferenciaciones latitudinales se podría explicar la variación en los caracteres morfométricos en los organismos de cada localidad.

En un primer grupo, por semejanza, se tiene a los organismos de Isla LKGUCO, LKGUPS y LKCEPN, siendo estos, en promedio, los organismos más grandes (tabla IV) que coinciden con las poblaciones que se encuentran a mayores latitudes; 28°58'40", 28°53'01" y 28°22'29" respectivamente y, como ya se ha explicado, algunos fenómenos y procesos biológicos cambian regularmente de acuerdo a la latitud donde se presentan, es decir, que varían en dirección del ecuador a los polos. Una de estas variaciones se da en relación a la edad, dimensiones de los organismos y contenido de lípidos, los cuales incrementan notablemente en latitudes mayores. Otra característica que puede explicar esta similitud es que, de acuerdo a las regiones biogeográficas del Pacífico Oriental propuestas por Correa Sandoval en 1995, Isla de Guadalupe se encuentra dentro de la Provincia Californiana, influida por la corriente de California y caracterizada por temperaturas templado cálidas (17, 17.5°C), las cuales alcanzan a influir a Punta Norte de Isla de Cedros la cual se encontraría en el límite austral de la Provincia Californiana y el límite septentrional de la zona llamada de transición. Estas características podrían asociarse a la regla de Bergmann, la cual explica que las poblaciones de una especie de sangre caliente que habitan en regiones frías tienden a tener el cuerpo más voluminoso que las que viven en tierras cálidas, esta reducción relativa de la superficie minimiza la pérdida de calor del cuerpo para los organismos más tropicales. La presencia de mayores tallas en organismos de *Littorina keenae* para las zonas más australes también pueden interpretarse desde el punto de vista ecológico, por ejemplo para la localidades de Isla Guadalupe, por ser de temperaturas más bajas en comparación con Isla de Cedros, presenta menor diversidad de especies lo cual implica menor

competencia por el nicho idóneo, esto permitiría a los organismos administrar la energía y dirigirla al crecimiento, evitando de esta manera la inversión de energía en la competencia con otros organismos. Otra posibilidad es el efecto producido por el oleaje, el norte de las dos islas está expuesto a mayor oleaje a causa de la Corriente de California con un sentido Norte a Sur. En una primera instancia sería lógico pensar que los organismos más pequeños serían los más favorecidos, sin embargo, son precisamente los más grandes los que pudieran ser seleccionados a favor al poder sujetarse con mayor fuerza la superficie de las rocas.

Para el caso del segundo grupo, de acuerdo a su similitud; los organismos de LKCESA y LKCEPP, fueron los organismos de *L. keenae* en promedio más pequeños (ver tabla IV). Ambas localidades fueron las únicas que mostraron valores positivos para los primeros dos componentes principales. Esta distribución de semejanzas aunado a los valores más pequeños de organismos podría estar relacionados con la acción de la Corriente de California, la cual incide con mucha energía en la costa oeste de Isla de Cedros provocando que mayor fuerza de oleaje choque contra la zona rocosa y hábitat de los Litorinidos. Asociado a estas características, las poblaciones de LKCESA y LKCEPP presentan las pendientes más pronunciadas. Al presentar una mayor pendiente, el ancho de la franja del litoral tiende a reducirse y, por lo tanto, implica una menor superficie lo que traería como consecuencia una reducción o disminución del número de organismos por especie. Esto tiende a disminuir la presión de competencia dentro de la especie, pero incrementa la presión para una competencia entre especies. Por otro lado, también se podría interpretar como una menor área para la distribución de organismos y por lo tanto un gasto mayor de energía destinada a la competencia por el nicho, repercutiendo de esta manera en las tallas de organismos.

El tercer grupo de organismos representado únicamente por la población de LKCEPM, la cual presentó valores negativos en ambos componentes principales (ver figura 9). Esto posiblemente se deba a que esta población se encuentra en un ambiente con características únicas. LKCEPM se encuentra situado en la parte Oriental de la Isla de Cedros, por lo tanto, no recibe tanta energía de oleaje

generada por la Corriente de California, sumado a esto, presenta una pendiente de 5° lo cual les permite a los organismos tener mucho más espacio para distribuirse y desplazarse. Es la población que se encuentra más cercana a la región peninsular la cual presenta surgencias por lo menos en primavera y verano, (Durazo *et al* 2010). También se presentan características propias de la zona como reportó Durazo en el 2010, se presentan dos giros ciclónicos frente a Punta Eugenia, la mayor prominencia costera y la contracorriente de California localizada sobre el talud continental en todas las estaciones del año exceptuando en primavera lo cual propicia características únicas para los organismos.

El análisis de datos morfométricos mediante la creación de Componente Principales permite proponer hipótesis para asociar las características del medio ambiente con la biología del organismo, de esta forma es posible identificar diferencias morfométricas entre las localidades que se presentarían como respuesta de un rasgo fenético sin presentar propiamente una base genética que las separase de la misma especie y que le permitiera sobrevivir a la intensidad del oleaje, variaciones de temperatura, diferencias latitudinales entre otros.

Estudios basados en caracteres morfométricos en organismos de poco movimiento en el intermareal rocoso han sido realizados con anterioridad para intentar describir la respuesta a nivel morfométrico a la sinergia de las diferentes características ambientales, así como las estrategias que desarrollan los organismos para contrarrestarlas. Por ejemplo, Gracia, (2017), en su trabajo de tesis, realizó un análisis morfométrico utilizando ACP y FEO donde se pudo explicar las variaciones de *Lottia gigantea* en la Isla de Cedros, asociando rasgos fenéticos que presentó cada población a las características propias de la zona.

5.1.3 Prototipo de organismos (FEO) para diferenciar entre especies de Litorinidos.

El uso de prototipos generados mediante la creación de Funciones Empíricas Ortogonales Estandarizadas (SFEO) no fueron lo suficientemente sensibles para diferenciar entre poblaciones de *L. keenae* pero si a nivel de especie. Se

construyeron SFEO de razones de medidas de la concha con referencia a la altura total de la concha y el ancho total, obteniendo resultados similares en ambas ocasiones.

De todas las combinaciones de SFEO que emplearon datos merísticos y razones y con datos crudos y transformados, las combinaciones que permitieron separar los organismos de *L. plena* y *L. keenae* fueron el uso de promedios sin estandarizar (\bar{X}_{AB} , \bar{X}_{CD} , \bar{X}_{EB} y \bar{X}_{FD} en tabla IV), FEO de datos crudos sin estandarizar (AB, CD, EB Y FD) y las FEO de razones con respecto a la altura y ancho de la concha sin transformar (AB/EB, AB/EB, AB/FD, CD/FD Y CD/EB), considerado este conjunto de razones, en este análisis, como la mayor cantidad de datos que podría ejemplificar y representar el volumen total de los organismos.

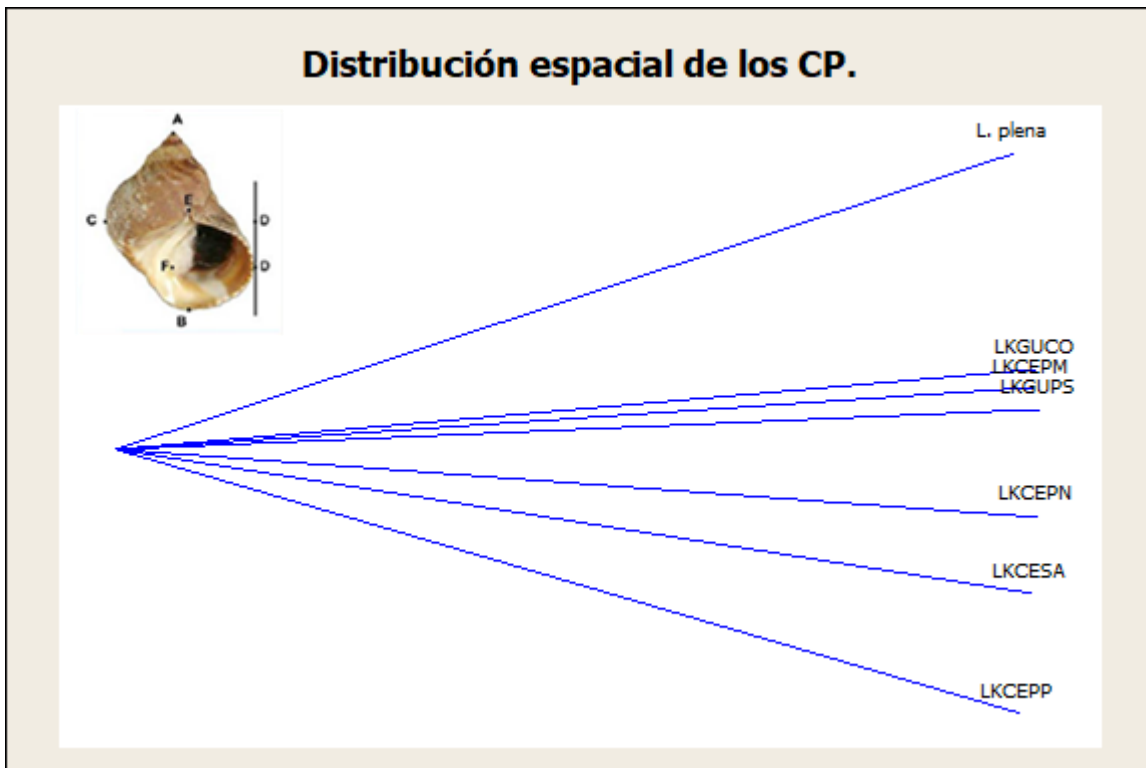


Figura 11. Distribución espacial de los dos componentes principales de las poblaciones de *L. keenae* y *L. plena* de acuerdo a los promedios de medidas merísticas de los organismos de las diferentes localidades.

Tabla IV. Valores en promedio de los caracteres merísticos de las diferentes poblaciones de *L. keenae*. y *L. plena*. (Valores expresados en mm.).

	LKCEPM	LKCESA	LKCEPP	LKCEPM	LKGUCO	LKGUPS	L. plena
A-B	9.7796	7.1438	6.166	11.2124	13.2574	12.9512	6.279
C-D	7.2348	5.8642	5.4872	9.1844	9.9282	9.7688	4.0422
E-B	7.1396	5.4224	4.4958	7.9046	8.6022	8.6108	3.8026
F-D	3.9318	2.7368	2.275	4.7572	5.1774	4.8566	2.3252

Según la distribución espacial de los dos principales componentes de las poblaciones de *L. keenae* en las diferentes localidades y *L. plena* en una localidad se puede observar una diferencia clara en la magnitud de ángulo de separación entre *L. plena* y las poblaciones de *L. keenae*. (fig. 11)

De acuerdo al análisis de clúster que se realizó con los promedios merísticos de los organismos de *L. keenae* de las diferentes localidades, los organismos de *L. plena* se observa que existe una similitud de 97.8% entre los organismos de una sola localidad de *L. plena* y el siguiente grupo compuesto por todos los organismos de *L. keenae* de las 6 diferentes localidades. De igual manera con las FEO de los datos merísticos (AB, CD, EB Y FD) sin estandarizar, se obtuvieron resultados similares.

El ACP de las razones morfométricas sin estandarizar, en función al alto de la concha, así como a las razones en función al ancho de la misma de los organismos de todas las localidades para *L. keenae* y la única población de *L. plena*, ayudaron a diferenciar a los organismos por especie como se muestra en las figuras 12 y 13.

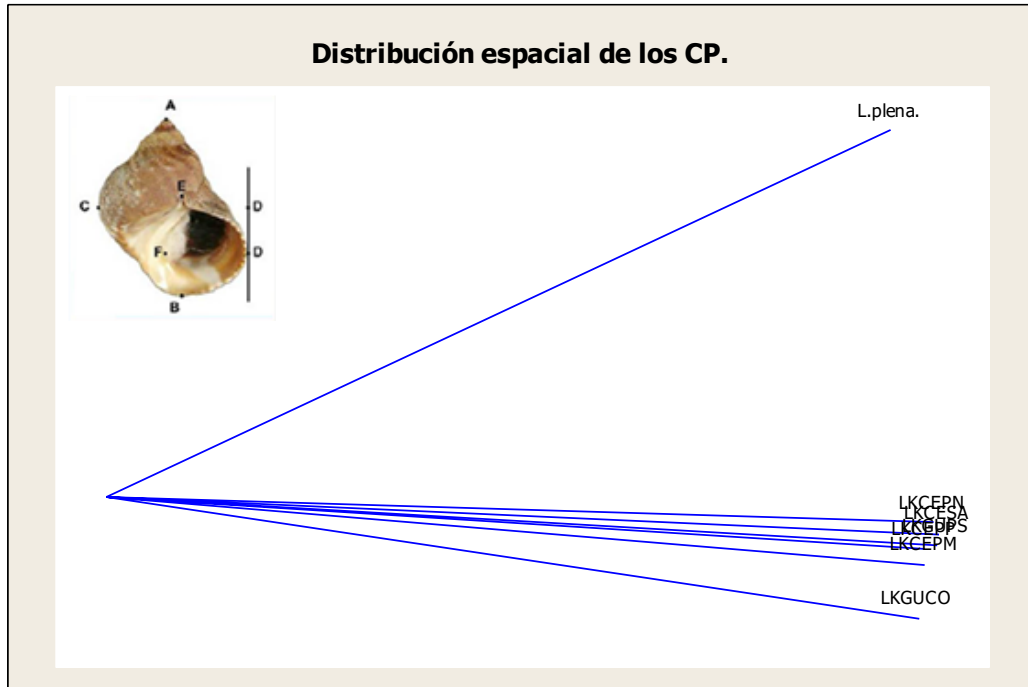


Figura 12. Distribución espacial de los dos componentes principales de la razón de medidas con respecto a la altura de la concha (AB/EB, AB/CD, AB/FD) de los organismos de *L. keenae* y *L. plena*.

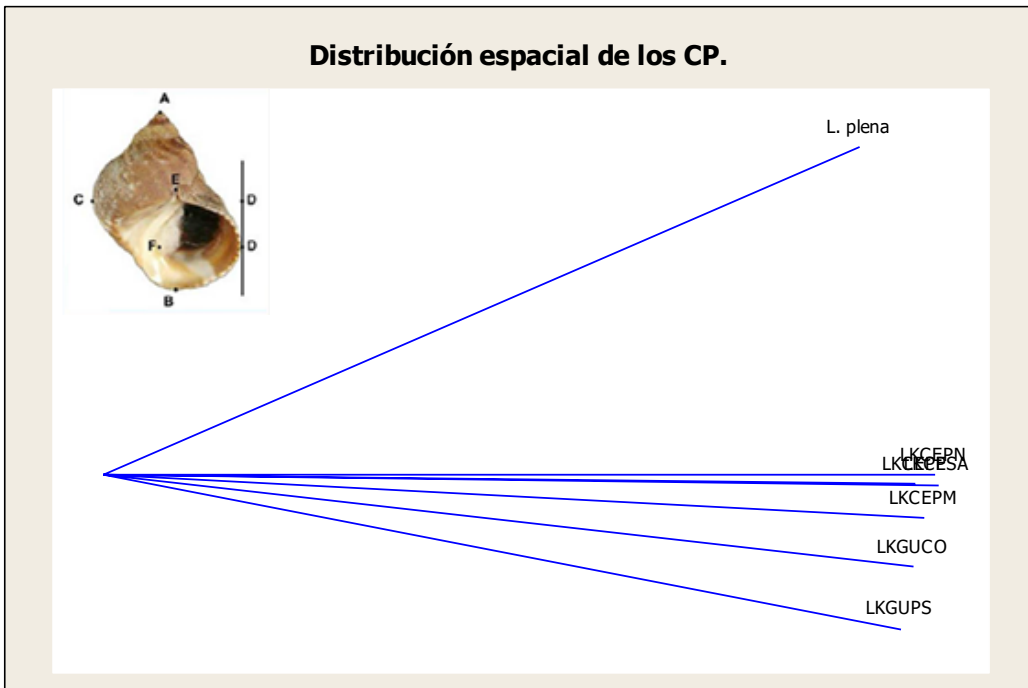


Figura 13. Distribución espacial de los dos componentes principales de la razón de medidas con respecto al ancho de la concha (CD/FD Y CD/EB) de los organismos de *L. keenae* y *L. plena*.

De acuerdo al análisis de clúster que se realizó a partir de las razones morfométricas con referencia a la altura y ancho total de los organismos, se obtuvo una similitud entre el grupo de organismos de *L. keenae* de las 6 localidades muestreadas y los organismos de *L. plena* de una sola localidad de 93.2% en razones con función a la altura de la concha y 89.8% en razones con función al ancho de la concha.

En la tabla V, se muestra el análisis de Componentes Principales con los datos sin transformar de las razones morfométricas con respecto a la altura y ancho de la concha, con varianzas de 6.4 y 6.3 respectivamente donde se puede observar que en el caso de todas las poblaciones de *L. keenae* de las 6 diferentes localidades el CP I fue el que mejor expresó la varianza de las razones con respecto a la altura de la concha y variaron directamente por tener valores positivos y negativos en el CP II a diferencia de la muestra de *L. plena* en la cual la varianza fue mejor expresada por el CP II donde, de igual manera varió inversamente a los valores de las diferentes poblaciones en función al CP II.

En el caso de las razones en función al ancho de la concha de obtuvieron los mismos resultados, mostrando nuevamente que únicamente la varianza de la población de *L. plena* e LKGUPS fueron mejor expresadas por el CP II y sólo *L. plena* varió inversamente a los valores negativos en el CP II de las diferentes poblaciones, como se muestra en la tabla V.

Tabla V, Valores de los Componentes Principales de razones morfométricas en relación a la altura y ancho de la concha individuos de *L. keenae* y 1 de *L. plena* de 7 localidades.

VARIABLE	AB/CD, AB/EB y AB/FD		CD/FD y CD/EB	
	C.P. I	C.P. II	C.P. I	C.P. II
LKCEPM	0.378	-0.168	0.383	-0.116
LKCESA	0.385	-0.093	0.390	-0.026
LKCEPP	0.378	-0.129	0.379	-0.023
LKCEPN	0.382	-0.062	0.389	-0.00
LKGUCO	0.375	-0.302	0.378	-0.244
LKGUPS	0.384	-0.121	0.372	-0.408
L. plena	0.363	0.915	0.353	0.871
<i>Varianza</i>	6.4	0.17	6.1	0.28
<i>% Varianza.</i>	92	0.2	88	0.9

Con el propósito de ampliar y sustentar de mejor forma la explicación para poder diferenciar morfométricamente a las especies de *L. keenae* y *L. plena*, a partir de los resultados observados durante la realización de las combinaciones de los parámetros fenéticos para determinar las características merísticas que fueran más sensibles a la separación de las especies y con base a las características o rasgos de la morfología de las especies en cuestión, se realizó un ACP considerando las razones de resta; AB-EB (producto de restar la altura de la concha menos la altura de la apertura obteniendo de esta forma una nueva medida AE) y CD-FD (producto de restar el ancho de la concha menos el ancho de la apertura obteniendo así una nueva medida CF). (Figs. 14 y 15).

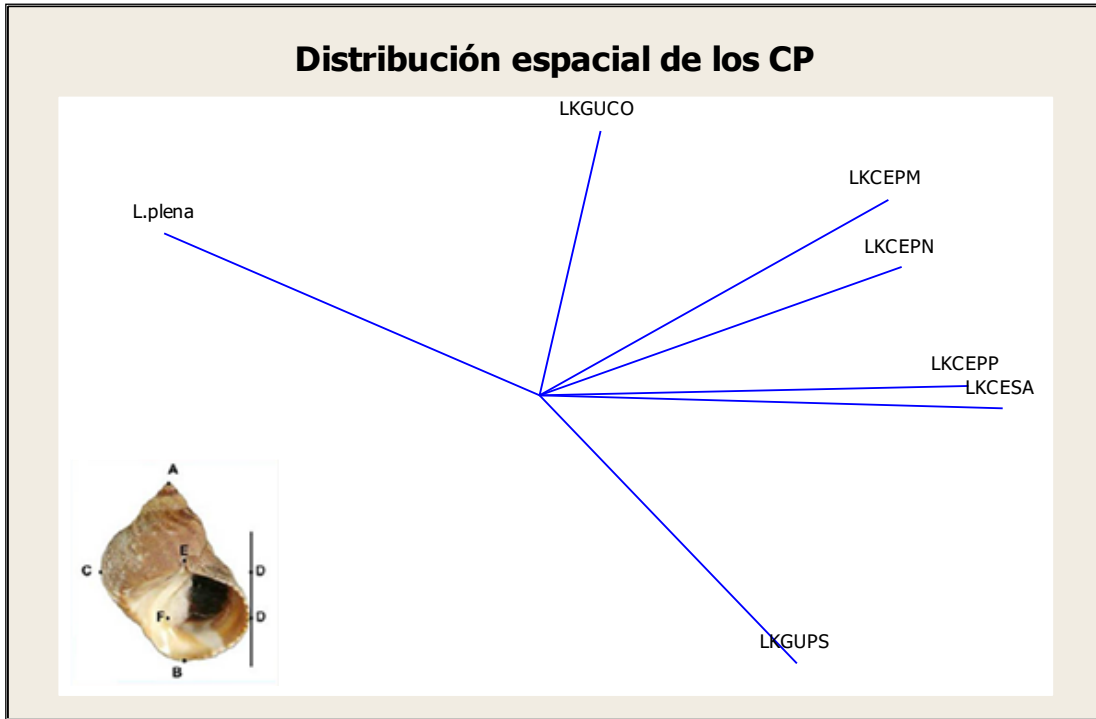


Figura 14. Distribución espacial de los dos componentes principales de la razón de medidas producto de la resta referente a la altura de la concha AE y con respecto al ancho de la concha CF de los organismos de *L. keenae* y *L. plena*.

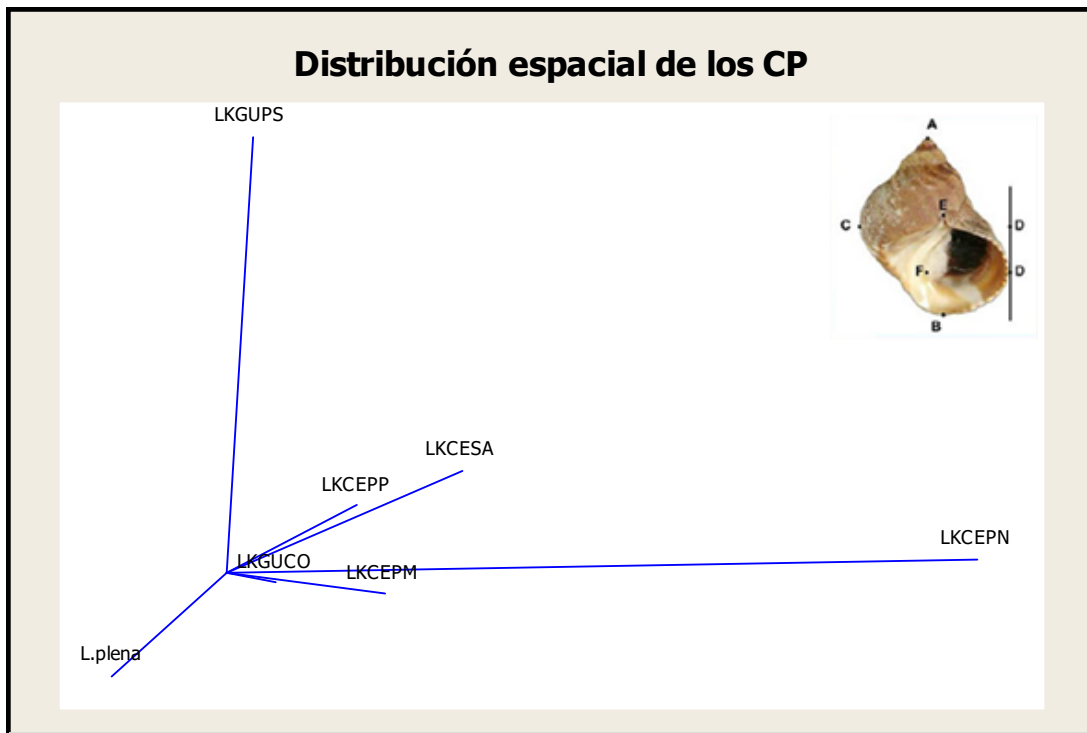


Figura 15. Distribución espacial de los dos componentes principales, empleando una rotación VARIMAX en la razón de medidas producto de la resta referente a la altura de la concha AE y con respecto al ancho de la concha CF de los organismos de *L. keenae* y *L. plena*.

En la figura 15 se muestran los resultados de la distribución espacial de los dos CP de cada localidad, aplicando una rotación VARIMAX la cual permite visualizar la distribución de la varianza de factores dándole mayor énfasis a los factores con valores de correlación más altas sobre los factores con valores de correlación nula.

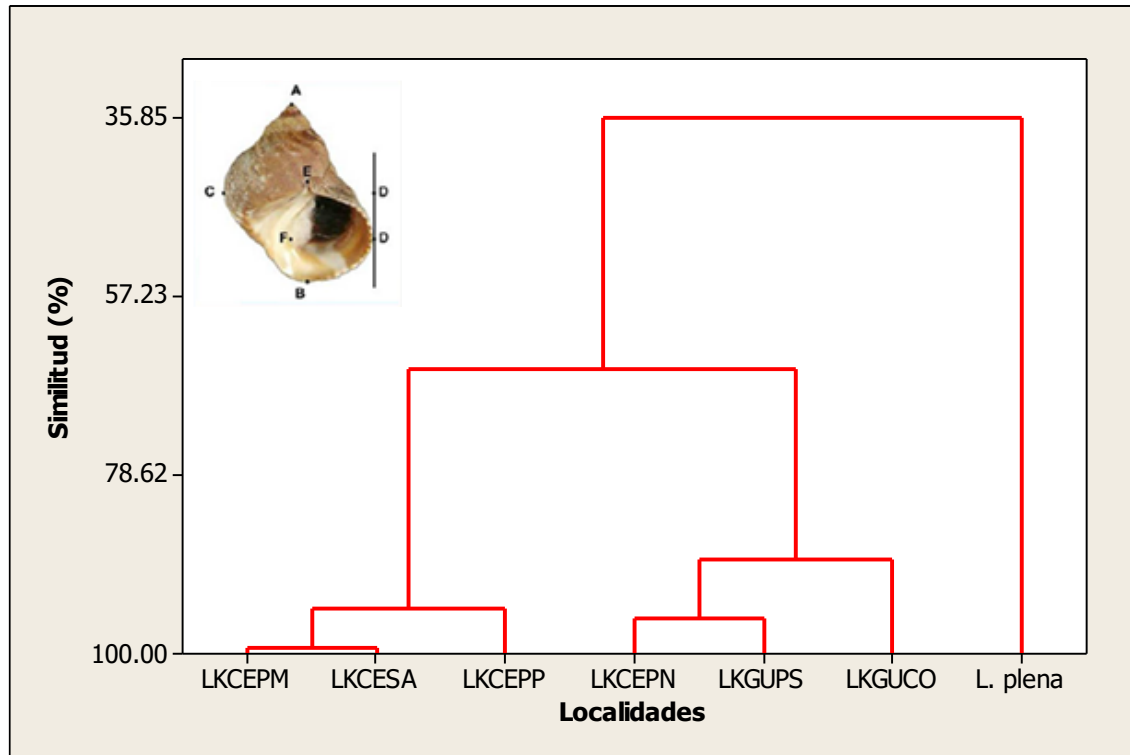


Figura 16. Análisis de Clúster de similitud de medidas AE y CF de *L. keenae* en las seis localidades: LKCEPM (P. Morro), LKCESA (S. Agustín), LKCEPP (P. Prieta), LKCEPN (P. Norte), LKGUCO (Isla de Gpe. Campo Oeste), LKGUPS (Isla de Gpe. Sur). y *L. plena* en una sola localidad.

De acuerdo al análisis de correlación canónica (clúster) realizado tomando en cuenta las nuevas medidas (AE y CF) en las seis localidades de *L. keenae* y *L. plena*, incluyendo los datos crudos, sin estandarizar, la correlación que existe entre ellos se puede explicar de la siguiente forma: en un primer grupo se ubica a LKCEPM, LKCESA y LKCEPP con 75.8% de similitud, en un segundo grupo LKCEPN, LKGUPS. y LKGUCO. con 53% de similitud y en un tercer grupo independiente de los anteriores, *L. plena* con 33% de similitud con las poblaciones anteriores.

Como se puede observar la población de *L. plena* se diferencia completamente de las poblaciones de *L. keenae* permitiendo suponer que las medidas obtenidas del producto de las restas del alto de la concha menos el alto de la apertura y el ancho de la concha menos el ancho de la apertura; AE y CF en crudo y sin estandarizar, pueden ser considerado un rasgo fenético, sin ser un rasgo taxonómico, que podría ser de utilidad para diferenciar entre especies, además de que por la naturaleza de sus medidas (razón) permite descartar las variaciones de organismos por edad en la que se encuentran los organismos al momento de ser capturados.

Trabajos donde se aplica el ACP con rasgos fenéticos o merísticos bajo el mismo enfoque que en el presente estudio han ayudado a diferenciar a *Lyropecten* a nivel de subgénero (Cid Becerra, 2002) y *Chione* (Licon-Chávez et al., 2007). En el caso del género *Lyropecten* el ACP ayudó a resolver la diferenciación taxonómica en dos subgéneros, (*Nodipecten*) para el Pacífico Nororiental (*Lyropecten*) para el Atlántico Occidental. En el Trabajo realizado con género *Chione* (Licon-Chávez, 2007) los resultados del ACP concuerdan y apoyan la clasificación taxonómica propuesta anteriormente por Keen (1972) y no así la de Roopnaire (2009).

Haber encontrado que el análisis de componentes principales (ACP) de razones de medidas de las conchas permite diferenciar entre especies del género *Littorina* genera interés en realizar estudios similares donde se pueda utilizar el mismo método para diferenciar entre especies de moluscos bivalvos cercanos filogenéticamente y que presenten variación intraespecífica. Esta metodología

puede ser muy útil para estudios de taxonomía en el caso de no contar con un organismos “tipo” como tal, o cuando estos organismos no presentan las características necesarias que permitan diferenciar entre especies ya que la creación de SFEO y el ACP con razones de medidas permite integrar la riqueza morfométrica de las especies implicadas eliminando el sesgo que podría representar las diferencias por tallas con relación a la edad de los organismos y sin la necesidad de contar con organismos adultos en etapa reproductiva.

5.2.1 Análisis genético.

En el presente estudio se emplearon 11 loci pertenecientes a 3 sistemas enzimáticos para comparar las 6 poblaciones de *Littorina keenae*, sin embargo, para las poblaciones de Isla de Guadalupe el número de loci que revelaron fueron 21 de 5 sistemas: Pgi, Pgm, Idh, Mdh y Me mientras que para isla de Cedros se obtuvieron 11 loci de diferentes sistemas: Pgi, Pgm y Mdh. En total, resolvieron 21 loci, pero con la finalidad de realizar comparaciones entre Islas, evitando el sesgo que se podría generar por la diferencia de sistemas enzimáticos, en el presente trabajo se tomaron en cuenta 11 loci de 3 sistemas enzimáticos (tabla I). La frecuencias alélicas y genotípicas se presentan en la tabla VI y VII respectivamente.

Los polimorfismos genéticos pueden ser usados como marcadores para ayudar a esclarecer ciertos patrones y/o procesos biológicos; además, pueden establecer parentescos. También se puede determinar la cantidad de entrecruzamiento entre diferentes grupos de la misma especie (flujo genético), y la información ser usada para identificar poblaciones únicas, potencialmente importante para la sobrevivencia de la especie. Puede no ser claro si dos grupos distintos de organismos deben ser clasificados como de diferentes especies y el comparar los polimorfismos genéticos de los dos grupos puede ayudar a su clasificación (Checa, 2007).

Cuando se usa el polimorfismo genético para estimar la variabilidad de una población, este estadístico podría verse, hasta cierto punto arbitrario, ya que depende del criterio que se use para designar la frecuencia del alelo más común, 0.95 o 0.99 (Dobzhanski et al, 1980). En años recientes se ha utilizado el estudio de polimorfismos funcionales que afectan o regulan la expresión génica, en este contexto se ha demostrado asociación de cierto gen con funcionalidad de mecanismos propio de los organismos, lo cuales se ven afectados o potencializados dependiendo las condiciones ambientales.

Una enzima puede considerarse polimórfica solo si la frecuencia del alelo más común es menor que 0.95 en una o más de las poblaciones analizadas, para lo cual, en el presente estudio se obtuvo un porcentaje de polimorfismo de 90.1% para isla de Guadalupe a diferencia de Isla de Cedros donde se obtuvo 100% de polimorfismo para todas las localidades. Correa-Sandoval (1994), analizó poblaciones de *Littorina keenae* y *L. scutulata* por medio de alozimas como marcador molecular. En su estudio analiza organismos provenientes de las dos especies y de localidades diferentes (con diferentes características como exposición al oleaje y desecación), donde obtuvo porcentajes de polimorfismo del 20% para *keenae* y del 10% para *scutulata*. Dichos resultados pueden variar en función de los sistemas enzimáticos principalmente pero también en función de la sensibilidad ambiental de los genes que se estudian. Otros estudios realizados con las mismas especies mencionadas anteriormente en la Costa Oeste de los Estados Unidos de Norte América y sur de Canadá (Mastro et al 1982), con el análisis de 10 loci obtuvo valores de 80% de polimorfismo.

Los organismos de las dos localidades de Isla Guadalupe (LKGUCO y LKGUPA) muestran similitudes en todos los loci, en la tabla VI se observa frecuencias similares de los alelos A y B con excepción del locus Pgi-1, donde predomina el alelo A y, Mdh-2 donde predomina el alelo B.

En las cuatro localidades de Isla de Cedros, se observa en el locus Pgm-1 mayor frecuencia del alelo A, así como en Mdh-7, con excepción de LKCEPN y Mdh-8 con excepción de LKCESA. En Mdh-1, Mdh-2, Mdh-3, Mdh-4 Mdh-6 se registra una mayor frecuencia del alelo B, así como Ldh-8 en LKCESA. En Mdh-6 se observa similitud en las frecuencias de ambos alelos, con excepción de LKCEPM donde se puede observar la presencia del alelo B en un 75% de la muestra y 25% el alelo A.

Es importante señalar que, en forma global todas las poblaciones presentan similitud entre islas en la presencia de alelos A y B, aunque esta igualdad se percibe con mayor facilidad en organismos de Isla de Guadalupe.

Tabla VI. Variación alélica de 11 loci en 6 poblaciones de *Littorina keenae* de Isla de Guadalupe y Cedros en el Pacífico mexicano.

LOCUS	ALELO	ISLA GUADALUPE		ISLA DE CEDROS			
		LKGUCO	LKGUPS	LKCEPN	LKCESA	LKCEPP	LKCEPM
Pgm-1	(n)	37	50	24	13	12	17
	A	1.000	1.000	0.771	0.808	0.917	0.824
	B	0.000	0.000	0.229	0.192	0.083	0.176
Pgi-2	(n)	37	36	24	18	21	6
	A	0.568	0.611	0.458	0.417	0.548	0.583
	B	0.432	0.389	0.542	0.583	0.452	0.417
Mdh-1	(n)	21	22	13	6	6	12
	A	0.500	0.545	0.269	0.333	0.167	0.208
	B	0.500	0.455	0.731	0.667	0.833	0.792
Mdh-2	(n)	31	35	22	14	19	13
	A	0.403	0.414	0.386	0.464	0.342	0.385
	B	0.597	0.586	0.614	0.536	0.658	0.615
Mdh-3	(n)	35	43	27	21	27	18
	A	0.500	0.535	0.407	0.381	0.352	0.389
	B	0.500	0.465	0.593	0.619	0.648	0.611
Mdh-4	(n)	41	46	35	25	31	25
	A	0.537	0.533	0.457	0.440	0.435	0.480
	B	0.463	0.467	0.543	0.560	0.565	0.520
Mdh-5	(n)	41	46	39	34	38	31
	A	0.512	0.478	0.551	0.382	0.382	0.387
	B	0.488	0.522	0.449	0.618	0.618	0.613
Mdh-6	(n)	42	48	30	29	41	30
	A	0.500	0.531	0.517	0.483	0.476	0.283
	B	0.500	0.469	0.483	0.517	0.524	0.717
Mdh-7	(n)	41	47	27	20	30	22
	A	0.488	0.521	0.481	0.650	0.717	0.636
	B	0.512	0.479	0.519	0.350	0.283	0.364
Mdh-8	(n)	42	48	24	11	12	19
	A	0.536	0.583	0.542	0.318	0.708	0.605
	B	0.464	0.417	0.458	0.682	0.292	0.395
Mdh-9	(n)	37	45	11	6	6	11
	A	0.527	0.633	0.636	0.500	0.500	0.686
	B	0.473	0.367	0.364	0.500	0.500	0.318

Abreviaciones: Para isla de Cedros: LKCESA (San Agustín), LKCEPN (Punta Norte), LKCEPM (Punta Morro) y LKCEPP (Punta Prieta) y para Isla de Guadalupe: LKGUCO (Campo Oeste) y LKGUPS (Punta Sur). (n) número de individuos analizados.

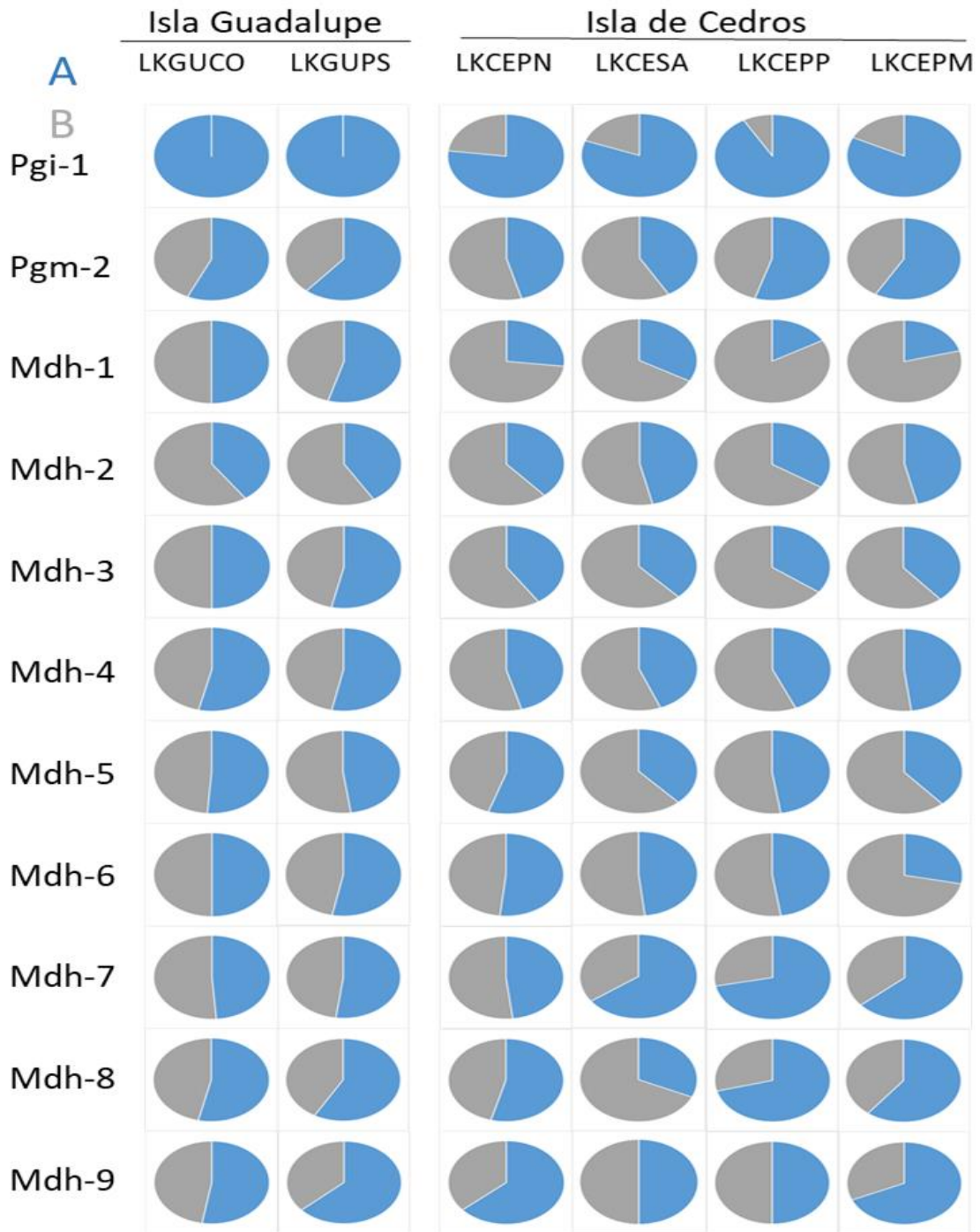


Figura 17. Representación esquemática de la variación alélica en 6 poblaciones de *Littorina keenae* en Isla Guadalupe y Cedros en el Pacífico mexicano. Para Isla de Guadalupe: LKGUCO (Campo Oeste) y LKGUPS (Punta Sur). Para isla de Cedros: LKCESA (San Agustín), LKCEPN (Punta Norte), LKCEPM (Punta Morro) y LKCEPP (Punta Prieta).

Con respecto a las frecuencias genotípicas, se observa un patrón de variación similar a las frecuencias alélicas, es decir, se encuentran diferencias evidentes entre Islas y similitudes dentro de islas ó entre localidades dentro de cada isla.

En el caso de Isla de Guadalupe, se observa en la figura 17 y tabla VII que existe una frecuencia mayor del genotipo AB para todos los loci. En el locus PGM-2 se observa una equidad entre las frecuencias de los tres genotipos (AA, AB y BB) para ambas localidades de Isla Guadalupe. LKGUCO presenta casi ausencia de genotipo AA y BB en el loci Mdh-6 y Mdh-7 y ausencia total de AA en Mdh-2, así como LKGUPS en Mdh-7. También se puede observar que para Mdh-8 y Mdh-9 casi es nula la presencia del genotipo BB.

Para Isla de Cedros se observa dominancia del genotipo AA en el locus Pgi-1 en las cuatro localidades, ausencia del genotipo AB en Mdh-9 de LKCESA y, por el contrario, ausencia del genotipo AA y BB en Mdh-9 para LKCEPP (tabla VII, figura 18). En la localidad LKCESA está ausente el genotipo AB para el locus Mdh-1 y ausencia por igual del genotipo AA en LKCEPP. En LKCEPM se pierde casi por completo el genotipo AA en Mdh-6 así como AB en LKCESA para Pgm-2. Una diferencia notable entre las localidades de Isla de Cedros es la dominancia del genotipo AA en LKCEPP para los loci Mdh-5, Mdh-6, Mdh-7 y Mdh-8.

Las similitudes que se observan entre islas son la dominancia del genotipo AB en Mdh-3, Mdh-4, Mdh-6 y Mdh-9 con excepción de LKCESA y las diferencias evidentes es la presencia de genotipo BB en Isla de Cedros y la casi ausencia del mismo en Guadalupe.

En general se pueden distinguir dos grupos de acuerdo a las Islas donde se obtuvieron las muestras: en la figura 18, principalmente en el locus Mdh-4 se puede observar, de acuerdo a los puntos donde se obtuvieron las muestras, como disminuye latitudinalmente la presencia del genotipo AB y aumentan los genotipos AA Y BB hacia zonas más australes.

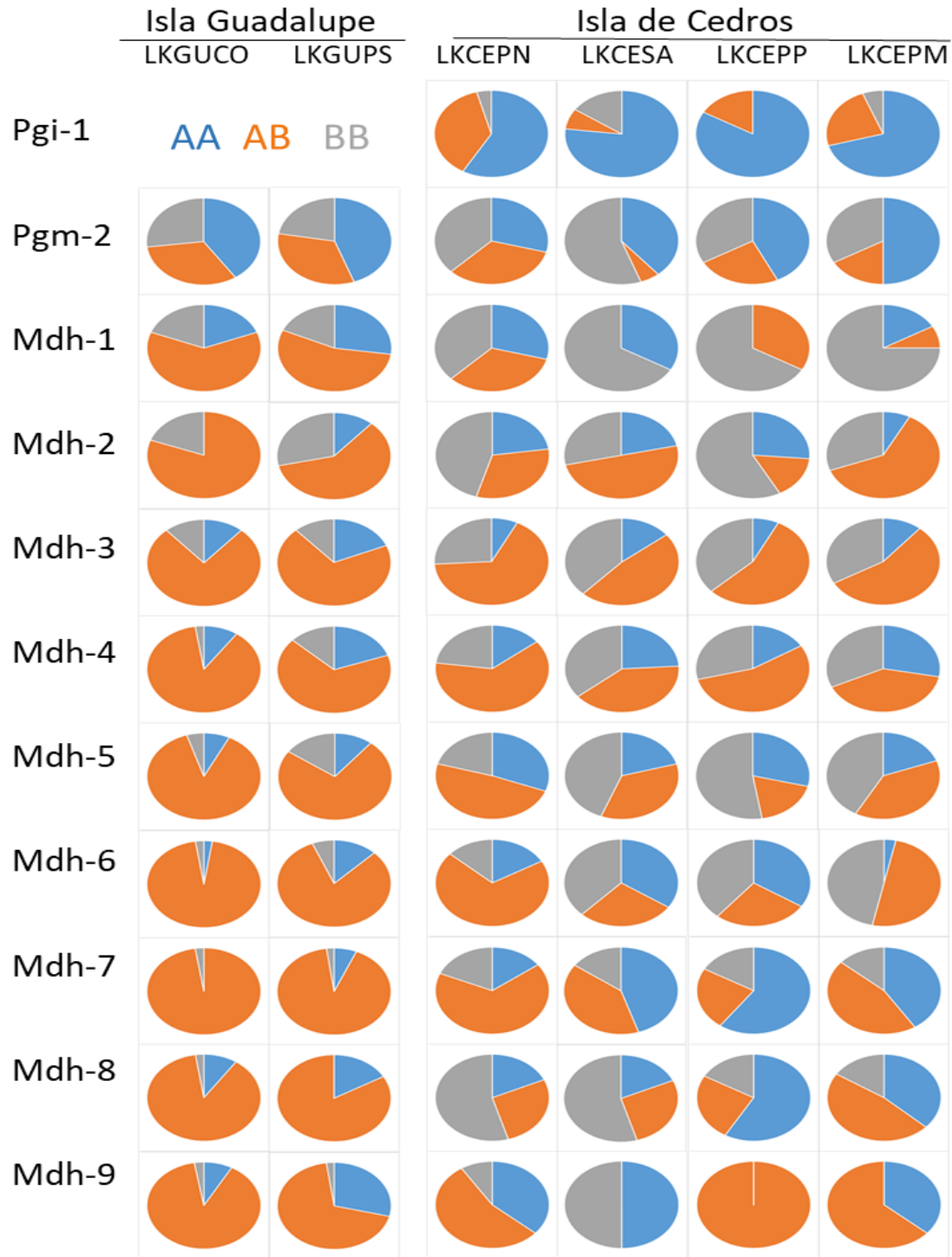


Figura 18. Representación esquemática de la variación genotípica en 6 poblaciones de *Littorina keenae* en Isla Guadalupe y de Cedros en el Pacífico mexicano. Genotipos observados AA, AB y BB (tabla VII). Para Isla de Guadalupe: LKGUCO (Campo Oeste) y LKGUPS (Punta Sur). Para isla de Cedros: LKCESA (San Agustín), LKCEPN (Punta Norte), LKCEPM (Punta Morro) y LKCEPP (Punta Prieta).

Tabla VII. Variación genotípica en 11 loci de 6 poblaciones de *Littorina keenae* en Isla Guadalupe y de Cedros en el Pacífico mexicano.

LOCUS	GENOTIPO	Isla Guadalupe			Isla de Cedros		
		LKGUCO	LKGUPS	LKCEPN	LKCESA	LKCEPP	LKCEPM
Pgm-1	(n)	50	50	24	13	12	17
	AA			14	10	10	12
				(14.17)	(8.4)	(10.043)	(11.455)
	AB			9	1	2	4
				(8.66)	(4.2)	(1.913)	(5.091)
	BB			1	2	0	1
				(1.17)	(0.4)	(0.043)	(0.455)
	X ²			0.04	9.143	0.048	0.914
			(1)	(1)	(1)	(1)	
D			0.039	-0.762	0.045	-0.214	
P			0.841	0.002	0.827	0.339	
			NS	**	NS	NS	
Pgi-2	(n)	37	36	24	18	21	6
	AA	15	16	7	7	9	3
		(11.795)	(13.324)	(4.915)	(3)	(6.171)	(1.909)
	AB	12	12	8	1	5	1
		(18.411)	(17.352)	(12.17)	(9)	(10.659)	(3.182)
	BB	10	8	9	10	7	2
		(6.795)	(5.324)	(6.915)	(6)	(4.171)	(0.909)
	X ²	4.616	3.533	2.942	15.111	6.221	3.429
	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	
D	-0.348	-0.308	-0.343	-0.889	-0.531	-0.686	
P	0.032	0.06	0.086	0	0.013	0.064	
	NS	NS	NS	***	*	NS	
Mdh-1	(n)	21	22	13	6	6	12
	AA	4	6	7	2	0	2
		(5.122)	(6.419)	(4.915)	(0.545)	(0.091)	(0.435)
	AB	13	12	8	0	2	1
		(10.756)	(11.163)	(12.17)	(2.909)	(1.818)	(4.13)
	BB	4	4	9	4	4	9
		(5.122)	(4.419)	(6.915)	(2.545)	(4.091)	(7.435)
	X ²	0.96	0.13	0.053	7.619	0.111	8.337
	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	
D	0.209	0.075	-0.06	-1	0.1	-0.758	
P	0.327	0.719	0.817	0.006	0.739	0.004	
	NS	NS	NS	**	NS	**	
Mdh-2	(n)	31	35	22	14	19	13
	AA	0	4	5	3	5	1
		(4.918)	(5.884)	(3.163)	(2.889)	(2.108)	(1.8)
	AB	25	21	7	7	3	8
		(15.164)	(17.232)	(10.674)	(7.222)	(8.784)	(6.4)
	BB	6	10	10	4	11	4
		(10.918)	(11.884)	(8.163)	(3.889)	(8.108)	(4.8)
	X ²	13.514	1.726	2.746	0.014	8.807	0.889
	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	
D	0.649	0.219	-0.344	-0.031	-0.658	0.25	
P	0	0.189	0.098	0.905	0.003	0.346	
	***	NS	NS	NS	**	NS	

N: número de individuos analizados; X² valor de la prueba Ji-cuadrada (entre paréntesis grados de libertad), He: heterocigotos esperados por estimación sin sesgo de Nei (1978), Ho: heterocigotos observados por conteo directo, D: deficiencia (-) o exceso (+) de heterocigotos, P: probabilidad, Nivel de significancia después de la corrección secuencial de Boferroni: *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, NS: No Significativo.

Continuación de tabla VII.

LOCUS	GENOTIPO	Isla Guadalupe			Isla de Cedros		
		LKGUCO	LKGUPS	LKCEPN	LKCESA	LKCEPP	LKCEPM
Mdh-3	(n)	35	43	27	21	27	18
	AA	4	8	2	3	2	2
		(8.623)	(12.176)	(4.358)	(2.927)	(3.226)	(2.6)
	AB	27	30	18	10	15	10
		(17.754)	(21.647)	(13.283)	(10.146)	(12.547)	(8.8)
	BB	4	5	7	8	10	6
		(8.623)	(9.176)	(9.358)	(7.927)	(11.226)	(6.6)
	X ²	9.773	6.556	3.546	0.005	1.08	0.357
	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	
D	0.521	0.386	0.355	-0.014	0.195	0.136	
P	0.002	0.01	0.06	0.946	0.299	0.55	
	**	*	NS	NS	NS	NS	
Mdh-4	(n)	41	46	35	25	31	25
	AA	4	9	5	6	5	7
		(11.679)	(12.923)	(7.188)	(4.714)	(5.754)	(5.633)
	AB	36	31	22	10	17	10
		(20.642)	(23.154)	(17.623)	(12.571)	(15.492)	(12.735)
	BB	1	6	8	9	9	8
		(8.679)	(9.923)	(10.188)	(7.714)	(9.754)	(6.633)
	X ²	23.27	5.401	2.223	1.091	0.304	1.201
	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	
D	0.744	0.339	0.248	-0.205	0.097	-0.215	
P	0	0.02	0.136	0.296	0.581	0.273	
	***	*	NS	NS	NS	NS	
Mdh-5	(n)	41	46	39	34	38	31
	AA	3	5	12	7	11	6
		(10.63)	(10.396)	(11.727)	(4.851)	(5.413)	(4.525)
	AB	36	34	19	12	7	12
		(20.741)	(23.209)	(19.545)	(16.299)	(18.173)	(14.951)
	BB	2	7	8	15	20	13
		(9.63)	(12.396)	(7.727)	(12.851)	(14.413)	(11.525)
	X ²	22.748	10.167	0.031	2.445	14.801	1.252
	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	
D	0.736	0.465	-0.028	-0.264	-0.615	-0.197	
P	0	0.001	0.86	0.118	0	0.263	
	***	**	NS	NS	***	NS	
Mdh-6	(n)	42	48	30	29	41	30
	AA	1	6	5	10	14	1
		(10.373)	(13.421)	(7.881)	(6.632)	(9.148)	(2.305)
	AB	40	39	21	8	11	15
		(21.253)	(24.158)	(15.237)	(14.737)	(20.704)	(12.39)
	BB	1	3	4	11	16	14
		(10.373)	(10.421)	(6.881)	(7.632)	(11.148)	(15.305)
	X ²	33.476	18.507	4.439	6.77	9.233	1.4
	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	
D	0.882	0.614	0.378	-0.457	-0.469	0.211	
P	0	0	0.035	0.012	0.002	0.237	
	***	***	NS	*	**	NS	

N: número de individuos analizados; X² valor de la prueba Ji-cuadrada (entre paréntesis grados de libertad), He: heterocigotos esperados por estimación sin sesgo de Nei (1978), Ho: heterocigotos observados por conteo directo, D: deficiencia (-) o exceso (+) de heterocigotos, P: probabilidad, Nivel de significancia después de la corrección secuencial de Boferroni: *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, NS: No Significativo.

Continuación de tabla VII.

LOCUS	GENOTIPO	Isla Guadalupe			Isla de Cedros		
		LKGUCO	LKGUPS	LKCEPN	LKCESA	LKCEPP	LKCEPM
Mdh-7	(n)	41	47	27	20	30	22
	AA	0 (9.63)	3 (12.645)	4 (6.132)	9 (8.333)	18 (15.305)	9 (8.791)
	AB	40 (20.741)	43 (23.71)	18 (13.736)	8 (9.333)	7 (12.39)	10 (10.419)
	BB	1 (10.63)	1 (10.645)	5 (7.132)	3 (2.333)	5 (2.305)	3 (2.791)
	X ²	36.237 (1)	31.791 (1)	2.702 (1)	0.434 (1)	5.97 (1)	0.038 (1)
	D	0.929	0.814	0.31	-0.143	-0.435	-0.04
	P	0 ***	0 ***	0.1 NS	0.51 NS	0.015 *	0.846 NS
	Mdh-8	(n)	42	48	24	11	12
AA	4 (11.928)	8 (16.211)	8 (6.915)	2 (1)	7 (5.913)	7 (6.838)	
AB	37 (21.145)	40 (23.579)	10 (12.17)	3 (5)	3 (5.174)	9 (9.324)	
BB	1 (8.928)	0 (8.211)	6 (4.915)	6 (5)	2 (0.913)	3 (2.838)	
X ²	24.198 (1)	23.805 (1)	0.797 (1)	2 (1)	2.407 (1)	0.024 (1)	
D	0.75	0.696	-0.178	-0.4	-0.42	-0.035	
P	0 ***	0 ***	0.472 NS	0.157 NS	0.121 NS	0.876 NS	
Mdh-9	(n)	37	45	11	6	6	11
	AA	3 (10.151)	13 (17.933)	4 (4.333)	3 (1.364)	0 (1.464)	4 (5)
	AB	33 (18.699)	31 (21.135)	6 (5.333)	0 (3.273)	6 (3.273)	7 (5)
	BB	1 (8.151)	1 (5.933)	1 (1.333)	3 (1.364)	0 (1.364)	0 (1)
	X ²	22.249 (1)	10.063 (1)	0.192 (1)	7.2 (1)	5 (1)	2 (1)
	D	0.765	0.467	0.125	-1	0.833	0.4
	P	0 ***	0.002 **	0.661 NS	0.007 **	0.025 NS	0.157 NS
	# organismos (sd)		38 (2.2)	42 (2.5)	25.1 (2.5)	17.9 (2.7)	22.1 (3.7)
Ho (sd)		0.725 (0.091)	0.622 (0.078)	0.502 (0.044)	0.255 (0.057)	0.358 (0.077)	0.41 (0.054)
He (sd)		0.458 (0.046)	0.451 (0.045)	0.479 (0.015)	0.479 (0.017)	0.434 (0.034)	0.453 (0.022)

N: número de individuos analizados, # organismos: número en promedio de organismos analizados, X²: valor de la prueba Ji-cuadrada (entre paréntesis grados de libertad), He: heterocigotos esperados por estimación sin sesgo de Nei (1978), Ho: heterocigotos observados por conteo directo, D: deficiencia (-) o exceso (+) de heterocigotos, P: probabilidad, Nivel de significancia después de la corrección secuencial de Boferroni: *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, NS: No Significativo.

Para las poblaciones de Isla de Cedros, en el locus Pgm-1, se observó en LKCEPN y LKCEPP valores de heterocigosis observada (9 y 2 respectivamente) mayores a los esperados (8.66 y 1.91 respectivamente) bajo el equilibrio de HW, así como valores menores observados en LKCESA (H_o 1, H_e 4.2) y LKCEPM (H_o 4, H_e 5) (tabla VII). De los valores del estadístico D es posible señalar que las poblaciones de LKCEPN y LKCEPP presentaron exceso de heterocigotos (0.039 y 0.045 respectivamente) y de esta manera LKCESA al igual que LKCEPM deficiencia de heterocigotos (-0.76 y -0.21 respectivamente). Sin embargo, la prueba de bondad de ajuste ji-cuadrada reveló diferencias significativas ($P < 0,01$) en los organismos de LKCESA, lo cual sugiere que la deficiencia de heterocigotos en dicha población si es estadísticamente significativa.

En las dos localidades de Isla Guadalupe y en las 4 localidades de la Isla de Cedros se observaron valores de heterocigosis menores a los esperados para el locus Pgi-2. Los valores del estadístico D son negativos para todas las poblaciones, pero de acuerdo a la prueba de ji-cuadrada sólo se tiene una deficiencia de heterocigosis estadísticamente significativa en LKCESA ($P < 0.001$) y LKCEPP ($P < 0,05$). (Tabla VII).

En las dos poblaciones de Isla de Guadalupe y LKCEPP para Cedros, los valores observados en el locus Mdh-1 de acuerdo al estadístico D son positivos, pero presentan diferencias estadísticamente significativas en LKCESA y LKCEPM ($P < 0.01$). En las poblaciones de Isla de Cedros en Mdh-2 la heterocigosis observada fue menor y mayor en las localidades de Isla de Guadalupe; sin embargo, solo se tiene exceso significativo de heterocigotos en LKGUCO ($P < 0.001$) y deficiencia de heterocigotos en LKCEPP ($P < 0.01$) (tabla VII; figura 18).

De acuerdo al modelo de H-W, los organismos provenientes de las localidades de Isla de Guadalupe presentan en Mdh-3, Mdh-4, Mdh-5, Mdh-6, Mdh-7, Mdh-8 y Mdh-9, exceso estadísticamente significativo de heterocigotos (tabla VII).

Para el caso de la población de San Agustín, en Isla de Cedros (LKCESA) se observa en Mdh-3, Mdh-4, Mdh-5, Mdh-6, Mdh-7, Mdh-8 y Mdh-9, exceso de homocigotos reflejado en los valores negativos del estadístico D, aunque ésta deficiencia de heterocigotos solo es estadísticamente significativa en Mdh-6 y Mdh-9. Un patrón similar se observa en la localidad de Punta Prieta en Isla de Cedros (LKCEPP) presenta deficiencia de heterocigotos en los loci Mdh-5, Mdh-6, Mdh-7 y Mdh-8, aunque estas deficiencias solo son significativas de acuerdo a la prueba de bondad de Ji-cuadrada en Mdh-5, Mdh-6, Mdh-7 (tabla VII; figura 18).

En relación a los valores de heterocigosis observada y esperada para Isla Guadalupe, los valores oscilan de $H_o = 0.622$ y $H_e = 0.451$ para Punta Sur y de $H_o = 0.725$ y $H_e = 0.456$ para Campo Oeste. Para ambas localidades a H_o es mayor que la esperada y de acuerdo al modelo de H-W se observa un exceso de heterocigosis. Para el caso de Isla de Cedros, la población de Punta Norte presentó el valor más alto de $H_o = 0.502$, $H_e = 0.479$ y la población de San Agustín registró $H_o = 0.255$ y $H_e = 0.479$. De las cuatro poblaciones, únicamente Punta Norte presentó un exceso de H_o de acuerdo al equilibrio de H-W.

Por otro lado, los valores obtenidos en este trabajo para las 6 poblaciones de *Littorina keenae* en Isla de Cedros e Isla de Guadalupe y divididos por isla son relativamente altos comparados con trabajos que se han realizado en Littorinidos con anterioridad por Bearmore y Morris 1979, Ward y Janson 1985 y Correa-Sandoval 1994 como se muestra a continuación en la tabla VIII.

Tabla VIII. Comparación de la variabilidad genética entre diversas especies de *Littorina* en estudios realizados con anterioridad. ⁽¹⁾Bearmore y Morris 1979, ⁽²⁾Ward y Janson 1985 y ⁽³⁾Correa-Sandoval 1994.

ESPECIE	# Poblaciones	# de Loci	Prom. Alelos	Ho	He
⁽¹⁾ <i>L. littorea</i>	9	10	---	0.117	0.127
⁽¹⁾ <i>L. nigrolineata</i>	3	10	---	0.080	0.091
⁽¹⁾ <i>L. rudis</i>	9	10	---	0.209	0.244
⁽²⁾ <i>L. arcana</i>	4	7	2.1	0.219	0.253
⁽²⁾ <i>L. saxatilis</i>	5	7	2.3	0.339	0.361
⁽³⁾ <i>L. keenae</i>	2	10	1.4	0.015	0.099
⁽³⁾ <i>L. scutulata</i>	2	10	1.2	0.002	0.017
<i>L. keenae</i> , Isla Guadalupe.	2	11	2	0.633	0.454
<i>L. keenae</i> , Isla Cedros.	4	11	2	0.381	0.461

Estos valores de Ho y He siguen siendo altos al compararlos con otras especies de gasterópodos marinos como *Astraea undosa*, los cuales de acuerdo a estudios realizados por Fernandez-Apango en 1992 donde obtuvieron valores de 0.128 y 0.164 respectivamente, para *Crepidula onyx* valores de 0.106 y 0.195, respectivamente (Woodrof, 1986), *Patella vulgata* con 0.122 y 0.128, respectivamente (Wilkins, 1977) y *P. aspera* con 0.177 y 0.368, respectivamente (Wilkins *op. Cit.*).

Valores de heterocigosis altos ya han sido reportados con anterioridad por Andrade S.C. y otros en el 2002 en un estudio que desarrolló en tres especies de *Littorinidos* en Brasil, donde identificaron la estructura y flujo genético entre poblaciones, así como los mecanismos de desarrollo de cada uno, obteniendo así valores de He desde 0.021 hasta 0.059 en *Littoraria flava*.

La heterocigosis también es una estimación, la cual se consideraría más precisa, ya que esta refleja el grado de diversidad génica entre los loci analizados sin embargo su valor también puede variar sustancialmente cuando se analizan diferentes sistemas enzimáticos (Dobzhansky et al, *op. Cit.*).

En el caso del presente estudio, los porcentajes de polimorfismo fueron altos, así como los valores de heterocigosis, pero estos resultados y los de otros estudios se podrían ver sesgados por los sistemas que se elijan al azar para ser analizados.

Los valores del estadígrafo D (Nei 1978) fueron siempre positivos para todos los loci de las poblaciones de Isla Guadalupe, lo cual indica que las diferencias se deben a exceso de heterocigotos, mientras que en Isla de Cedros solo algunos valores fueron negativos, pero no significativos (tabla VII).

Con el fin de explicar el exceso en la porción de individuos que poseen más de un alelo por locus en una población (heterocigotos), es necesario tener en cuenta algunas consideraciones. La composición y variabilidad genética de las poblaciones es determinada por múltiples factores como: la selección natural, las mutaciones, la deriva y el flujo génico (Ayala y Kiger, 1984).

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 heterocigotos. La heterocigosis no solo 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).

5.2.2 Diferenciación poblacional.

Las comparaciones de la variación alélica a nivel interpoblacional por locus, por isla, se muestran en la Tabla IX (incisos a - k) y las comparaciones de variación alélica interpoblacional con base en los 11 loci se presentan en la tabla X (inciso l).

En el locus Pgm-1 se encuentran diferencias significativas en la variación alélica entre los organismos de Isla de Guadalupe y los de Isla de Cedros, pero no se observan diferencias entre organismos de la misma Isla. En caso de los loci Pgi-2, Mdh-2, Mdh-4 y Mdh-9 no se encontraron diferencias significativas entre localidades entre y dentro de las islas (tabla IX incisos b, d, f y k). Para el caso del locus Mdh-1 se observó diferenciación significativa entre LKGUCO y LKCEPM, así como entre LKGUPS y tres localidades de Isla de Cedros: LKCEPN, LKCEPP y LKCEPM (tabla IX inciso c). En Mdh-3 sólo se encontró diferencia significativa entre LKGUPS y LKCEPP. La localidad de Isla de Cedros (LKCEPN), mostró diferencias con dos localidades de la misma Isla: LKCESA y LKCEPP para el locus Mdh-5.

Los organismos de Punta Morro, en Isla de Cedros (LKCEPM), presentaron características interesantes ya que en el locus Mdh-6 se diferenció de todas las localidades de la misma isla y de las provenientes de Isla de Guadalupe (tabla IX inciso h). Las tres localidades más septentrionales (LKGUCO, LKGUPS y LKCEPN) mostraron diferencias significativas con la población más austral LKCEPP en el locus Mdh-7 así como en Mdh-8 se diferenciaron LKGUPS y LKCEPP de LKCESA.

Con base en los 11 loci, la comparación de frecuencias alélicas interpoblacionales mostró diferencias significativas entre las dos localidades de Isla de Guadalupe e Isla de Cedros, pero no así entre las 4 poblaciones de la misma isla, ya sea entre las dos poblaciones de Guadalupe ni entre las cuatro poblaciones de Cedros, siendo las diferencias más significativas ($P < 0.001$) entre LKGUCO con LKCEPN y LKGUPS y LKCEPM (tabla IX inciso l).

En lo referente a la variación genotípica por pares de poblaciones por locus, los datos se muestran en la tabla X (incisos a – k). Con base en los once loci, la variación de las frecuencias genotípicas interpoblacionales se presentan en la tabla IX (inciso l). Los resultados que se obtuvieron son similares a los de las

frecuencias alélicas excepto en la comparación de la variación genotípica de todos los loci donde se demostró diferencias muy significativas ($P < 0.001$) entre el grupo de isla Guadalupe (LKGUCO y LKGUPS) con las tres localidades de Cedros (LKCEPN, LKCEPP y LKCEPM) y significativas ($P < 0.01$) con LKCESA.

El valor de F_{IS} en promedio de todos los loci para Isla de Guadalupe fue de -0.502, $F_{IT} = -0.0495$ y $F_{ST} = 0.002$. Estos valores concuerdan con los obtenidos en la comparación de variaciones alélicas y fenotípicas por pares de poblaciones por el método de cadena de Markov (Tabla IX) donde se observa que no existen diferencias significativas entre las poblaciones de Isla de Guadalupe.

Para el caso de Isla de Cedros se obtuvieron los siguientes resultados: $F_{IS} = 0.146$, $F_{IT} = 0.167$ y $F_{ST} = 0.0125$ en promedio de todos los loci. Estos resultados concuerdan con los valores de variaciones alélicas y fenotípicas por pares de poblaciones por el método de Markov (tabla IX) donde, de igual manera que en Isla de Guadalupe, se observa que no existen diferencias significativas entre los organismos de las cuatro poblaciones de Isla de Cedros.

Tabla IX. Comparación interpoblacional por pares de poblaciones por locus de la variación alélica por Método de cadena de Markov. Valores *P* debajo de la diagonal y nivel de significancia arriba de la diagonal. a) Pgm-1, b) Pgi-2, c) Mdh-1, d) Mdh-2, e) Mdh-3, f) Mdh-4. Abreviaciones: Para Isla de Guadalupe: LKGUCO (Campo Oeste) y LKGUPS (Punta Sur). Para isla de Cedros: LKCESA (San Agustín), LKCEPN (Punta Norte), LKCEPM (Punta Morro) y LKCEPP (Punta Prieta). Nivel de Significancia: NS = No Significativo, **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001.

a)		I. de Guadalupe					I. de Cedros						
Pgm-1	LKGUCO	LKGUPS	LKCEPN	LKCESA	LKCEPP	LKCEPM	Pgi-2	LKGUCO	LKGUPS	LKCEPN	LKCESA	LKCEPP	LKCEPM
LKGUCO	—	NS	***	***	*	***	LKGUCO	—	NS	NS	NS	NS	NS
LKGUPS	1	—	***	***	*	***	LKGUPS	0.6114	—	NS	NS	NS	NS
LKCEPN	0	0	—	NS	NS	NS	LKCEPN	0.2692	1	—	NS	NS	NS
LKCESA	0.00028	0.00025	0.77616	—	NS	NS	LKCESA	0.1604	0.0628	0.8222	—	NS	NS
LKCEPP	0.03505	0.03521	0.1905	0.4226	—	NS	LKCEPP	0.8448	0.5339	0.5252	0.2671	—	NS
LKCEPM	0.00017	0.00022	0.5986	1	0.4484	—	LKCEPM	1	1	0.5277	0.5066	1	—

c)		I. de Guadalupe					I. de Cedros						
Mdh-1	LKGUCO	LKGUPS	LKCEPN	LKCESA	LKCEPP	LKCEPM	Mdh-2	LKGUCO	LKGUPS	LKCEPN	LKCESA	LKCEPP	LKCEPM
LKGUCO	—	NS	NS	NS	NS	*	LKGUCO	—	NS	NS	NS	NS	NS
LKGUPS	0.8321	—	*	NS	*	*	LKGUPS	1	—	NS	NS	NS	NS
LKCEPN	0.0762	0.0281	—	NS	NS	NS	LKCEPN	1	0.8476	—	NS	NS	NS
LKCESA	0.3503	0.33	0.7132	—	NS	NS	LKCESA	0.6432	0.8227	0.6304	—	NS	NS
LKCEPP	0.0523	0.0251	0.6911	0.6421	—	NS	LKCEPP	0.6734	0.5397	0.8199	0.4455	—	NS
LKCEPM	0.0217	0.0101	0.745	0.6828	1	—	LKCEPM	1	0.8165	1	0.5896	0.7941	—

e)		I. de Guadalupe					I. de Cedros						
Mdh-3	LKGUCO	LKGUPS	LKCEPN	LKCESA	LKCEPP	LKCEPM	Mdh-4	LKGUCO	LKGUPS	LKCEPN	LKCESA	LKCEPP	LKCEPM
LKGUCO	—	NS	NS	NS	NS	NS	LKGUCO	—	NS	NS	NS	NS	NS
LKGUPS	0.7463	—	NS	NS	*	NS	LKGUPS	1	—	NS	NS	NS	NS
LKCEPN	0.3688	0.1647	—	NS	NS	NS	LKCEPN	0.143	0.429	—	NS	NS	NS
LKCESA	0.2441	0.1298	0.8404	—	NS	NS	LKCESA	0.4712	0.3821	0.8561	—	NS	NS
LKCEPP	0.1097	0.0387	0.6897	0.8328	—	NS	LKCEPP	0.2344	0.2438	0.8601	1	—	NS
LKCEPM	0.3095	0.1656	1	1	0.8256	—	LKCEPM	0.5955	0.5942	0.8507	0.8434	0.7001	—

Continuación **Tabla IX**. Comparación interpoblacional por pares de poblaciones por locus de la variación alélica por Método de cadena de Markov. Valores *P* debajo de la diagonal y nivel de significancia arriba de la diagonal. g) Mdh-5, h) Mdh-6, i) Mdh-7, j) Mdh-8, k) Mdh-9, l) Promedio de todos los Loci. Abreviaciones: Para Isla de Guadalupe: LKGUCO (Campo Oeste) y LKGUPS (Punta Sur). Para isla de Cedros: LKCESA (San Agustín), LKCEPN (Punta Norte), LKCEPM (Punta Morro) y LKCEPP (Punta Prieta). Nivel de Significancia: NS = No Significativo, **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001.

g)		I. Guadalupe					I. de Cedros						
Mdh-5	LKGUCO	LKGUPS	LKCEPN	LKCESA	LKCEPP	LKCEPM	Mdh-6	LKGUCO	LKGUPS	LKCEPN	LKCESA	LKCEPP	LKCEPM
LKGUCO	_____	NS	NS	NS	NS	NS	LKGUCO	_____	NS	NS	NS	NS	*
LKGUPS	0.7598	_____	NS	NS	NS	NS	LKGUPS	0.769	_____	NS	NS	NS	**
LKCEPN	0.6439	0.3642	_____	*	*	NS	LKCEPN	0.8652	0.8696	_____	NS	NS	*
LKCESA	0.1359	0.2501	0.0495	_____	NS	NS	LKCESA	0.8651	0.6172	0.8519	_____	NS	*
LKCEPP	0.1141	0.217	0.0376	1	_____	NS	LKCEPP	0.7545	0.5563	0.7362	1	_____	*
LKCEPM	0.1793	0.3142	0.0615	1	1	_____	LKCEPM	0.0107	0.0017	0.0141	0.0366	0.027	_____

i)		I. Guadalupe					I. de Cedros						
Mdh-7	LKGUCO	LKGUPS	LKCEPN	LKCESA	LKCEPP	LKCEPM	Mdh-8	LKGUCO	LKGUPS	LKCEPN	LKCESA	LKCEPP	LKCEPM
LKGUCO	_____	NS	NS	NS	*	NS	LKGUCO	_____	NS	NS	NS	NS	NS
LKGUPS	0.7614	_____	NS	NS	**	NS	LKGUPS	0.5536	_____	NS	*	NS	NS
LKCEPN	1	0.7342	_____	NS	*	NS	LKCEPN	1	0.7175	_____	NS	NS	NS
LKCESA	0.1212	0.187	0.1386	_____	NS	NS	LKCESA	0.0921	0.337	0.1167	_____	*	NS
LKCEPP	0.0097	0.0202	0.013	0.5113	_____	NS	LKCEPP	0.1634	0.3485	0.2081	0.0165	_____	NS
LKCEPM	0.1385	0.2682	0.1523	1	0.4096	_____	LKCEPM	0.5578	0.8475	0.6616	0.0616	0.0426	_____

k)		I. Guadalupe					I. de Cedros						
Mdh-9	LKGUCO	LKGUPS	LKCEPN	LKCESA	LKCEPP	LKCEPM	l) TODOS LOCI		I. de Cedros				
LKGUCO	_____	NS	NS	NS	NS	NS	LKGUCO	_____	NS	***	**	*	***
LKGUPS	0.2015	_____	NS	NS	NS	NS	LKGUPS	0.9922	_____	***	**	**	***
LKCEPN	0.4649	1	_____	NS	NS	NS	LKCEPN	0	0	_____	NS	NS	NS
LKCESA	1	0.5287	0.4897	_____	NS	NS	LKCESA	0.008	0.002	0.6354	_____	NS	NS
LKCEPP	1	0.5317	0.4858	1	_____	NS	LKCEPP	0.0147	0.0078	0.2031	0.7755	_____	NS
LKCEPM	0.2203	0.8054	1	0.4627	0.4652	_____	LKCEPM	0.0007	0.0006	0.4663	0.7495	0.8442	_____

Tabla X. Comparación interpoblacional por pares de poblaciones por locus de la variación genotípica por Método de cadena de Markov. Valores *P* debajo de la diagonal y nivel de significancia arriba de la diagonal. a) Pgm-1, b) Pgi-2, c) Mdh-1, d) Mdh-2, e) Mdh-3, f) Mdh-4. Abreviaciones: Para Isla de Guadalupe: LKGUCO (Campo Oeste) y LKGUPS (Punta Sur). Para isla de Cedros: LKCESA (San Agustín), LKCEPN (Punta Norte), LKCEPM (Punta Morro) y LKCEPP (Punta Prieta). Nivel de Significancia: NS = No Significativo, **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001.

a)		<i>I. Guadalupe</i>		<i>I. de Cedros</i>		
Pgm-1	LKGUCO	LKGUPS	LKCEPN	LKCESA	LKCEPP	LKCEPM
LKGUCO	_____	NS	***	**	*	***
LKGUPS	0	_____	***	**	*	NS
LKCEPN	0	0	_____	NS	NS	NS
LKCESA	0.0074	0.0065	0.8016	_____	NS	NS
LKCEPP	0.0342	0.0344	0.1904	0.525	_____	NS
LKCEPM	0.0005	0.0004	0.6049	1	0.4998	_____

b)		<i>I. Guadalupe</i>		<i>I. de Cedros</i>		
Pgi-2	LKGUCO	LKGUPS	LKCEPN	LKCESA	LKCEPP	LKCEPM
LKGUCO	_____	NS	NS	NS	NS	NS
LKGUPS	0.6578	_____	NS	NS	NS	NS
LKCEPN	0.3364	0.1958	_____	NS	NS	NS
LKCESA	0.2704	0.1356	0.859	_____	NS	NS
LKCEPP	0.8721	0.617	0.603	0.3945	_____	NS
LKCEPM	1	1	0.6052	0.634	1	_____

c)		<i>I. Guadalupe</i>		<i>I. de Cedros</i>		
Mdh-1	LKGUCO	LKGUPS	LKCEPN	LKCESA	LKCEPP	LKCEPM
LKGUCO	_____	NS	NS	NS	*	*
LKGUPS	0.8151	_____	*	NS	*	*
LKCEPN	0.065	0.0303	_____	NS	NS	NS
LKCESA	0.3675	0.3692	0.7553	_____	NS	NS
LKCEPP	0.0363	0.0237	0.701	0.6924	_____	NS
LKCEPM	0.03	0.0208	0.7866	0.8462	1	_____

d)		<i>I. Guadalupe</i>		<i>I. de Cedros</i>		
Mdh-2	LKGUCO	LKGUPS	LKCEPN	LKCESA	LKCEPP	LKCEPM
LKGUCO	_____	NS	NS	NS	NS	NS
LKGUPS	1	_____	NS	NS	NS	NS
LKCEPN	1	0.8456	_____	NS	NS	NS
LKCESA	0.5437	0.8058	0.6566	_____	NS	NS
LKCEPP	0.6392	0.5546	0.852	0.5274	_____	NS
LKCEPM	1	0.7962	1	0.5681	0.8179	_____

e)		<i>I. Guadalupe</i>		<i>I. de Cedros</i>		
Mdh-3	LKGUCO	LKGUPS	LKCEPN	LKCESA	LKCEPP	LKCEPM
LKGUCO	_____	NS	NS	NS	*	NS
LKGUPS	0.663	_____	NS	NS	*	NS
LKCEPN	0.2156	0.0795	_____	NS	NS	NS
LKCESA	0.1599	0.0807	0.8146	_____	NS	NS
LKCEPP	0.0396	0.0142	0.6418	0.8267	_____	NS
LKCEPM	0.1888	0.0998	1	1	0.8066	_____

f)		<i>I. Guadalupe</i>		<i>I. de Cedros</i>		
Mdh-4	LKGUCO	LKGUPS	LKCEPN	LKCESA	LKCEPP	LKCEPM
LKGUCO	_____	NS	NS	NS	NS	NS
LKGUPS	1	_____	NS	NS	NS	NS
LKCEPN	0.2398	0.338	_____	NS	NS	NS
LKCESA	0.2529	0.3441	0.8518	_____	NS	NS
LKCEPP	0.1121	0.1888	0.8464	1	_____	NS
LKCEPM	0.4918	0.5757	0.8513	0.8554	0.7127	_____

Continuación **Tabla X**. Comparación interpoblacional por pares de poblaciones por locus de la variación genotípica por Método de cadena de Markov. Valores *P* debajo de la diagonal y nivel de significancia arriba de la diagonal. g) Mdh-5, h) Mdh-6, i) Mdh-7, j) Mdh-8, k) Mdh-9, l) Promedio de todos los Loci. Abreviaciones: Para Isla de Guadalupe: LKGUCO (Campo Oeste) y LKGUPS (Punta Sur). Para isla de Cedros: LKCESA (San Agustín), LKCEPN (Punta Norte), LKCEPM (Punta Morro) y LKCEPP (Punta Prieta). Nivel de Significancia: NS = No Significativo, **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.00.

g) Mdh-5							h) Mdh-6						
Locus	I. Guadalupe		I. de Cedros				Locus	I. Guadalupe		I. de Cedros			
	LKGUCO	LKGUPS	LKCEPN	LKCESA	LKCEPP	LKCEPM		LKGUCO	LKGUPS	LKCEPN	LKCESA	LKCEPP	LKCEPM
LKGUCO	_____	NS	NS	NS	NS	NS	LKGUCO	_____	NS	NS	NS	NS	***
LKGUPS	0.6322	_____	NS	NS	NS	NS	LKGUPS	0.5504	_____	NS	NS	NS	***
LKCEPN	0.5582	0.297	_____	NS	NS	NS	LKCEPN	0.7718	0.8099	_____	NS	NS	**
LKCESA	0.0807	0.2141	0.0666	_____	NS	NS	LKCESA	0.8345	0.579	0.8542	_____	NS	*
LKCEPP	0.0927	0.2293	0.0698	1	_____	NS	LKCEPP	0.7287	0.5218	0.7482	1	_____	NS
LKCEPM	0.0941	0.271	0.079	1	1	_____	LKCEPM	0	0	0.0045	0.0528	0.0407	_____

i) Mdh-7							j) Mdh-8						
Locus	I. Guadalupe		I. de Cedros				Locus	I. Guadalupe		I. de Cedros			
	LKGUCO	LKGUPS	LKCEPN	LKCESA	LKCEPP	LKCEPM		LKGUCO	LKGUPS	LKCEPN	LKCESA	LKCEPP	LKCEPM
LKGUCO	_____	NS	NS	*	***	*	LKGUCO	_____	NS	NS	*	*	NS
LKGUPS	0.376	_____	NS	NS	**	NS	LKGUPS	0.2537	_____	NS	**	NS	NS
LKCEPN	1	0.568	_____	NS	*	NS	LKCEPN	1	0.6459	_____	NS	NS	NS
LKCESA	0.0137	0.0517	0.1176	_____	NS	NS	LKCESA	0.0151	0.0029	0.1698	_____	NS	NS
LKCEPP	0.0009	0.0037	0.0157	0.5632	_____	NS	LKCEPP	0.043	0.1769	0.2699	0.0514	_____	NS
LKCEPM	0.0162	0.0927	0.1247	1	0.4553	_____	LKCEPM	0.3954	0.7867	0.6838	0.0922	0.4696	_____

k) Mdh-9							k) TODOS LOCI						
Locus	I. Guadalupe		I. de Cedros				Locus	I. Guadalupe		I. de Cedros			
	LKGUCO	LKGUPS	LKCEPN	LKCESA	LKCEPP	LKCEPM		LKGUCO	LKGUPS	LKCEPN	LKCESA	LKCEPP	LKCEPM
LKGUCO	_____	NS	NS	NS	NS	*	LKGUCO	_____	NS	***	*	***	***
LKGUPS	0.0428	_____	NS	NS	NS	NS	LKGUPS	0.766	_____	***	**	***	***
LKCEPN	0.2176	1	_____	NS	NS	NS	LKCEPN	0	0	_____	NS	NS	NS
LKCESA	1	0.4561	0.549	_____	NS	NS	LKCESA	0.0031	0.0014	0.7273	_____	NS	NS
LKCEPP	1	0.3527	0.3745	1	_____	NS	LKCEPP	0.0004	0.0007	0.2798	0.9431	_____	NS
LKCEPM	0.0326	0.7352	1	0.5092	0.2336	_____	LKCEPM	0	0	0.3688	0.8753	0.8492	_____

El resumen de los estadísticos de F de Wright (F_{IS} , F_{IT} y F_{ST}) para los organismos de *Littorina keenae* en Isla de Guadalupe e Isla de Cedros se presentan en la tabla XI. El coeficiente de endogamia dentro de las poblaciones F_{IS} , indica que tres loci presentan una deficiencia de heterocigotos (*Pgm-1*, *Pgi-2* e *Idh-1*), y ocho loci presentan un exceso de heterocigotos (*Idh-2*, *Idh-3*, *Idh-4*, *Idh-5*, *Idh-6*, *Idh-7*, *Idh-8* e *Idh-9*). El índice F_{IS} total de los loci dio un valor de -0.071, indicando un exceso de heterocigocis. Los coeficientes de endogamia entre poblaciones (F_{IS}) y endogamia total (F_{IT}) mostraron correspondencia en todos los loci. La correlación de F_{IS} y F_{IT} en el promedio total es negativa en ambas (tabla XI) El coeficiente de fijación F_{ST} presentó valores cercanos a cero para todos los loci, lo cual indica que no existe estructuración significativa desde el punto de vista genética entre las cuatro poblaciones de Isla de Cedros y las dos poblaciones de Isla de Guadalupe, a diferencia de los resultados de Correa-Sandoval 1994, quien observó en dos poblaciones de *L. scutulata* un valor de $F_{ST} = 0.747$.

Tabla XI. Resumen de estadístico de F de Wright (F_{IS} , F_{IT} y F_{ST}) de seis poblaciones de *Littorina keenae* en Isla de Guadalupe e Isla de Cedros en el Pacífico mexicano.

Locus	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}
<i>Pgm-1</i>	0.229	0.293	0.083
<i>Pgi-2</i>	0.505	0.514	0.019
<i>Idh-1</i>	0.195	0.267	0.090
<i>Idh-2</i>	-0.048	-0.042	0.006
<i>Idh-3</i>	-0.291	-0.268	0.018
<i>Idh-4</i>	-0.186	-0.178	0.007
<i>Idh-5</i>	-0.040	-0.020	0.019
<i>Idh-6</i>	-0.209	-0.175	0.028
<i>Idh-7</i>	-0.292	-0.249	0.033
<i>Idh-8</i>	-0.115	-0.052	0.056
<i>Idh-9</i>	-0.316	-0.287	0.022
Todos Loci	-0.071	-0.037	0.031

5.2.3 Flujo genético y aislamiento por distancia.

Los valores de identidad genética de Nei (1978) para las dos poblaciones de Isla de Guadalupe y las cuatro poblaciones de Isla de Cedros se presentan en la tabla XII. El valor más bajo de identidad la presentó LKGUPS y LKCEPP con 0.954, correspondiente al valor de distancia genética 0.047. El valor más alto de identidad asocia LKGUCO y LKGUPS con 0.996 que a su vez presentan el valor más bajo de distancia genética con 0.004.

Los organismos de las localidades de Isla de Cedros que presentan mayor identidad genética son LKCEPP y LKCEPM con un valor de 0.984, su distancia genética es de 0.017 (tabla XII), valores que concuerdan con el mayor número de migrantes dentro de la Isla con 22.4 organismos por generación y el menor número de F_{ST} para la isla con 0.011 (tabla XIII). Los altos valores de identidad genética y número de migrantes indican alto flujo genético entre los organismos de dichas poblaciones, lo cual se puede explicar por la influencia de la Corriente de California. Como se puede observar en la figura 21, el flujo de la Corriente de California es constante en dirección Norte a Sur desde el mes de abril hasta noviembre, invirtiendo la dirección, es decir, de sur a norte, en el mes de diciembre.

Organismos de San Agustín (LKCESA) y Punta Prieta (LKCEPP) fueron los que presentaron menor identidad genética: 0.963, la mayor distancia genética: 0.037 (tabla XII), el menor número de migrantes por generación: 10.62 y los valores de F_{ST} (0.023) más altos dentro de la Isla de Cedros (tabla XIII). Estos resultados se deben principalmente a la barrera física que podría representar la posición geográfica de San Agustín, ya que esta localidad se encuentra en la zona más Austral de la Isla y, además, se encuentra en una zona protegida del oleaje y con poco contacto con las corrientes de dirección norte a sur (fig. 21).

Tabla XII. Identidad genética (debajo de la diagonal) y distancia genética sin sesgo (arriba de la diagonal) de acuerdo a Nei (1978) entre organismos de seis localidades del Pacífico mexicano. Valores representados en escalas de grises de menor a mayor.

	<i>I. Guadalupe</i>		<i>I. de Cedros</i>			
	<i>LKGUCO</i>	<i>LKGUPS</i>	<i>LKCEPN</i>	<i>LKCESA</i>	<i>LKCEPP</i>	<i>LKCEPM</i>
<i>LKGUCO</i>	_____	0.004	0.025	0.035	0.042	0.410
<i>LKGUPS</i>	0.996	_____	0.031	0.046	0.0470	0.043
<i>LKCEPN</i>	0.975	0.969	_____	0.024	0.028	0.022
<i>LKCESA</i>	0.966	0.955	0.976	_____	0.037	0.035
<i>LKCEPP</i>	0.959	0.954	0.972	0.963	_____	0.017
<i>LKCEPM</i>	0.960	0.958	0.978	0.966	0.984	_____

Tabla XIII. Número de migrantes por generación (valores por arriba de la diagonal) y valores de F_{st} (debajo de la diagonal) por pares de localidades de organismos de *Littorina keenae*. Valores representados en escala de grises de menor a mayor.

	<i>I. Guadalupe</i>		<i>I. de Cedros</i>			
	<i>LKGUCO</i>	<i>LKGUPS</i>	<i>LKCEPN</i>	<i>LKCESA</i>	<i>LKCEPP</i>	<i>LKCEPM</i>
<i>LKGUCO</i>	_____	124.750	17.607	12.250	9.365	9.750
<i>LKGUPS</i>	0.002	_____	13.639	9.365	8.371	9.365
<i>LKCEPN</i>	0.014	0.018	_____	17.607	13.639	18.981
<i>LKCESA</i>	0.020	0.026	0.014	_____	10.620	11.655
<i>LKCEPP</i>	0.026	0.029	0.018	0.023	_____	22.477
<i>LKCEPM</i>	0.025	0.026	0.013	0.021	0.011	_____

Respecto al número de migrantes (N_m en tabla XIII), se obtuvo valores que van de 8.37 a 124.75 migrantes por generación, donde se observa un mayor número de migrantes entre las localidades de Isla de Guadalupe, *LKGUCO* y *LKGUPS* (124.75), y menor número entre *LKGUPS* y *LKCEPP* con 8.37 además de *LKGUPS* con *LKCESA* y *LKCEPM* así como *LKGUCO* con *LKCEPP* con 9.36 migrantes por generación.

La prueba de aislamiento por distancia de las poblaciones de *Littorina keenae* en las islas del Pacífico indicó que existe una relación positiva y significativa entre las variables F_{st} y la distancia geográfica ($R^2 = 0.355$, $P = 0.019$, fig. 19) y los valores de distancia geográfica y distancia genética de Nei (1978), ($R^2 = 0.404$, $P = 0.011$, fig. 20).

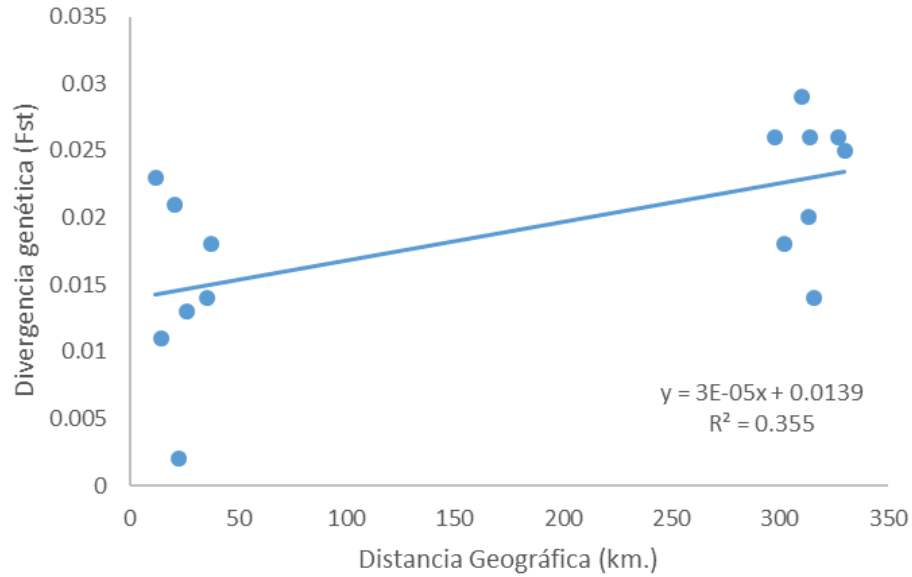


Figura 19. Relación entre divergencia genética (Fst) y distancia geográfica entre las poblaciones de *Littorina keenae* en el Pacífico mexicano. Prueba Mantel (10 000 permutaciones) $R^2 = 0.355$, $P = 0.019$.

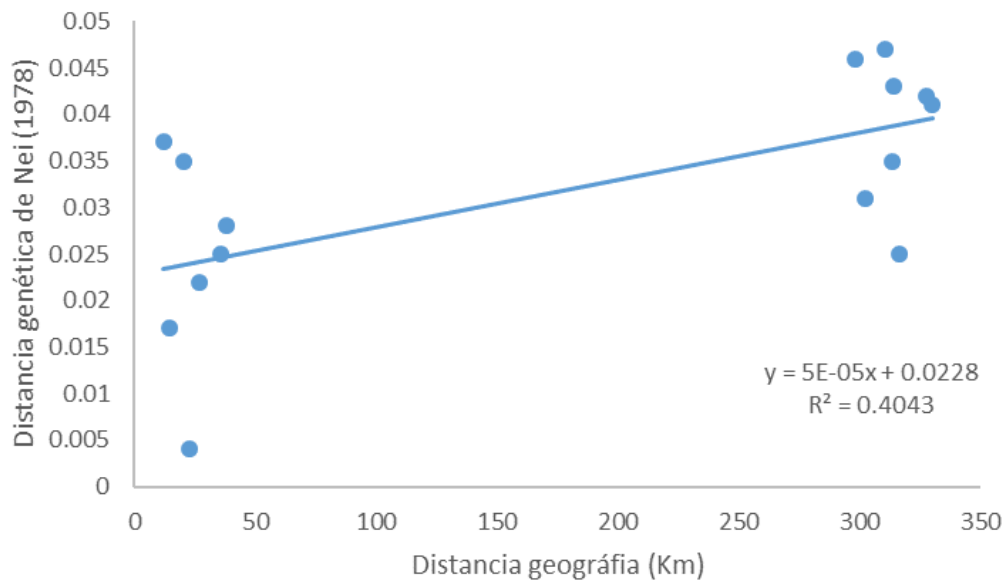


Figura 20. Relación entre distancia genética (Nei, 1978) y distancia geográfica entre las poblaciones de *Littorina keenae* en el Pacífico mexicano. Prueba Mantel (10 000 permutaciones) $R^2 = 0.40$, $P = 0.011$.

La relación encontrada entre la divergencia genética y la distancia geográfica, así como la distancia genética y la distancia geográfica indica que el flujo genético ocurre principalmente en las poblaciones más cercanas y disminuye considerablemente a las poblaciones más distantes debido a las formas o medidas de dispersión de Littorinidos. Estos organismos se dispersan por medio de capsulas que contienen cientos de huevos que, al pasar de 5 a 9 días eclosionan en una larva veliger que puede mantenerse en la columna de agua hasta por 60 días (Schmidt 1979). Lo anterior explica por lo general la relación directa entre distancia geográfica y divergencia genética, aun cuando las distancias genéticas y divergencias sean mínimas.

Este proceso de transporte de organismos responde principalmente a la influencia de las corrientes marinas, en este caso la Corriente de California que se desplaza de Norte a Sur como se indica en la figura 21.

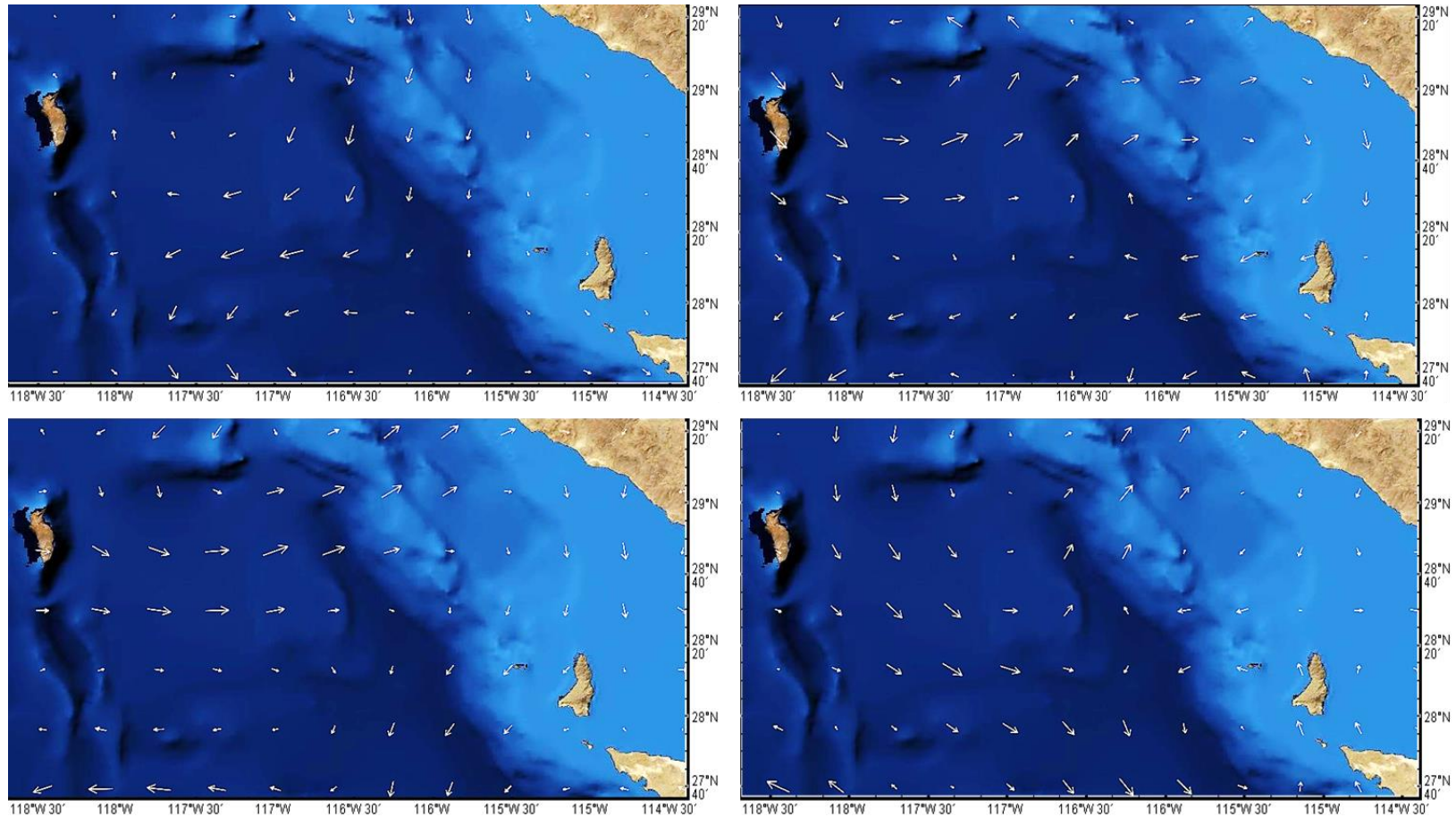


Figura 21. Patrón de circulación superficial de la Corriente de California. En el extremo superior izquierdo: Abril; extremo superior derecho: Julio; extremo Inferior izquierdo noviembre y extremo Inferior derecho: diciembre. (2017).

Fuente: [https://podaactools.jpl.nasa.gov/soto/#b=BlueMarble_ShadedRelief_Bathymetry&l=MODIS_Aqua_CorrectedReflectance_TrueColor\(la=true,lo=0\),oscar_l4_oc_third_deg__oceancurrent_dir_color\(la=true,lvc=white\),oscar_l4_oc_third_deg__oceancurrent_speed__1088_x_544__daynight\(lo=0.65\)&ve=-119.64311467509727,27.131559488949208,-113.64018498759727,29.715543863949208&pl=true&pb=false&d=2017-11-05&ao=true&as=2017-10-05&ae=2018-01-05&ass=1/month&afr=2000&tlr=months](https://podaactools.jpl.nasa.gov/soto/#b=BlueMarble_ShadedRelief_Bathymetry&l=MODIS_Aqua_CorrectedReflectance_TrueColor(la=true,lo=0),oscar_l4_oc_third_deg__oceancurrent_dir_color(la=true,lvc=white),oscar_l4_oc_third_deg__oceancurrent_speed__1088_x_544__daynight(lo=0.65)&ve=-119.64311467509727,27.131559488949208,-113.64018498759727,29.715543863949208&pl=true&pb=false&d=2017-11-05&ao=true&as=2017-10-05&ae=2018-01-05&ass=1/month&afr=2000&tlr=months)

6.- Discusión general

La variabilidad fenotípica en *Littorina* ha sido bien documentada (Gooch, 1975; Rafaelli, 1979; Correa-Sandoval 1992). La concha está influida por una gran cantidad de factores, como se ha señalado para *L. marinae* y *L. obtusata* (Murray, 1975). Esta variabilidad ha sido relacionada con factores ambientales (Struhsaker, 1968; Behrens, 1972; Janson, 1982; Correa-Sandoval, 1992) y geográficos (Vermeij, 1973; Chow, 1987). Se han encontrado considerables diferencias intraespecíficas a distancias tan cortas como 30 m (Janson y Sundberg, 1983), o por ejemplo, máximas mediciones de la concha en Littorinidos se registraron en su límite austral de distribución en el Pacífico mexicano (presente estudio) ver anexo 5.

El haber encontrado diferencias en tamaño promedio de las conchas de *Littorina keenae* entre las poblaciones analizadas para Isla de Guadalupe e Isla de Cedros podría indicar diferencias latitudinales y regionales. Específicamente se encontraron tamaños más grandes para las dos poblaciones de Isla de Guadalupe y la población más septentrional de Isla de Cedros lo cual posiblemente tenga una relación con uno de los patrones fundamentales de la biodiversidad biológica en el planeta, la diversidad del gradiente latitudinal (Willig, Kaufman, and Stevens 2003, Hillebrand 2004). La presencia del gradiente latitudinal en la riqueza taxonómica se encuentra claramente marcado en grupos como moluscos marinos, especialmente en el hemisferio norte (Fischer 1960; Roy, Jablonski, and Valentine 1994; Roy et al. 1998). Thorson en 1957 argumenta que especies principalmente marinas experimentan un declive en riqueza de áreas árticas hacia los trópicos.

Stevens (1989) argumentó que, para la mayoría de los organismos, el rango latitudinal promedio de la especie aumenta con la latitud, una tendencia que él denominó Regla de Rapoport, y usó esta observación empírica para proponer una nueva explicación del por qué existe la diversidad del gradiente latitudinal; las especies de bajas latitudes presentan una variación climática más estrecha en

comparación con sus contrapartes de altas latitudes, lo que le permite a más especies convivir en los trópicos. En otras palabras, las especies tropicales están adaptadas a un entorno con escasa o nula variación estacional, lo que les permite subdividir el hábitat en un mosaico de microhábitats distintivos, lo que a su vez permite la coexistencia de más especies denominado "efecto de masa" (Stevens 1989). En el caso de las especies de latitudes altas, estas han evolucionado con mayor tolerancia ambiental como respuesta a grandes fluctuaciones estacionales en la temperatura y otros parámetros ambientales, por lo que, no se experimenta el aumento de riqueza de especies y, por ende, no subdividen el hábitat donde se encuentran (Stevens 1989).

Bergmann en 1847, propuso la regla que actualmente lleva su nombre donde se postula que las subespecies o razas geográficas tienen mayor tamaño cuanto más baja sea la temperatura media del ambiente en que viven. Es una generalización que relaciona la temperatura ambiental con la morfología (Bergmann 1847).

De acuerdo con lo anterior, las diferencias encontradas entre las poblaciones de Isla de Cedros, pueden explicarse en función de las características del medio. Struhsaker, (1968) menciona que los principales factores que propician diferencias en el tamaño de la concha en Littorinidos posiblemente sean; la acción de las olas, la inmersión prolongada, la desecación, altas temperaturas y la salinidad extrema. A estos factores abióticos se le puede agregar la disponibilidad del alimento, los depredadores, los parásitos, la existencia de refugios, además de otros factores químicos en el medio.

Rolan-Alvarez (2015) hace una revisión de 71 trabajos sobre en temas sobre adaptación, de los cuales en 48 analizaron directamente o atribuyeron parcialmente sus resultados a la selección natural por depredadores como cangrejos y peces. En la gran mayoría de los estudios del Océano Atlántico Norte han considerado el cangrejo de orilla verde (*Carcinus maenas*) como un gran depredador de *Littorina spp*. La presión de selección más común era la masa de la

concha, la cual está altamente correlacionada con el peso de la concha seca o el grosor de la misma. Experimentos en laboratorio demostraron que los cangrejos generalmente prefieren presas de menor tamaño (Behrens *et al.*, 1998), con conchas más pequeñas y delgadas o, con grandes aperturas (Rochette *et al.*, 2007, Baldrige & Smith 2008). Estos resultados de laboratorio han sido respaldados por otros experimentos en el noroeste Atlántico (Perez *et al.*, 2009). Sin embargo, en experimentos controlados realizados en el Pacífico, específicamente en costas protegidas del oleaje, a menudo se ha demostrado una mayor mortalidad de organismos más grandes en comparación con los individuos más pequeños de las mismas poblaciones, esto generalmente se atribuye al forrajeo en el intermareal durante marea alta por peces (*Rhacochilus vacca*) (Behrens Yamada & Boulding 1996, Boulding *et al.* 1999).

El segundo agente de selección más común analizado directa o indirectamente en 10 de estos estudios fue el desalojo por las olas. Un estudio utilizó diferentes tamaños y formas promedio de la concha ante un evento de tormenta extrema y concluye que a partir de la selección se había favorecido formas de concha lo suficientemente angostas para caber en los refugios disponibles (Trussell 1997).

McQuaid (1996) revisó evidencias de la variación en la morfología de la concha entre poblaciones de Littorinidos y concluye que la variación observada se debe en gran parte a una base genética en especies de desarrollo directo (por ejemplo, *Littorina saxatilis*) pero mayoritariamente por efecto ambiental en especies con desarrollo larval de nado libre (por ejemplo, *L. littorea*).

Hollander *et al.* (2006) llevaron a cabo en Suecia un análisis morfométrico en el cual demostraron que dos ecotipos de *L. saxatilis* y juveniles de *L. littorea* agrupados en el mismo sitio presentan magnitudes similares de plasticidad cuando se expone a cuatro tratamientos diferentes en ambientes simulados, desde alta depredación hasta el choque de oleaje intenso; depredación del cangrejo costero,

competencia con otros caracoles, intenso movimiento de agua y un ambiente controlado.

Numerosos estudios han demostrado experimentalmente la plasticidad morfológica adaptativa en varias especies (Trussell 1997). Estos estudios los subdividieron en: 1) respuesta al impacto de olas o 2) plasticidad en respuesta a la presencia de cangrejos. El autor experimentó con *L. obtusata*, en un flujo de agua intenso por lo que los organismos desarrollaron un pie más grande, pero el aumento en el tamaño del pie fue proporcionalmente más grande para los organismos provenientes de una de costa protegida al oleaje que para aquellos que provenían de una costa expuesta (Trussell 1997). Ambos ecotipos de *L. obtusata* crecieron más rápido en las zonas de flujo bajo de agua, pero el ecotipo de *L. obtusata* de costa expuesta siempre creció más rápido que el de costa protegido contra olas. El crecimiento se midió en términos de un aumento en la longitud de la concha, masa de la concha o masa corporal (Trussell 2000). De esta manera se demostró que debido a que los ecotipos pueden mostrar diferentes grados de plasticidad fenotípica, la hipótesis de que la plasticidad es en sí misma adaptativa y está bajo control genético es discutible (Via & Lande 1985, Pigliucci 2005).

Estudios que vinculan la variación genética (causa) con el fenotipo (efecto) en el género *Littorina* son pocos, aunque este enlace es fundamental para la comprensión de los mecanismos evolutivos, especialmente aquellos cambios relacionados con la adaptación, aunque este tipo de investigación en *Littorina* todavía se considera en vías de desarrollo.

En este género en particular, los diversos estudios realizados hasta el momento han llegado a diferentes conclusiones al analizar la variabilidad genética. Algunos han encontrado una notable diferenciación geográfica inter e intraespecífica en las frecuencias alélicas de algunos loci (Berger, 1973, Correa-Sandoval, 1992). 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 y la implementación de nuevas técnicas de análisis solo se podrían caracterizar genéticamente de manera parcial algunas especies.

El primer método utilizado para determinar las bases moleculares de la adaptación se basó en la variabilidad alozímica, ya que está estrechamente relacionada con los productos genéticos y también puede afectar la concentración de metabolitos en cada célula (Watt 1994). En este contexto, Hull *et al.* (1999) encontraron que la actividad de las enzimas metabólicas (utilizando aspartato aminotransferasa, AAT y alanina aminotransferasa, ALAT) y la resistencia al estrés por calor eran más altas en el supramareal que en el inframareal en especies de Littorínidos. Del mismo modo, Sokolova y Pörtner (2001) estudiaron los patrones de actividad alozímica en cinco loci a través de todos los niveles de la costa y ubicaciones geográficas en *Littorina saxatilis*, encontrando que las subpoblaciones, que típicamente experimentan temperaturas más bajas, tienen enzimas con actividades superiores que aquellas subpoblaciones ubicadas más arriba del intermareal.

Panova & Johannesson (2004), demostraron que en la parte baja de la costa los genotipos homocigotos tenían una mayor actividad enzimática que genotipos homocigotos en la parte alta de la costa. y que el genotipo heterocigotos tuvo actividad intermedia. Un enfoque similar fue seguido por Galindo *et al.* (2009), quien detectó un patrón selectivo en un locus (Pgm-2, fosfoglucomutasa 2) de seis loci polimórficos en la misma especie de *Littorina saxatilis*. Conclusiones similares se tuvieron después de examinar los patrones de variación geográficos en varios marcadores moleculares en el genoma de *Littorina fabalis* (Johannesson & Mikhailova 2004). Un locus (Ark) de 29 loci alozimáticos mostraron una clina relacionada con el tamaño y la exposición a las olas en esta especie.

Por otro lado, estudiar la respuesta metabólica y la expresión genética de organismos a través de gradientes abióticos también ha mostrados resultados

importantes. Uno de los casos más estudiados ha sido la respuesta metabólica en Littorinidos a la exposición a desecación y anoxia. Los niveles internos de oxígeno varían considerablemente en los organismos intermareales; por lo tanto, cada especie debe equilibrar su consumo de adenosin trifosfato (ATP) y las tasas de producción. Por ejemplo, durante la inmersión cuando el oxígeno se vuelve limitado, hay un cambio a catabolismo de hidratos de carbono a través del glucólisis, que es menos productivo que el catabolismo aeróbico. Este cambio metabólico requiere más ajustes metabólicos como mantener un suministro de tejido específico (por ejemplo, glucógeno y aminoácidos), una acumulación de ribosomas en monosomas como consecuencia de la traducción inhibición, varias estrategias para reducir la acidificación causada por la glucólisis al favorecer otros metabolitos relacionados con el lactato y mediante el control de la disolución del carbonato de calcio de la concha y una reducción en los niveles generales de transcripción (Biggar et al., 2012).

La respuesta metabólica de *Littorina littorea* bajo dos factores ambientales estresantes, la congelación y anoxia, fue revisado por Storey et al. (2013). En muchas regiones del norte, individuos de esta especie deben tolerar tanto la congelación (por debajo de -1.9°C) como la anoxia durante múltiples horas durante las mareas bajas de invierno (Biggar et al., 2012). La congelación produce una respuesta metabólica similar, pero no idéntica, a la anoxia (Storey et al. 2013). Ambos estresores favorecen la glucólisis para el suministro de energía, que, a su vez, no modifica la cantidad de aminoácidos celulares libres. Sin embargo, una diferencia es la acumulación de cantidades mayores de D-lactato y succinato (subproductos de glucólisis) bajo congelación que, bajo anoxia, mientras que productos de fermentación como L-aspartato, muestra la tendencia opuesta (Churchill & Storey 1996). En resumen, el congelamiento y la anoxia no solo reducen la tasa metabólica, sino que también causan otros cambios en los tejidos que ayudan a mantener el metabolismo de los caracoles en estas duras condiciones, tales como el aumento de las defensas antioxidantes y la funcionalidad de las proteínas (Storey et al., 2013).

Los tamaños de la concha, las razones de medidas de la concha y los promedios de medidas de la concha en *L. keenae* no aparentan mostrar una relación directa con las características genéticas. Si comparamos la disminución de tamaños de concha con relación a la latitud de las poblaciones podríamos atribuir este efecto a una variación clinal (solo tomando en cuenta rasgos morfométricos) que podría respaldarse con la selección negativa del genotipo heterocigoto (AB) de Norte a Sur, coincidiendo con los principios postulados por las teorías seleccionistas de la evolución. La disminución del genotipo AB posiblemente tendría una relación con el aumento de la temperatura y las diferencias de disponibilidad de oxígeno como se mencionó con anterioridad,

Contradictorio a los supuestos establecidos en la Teoría Neutral de la evolución; las variaciones morfométricas reportadas en este trabajo posiblemente son respuesta a la plasticidad fenotípica, considerada como el fenómeno de un genotipo produciendo diferentes fenotipos en respuesta a diferentes condiciones ambientales el cual es un aspecto intrínseco de todos organismos (Travis 1994; West-Eberhard 2003). Esta plasticidad fenotípica puede ser adaptativa, no adaptativa o neutral con respecto a la forma física de un individuo. La forma particular del fenotipo del individuo (o del genotipo) varía de acuerdo a los entornos y se pueden describir como una norma de reacción (Woltereck 1909).

Los valores bajos de F_{ST} con relación a otros trabajos realizados en Litorinidos (Correa-Sandoval, 1992) así como los valores altos de H_o (Tabla VIII) y el número de migrantes registrados entre ambas islas (tabla XIII) demuestran la existencia del flujo constante de genes que obedece a la Corriente de California con dirección de Norte a Sur principalmente (Fig. 21). Las diferencias significativas encontradas en la totalidad de loci analizados entre Isla de Guadalupe e Isla de Cedros indican que podría haber una diferenciación genética que, para el caso de este estudio y los sistemas analizados, podrían hacerse presentes, pero sería necesario analizar más sistemas para poder determinar la dirección y el tipo de diferenciación que posiblemente se esté presentando.

Encontrar una relación positiva y significativa entre la distancia geográfica y los valores de F_{ST} , así como la distancia geográfica y la distancia genética de Nei (1978) (fig. 19 y 20) demuestra parcialmente que éste aislamiento geográfico corresponde a los principios de Teoría de Islas propuestos por MacArthur y Wilson en 1967 donde se expone que la distancia geográfica es uno de los principales factores que determina la riqueza y presencia de especies en un cuerpo insular.

7.- Conclusiones.

- El Análisis de Componentes Principales (ACP) con el uso de rasgos morfométricos de la concha de organismos de *Littorina keenae*, permitió diferenciar entre poblaciones de la misma especie y relacionar las diferencias de las medidas de la concha con factores ambientales como: la pendiente de la costa, la temperatura y la exposición al oleaje. De esta manera se generaron 3 grupos en general; el primero con dos poblaciones de Isla de Guadalupe (LKGUCO y LKGUPS) y la población más septentrional de Isla de Cedros (LKCEPN). El segundo grupo compuesto por LKCESA y LKCEPP y por último la población de LKCEPM en Isla de Cedros, de acuerdo a sus similitudes.

- La creación de Funciones Empíricas Ortogonales Estandarizadas (SFEO) y con medidas crudas, de razones de medidas de la concha de organismos permitió diferenciar entre especies; *Littorina keenae* y *Littorina plena*, además de diferenciar entre localidades de ambas Islas; Guadalupe y Cedros. El uso de razones de medidas de la concha es una herramienta que permite disminuir los errores que se podrían cometer al capturar organismos de diferentes edades además de que se propone en este estudio como un método alternativo para diferenciar especies de Littorinidos.

- Las dos localidades de Isla de Guadalupe (LKGUCO y LKGUPS) mostraron un exceso significativo de Heterocigotos de acuerdo al equilibrio de HW en los 11 loci que se analizaron en este trabajo. Las cuatro poblaciones de Isla de Cedros (LKCEPN, LKCESA, LKCEPP y LKCEPM) mostraron en general una deficiencia significativa de heterocigotos de acuerdo al equilibrio de HW.
- De acuerdo a la variabilidad alélica de los organismos de *Littorina keenae* por pares de acuerdo al método de cadena de Markov, estos mostraron diferencias significativas entre las dos poblaciones de Isla de Guadalupe y las cuatro poblaciones de Isla de Cedros.
- La variación genotípica por pares de acuerdo al método de Markov en conjunto de todos los loci, por pares de poblaciones, fue significativa ($P < 0.05$) entre LKGUCO y LKCESA, ($P < 0.01$) entre LKGUPS y LKCESA y muy significativa ($P < 0.001$) entre las dos poblaciones de Isla de Guadalupe y LKCEPN, LKCEPP y LKCEPM.
- La disminución significativa del genotipo heterocigoto AB de Norte a Sur, se presenta como una variación clinal además de que se puede interpretar como una selección negativa del genotipo en la Isla de Cedros y, de esta manera, concordar con los supuestos de las teorías de selección.
- Los organismos con mayor similitud genética fueron los provenientes de las dos localidades de Isla de Guadalupe (LKGUCO y LKGUPS), ya que registraron los valores más altos de identidad genética (0.996), más bajos de distancia genética (0.004), los valores de F_{ST} más bajos (0.002) y el mayor número de migrantes por generación (124.7). Estos resultados concuerdan con la menor distancia geográfica entre ambas localidades y con la dirección de la Corriente de California.

- En Isla de Cedros las poblaciones con mayor similitud genética fueron las de LKCEPP y LKCEPM con valores de identidad genética de 0.984, distancia génica de 0.017, valor de F_{ST} de 0.011 y 22.47 organismos migrantes por generación. Las poblaciones con mayor diferenciación genética dentro de Isla de Cedros fueron LKCESA y LKCEPP con los valores de identidad más bajos (0.963), mayor distancia génica (0.037) el mayor valor de F_{ST} (0.023) y el menor número de migrantes por generación (10.62).

- En general las poblaciones de organismos de *Littorina keenae* de Isla de Guadalupe e Isla de Cedros muestran pocos signos de estructuración genética, esto se debe principalmente a las estrategias de reproducción de los Litorinidos que le permite a los huevos y larvas permanecer en la columna de agua hasta por 60 días hasta encontrar las condiciones óptimas para fijarse. El transporte de organismos se da a través de la Corriente de California con dirección de Norte a Sur durante todo el año y algunas variaciones para el caso de Isla de Cedros en las poblaciones de Punta Morro y San Agustín en los meses de diciembre y enero en los cuales la corriente invierte su dirección de Sur a Norte.

8.- Futuras líneas de investigación.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo y, de acuerdo a la literatura consultada, se presentan las siguientes recomendaciones para futuros trabajos, comenzando con la perspectiva general y dirigiéndose a la particular.

- Es importante continuar con los estudios encaminados a la ecología descriptiva ya que, con la optimización de estudios y la correcta elección de organismos como indicadores del efecto del medio ambiente, se podría comenzar a entender y explicar las vías y las formas en que los factores abióticos influyen en la expresión fenética de los organismos.

- En método de Análisis de Componentes Principales y la creación de Funciones Empíricas Ortogonales, es un aspecto que aún no se ha explorado del todo en estudios referentes a la morfometría de moluscos, es por ello que se recomienda continuar corroborando con estudios dirigidos a otros organismos con la finalidad de homologar resultados y poderse proponer como una herramienta más para diferenciar entre especies o incluso intra específicamente en poblaciones de diferentes localidades, con la ventaja de ser relativamente sencillo de realizar.
- En el campo de la genética de poblaciones, es importante seguir analizando la distribución de la variabilidad alélica y genética en organismos que, de acuerdo a su forma de vida, las respuestas son producto de las fuerzas de la selección, deriva, mutación y migración a las condiciones en que habitan. Este tipo de estudios en el intermareal rocoso es de gran importancia ya que, entender estos ambientes y las respuestas de los organismos nos permitiría crear predicciones con respecto a escenarios que se podrían presentar.
- Incrementar la cantidad de sistemas enzimáticos y, elegir los que pudieran ser indicadores de alguna respuesta al medio ambiente. Esto con la finalidad de mejorar y aumentar la información que ya se tiene de esta especie y de alguna manera corroborar las conclusiones a las que se llegó en el presente estudio.
- En el presente estudio se cumplieron parcialmente los principios de Teoría de Islas propuesta por MacArthur y Wilson (1967), desde el punto de vista que se obtuvo una correlación positiva entre la distancia geográfica y la distancia genética, por ello, continuar con estudios ecológicos descriptivos en Isla de Guadalupe e Isla de Cedros, generaría más argumentos para confirmar o rechazar dichos principios.
- Continuar con el presente estudio, comparando organismos de la misma especie, en el intermareal rocoso, pero aumentando el gradiente latitudinal, es decir, obtener muestras de las mismas características, pero en mayores

o menores latitudes, así como también, tomar muestras de las Islas de Todos los Santos para corroborar la variación en las frecuencias alélicas y verificar si la distancia geográfica sigue correlacionándose con la distancia genética.

9. Literatura citada.

- Abbott, R. t. (1974): American Seashells; The Marine Molluska of the Atlantic and Pacific Coasts of North America, Van Nostrand Reinhold.
- Adey, W.H. & Hayek, L.A.C. 2005. The biogeographic structure of the western North Atlantic rocky intertidal. *Crytogamie Algologie* 26, 35–66.
- Alcock, J. 1984. Animal behaviour: An Evoluntary Aproach. Sinauer, Sunderland, MA.
- Ayala, F. J. y J. A. Kiger, Jr. 1984. Genética Moderna. Ed. Fondo Educativo Interamericano, S.A. Mexico. 813 pp.
- Ayre, D. J. t T. P. Hughes. 2004. Climate change, genotypic diversity and gene flow in brooding and spawning corals along the Great Barrier Reef, Australia. *Evolution* 54 (5): 1590-1605.
- Behrens Yamada, S.B., Navarrete, S.A. & Needham, C. 1998. Predation induced changes in behavior and growth rate in three populations of the intertidal snail, *Littorina sitkana* (Philippi). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 220, 213–226.
- Biggar, K.K., Kornfeld, S.F., Maistrovski, Y. & Storey, K.B. 2012. MicroRNA regulation in extreme environments: differential expression of microRNAs in the intertidal snail *Littorina littorea* during extended periods of freezing and anoxia. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 10, 302–309.
- Boulding, E.G., Holst, M. & Pilon, V. 1999. Changes in selection on gastropod shell size and thickness with wave-exposure on Northeastern Pacific shores. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 232, 217–239.
- Boulding, E.G., Pakes, D. & Kamel, S. 2001. Predation by the pile perch, *Rhacochilus vacca*, on aggregations of the gastropod *Littorina sitkana*. *Journal of Shellfish Research* 20, 403–409.
- Briggs, J.C., 1974. Marine Zoogeography. McGraw Hill, New York. 475 p.
- Brown, J. H. y A. C. Gibson, 1983. Biogeography. The C.V. Mosby Company, St. Louis, Missouri. 643 p.
- Ceballos G. P., A. Rodriguez y R. Medellin 1998. Assessing conservation priorities in megadiverse México: mammalian diversity, endemicity and

- endangerment. (Evaluación de las prioridades de conservación en el México megadiverso: diversidad de mamíferos, endemidad y peligro de extinción) Ecological Application. 8.
- Checa, Caratachea M. A., 2007. Polimorfismos genéticos: importancia y aplicación, Revista del instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Mex. Número 3, Vol 20, pp 213-221.
- Chow, V. 1987. Morphological classification of sibling species of *Littorina* (Gasteropoda: Prosobranchia): Discretionary use of discriminant analysis. The veliger 29 (4): 359-366.
- Churchill, T.A. & Storey, K.B. 1996. Metabolic responses to freezing and anoxia by the periwinkle *Littorina littorea*. Journal of Thermal Biology 21, 57–63.
- Cid Becerra, J. A. (2002). Análisis Biogeográfico, Genético y Morfométrico de *Lyrripecten (Nodipecten) subnodosus* (Sowerby, 1835) (Mollusca; Bivalva) en el Pacífico Oriental, 193.
- Connell, J. H. 1972. Community Interactions on marine rocky intertidal shores. Annual Review of Ecology and Systematics 3:169-192.
- Correa Sandoval Francisco (2014), Biodiversidad y biogeografía de la flora y fauna asociada al intermareal rocoso de la Isla de Guadalupe, Baja California, México. (Clave de proyecto 403/1/C/141/18), Ensenada, Instituto de Investigaciones Oceanológicas, pp 10 y 11).
- Cossu, P., Dedola, G. L., Scarpa, F., Sanna, D., Lai, T., Maltagliati, F., ... Casu, M. (2015). Patterns of spatial genetic variation in *Patella ulyssiponensis*: insights from the western Mediterranean marine ecoregion. Hydrobiologia, 755(1), 39–55. <http://doi.org/10.1007/s10750-015-2216-2>
- Diario Oficial de la Federación. 2005. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Decreto por que se declara como área natural protegida con la categoría de reserva de la biosfera, la zona marina y terrestre que incluye a la Isla de Guadalupe. Lunes 25 de abril. México D. F.
- Dobzhansky, T., F. J. Ayala, G. L. Stebbins y J. W. Valentine. 1980. Evolución: Primera Edición. Omega. Barcelona, España. 558 pp.

- Durazo R. 2009. Climate and upper ocean variability off Baja California México: 1997-2008. *Progr. Oceanogr.* 83: 361-368.
- Fernandez-Apago J. A. 1992. Caracterización genética del caracol *Astraea undosa* (Molusca: gasterópoda) 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. Heterozygous 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.
- Gooch, J. L. 1975. Mechanisms of evolution and population genetics. En: *Marine Ecology*. O. Kinne (ed.) Cap. 6. Vol. II. Part I: 349-409.
- García-Pamanes, L. y G. Chee-Barragan. 1976. Ecología de la zona de entremares de la bahía de Todos Santos. *Ciencias Marinas* 3:10-29.
- Gracia Sue 2017. Caracterización morfométrica de *Lottia gigantea* (Swaby 1834) provenientes de cuatro localidades de Isla de Cedros, B. C., México. (tesis)
- Harley, C.D.G. & Helmuth, B.S.T. 2003. Local- and regional-scale effects of wave exposure, thermal stress, and absolute versus effective shore level on patterns of intertidal zonation. *Limnology and Oceanography* 48, 1498–1508.
- Harris, H., & Hopkinson, D. A. (1976). *Handbook of Enzyme Electrophoresis in Human Genetics*. North-Holland. Retrieved from <https://books.google.com.mx/books?id=FhhVewAACAAJ>
- Harris, H., & Hopkinson, D. A. (1978). *Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics*. Supplement. North-Holland. Publ. Co. Amsterdam.
- Hausback, B.P. (1984) Cenozoic volcanic and tectonic evolution of Baja California Sur, Mexico. *Geology of the Baja California Peninsula* (ed. by V.A. Frizzell Jr), pp. 219–236. Pacific Section, Society of Economic Paleontologists and Mineralogists, Los Angeles, CA.
- Hewitt, G.M. (2004) Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences*, 359, 183–195.

- Hochachka, P. W., G. N. Somero (2002). Biochemical adaptation. Mechanisms and processes in physiological evolution, Oxford University Press, Oxford, UK.
- Hollander, J., Adams, D.C. & Johannesson, K. 2006a. Evolution of adaptation through allometric shifts in a marine snail. *Evolution* 60, 2490–2497.
- Hubbs C.L. 1960. The marine vertebrates of the outer coast. Symposium The Biogeography of Baja California and adjacent seas. *Systematic Zoology*. 9:134-147.
- Hull, S.L., Grahame, J. & Mill, P.J. 1999a. Reproduction in four populations of brooding periwinkle (*Littorina*) at Ravenscar, North Yorkshire: adaptation to the local environment? *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 79, 891–898.
- Jablonski, D., K. Roy, and J. W. Valentine. 2006. Out of the tropics: Evolutionary dynamics of the latitudinal diversity gradient. *Science*. 314:102– 5.
- 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.
- Johannesson, K. 2003. Evolution in *Littorina*: ecology matters. *Journal of Sea Research* 49, 107–117.
- Johannesson, K. 2009. Inverting the null-hypothesis of speciation: a marine snail perspective. *Evolutionary Ecology* 23, 5–16.
- Johannesson, K. 2010. Are we analyzing speciation without prejudice? *Annals of the New York Academy of Sciences* 1206, 143–149.
- Johannesson, K. & Mikhailova, N. 2004. Habitat-related genetic substructuring in a marine snail (*Littorina fabalis*) involving a tight link between an allozyme and a DNA locus. *Biological Journal of the Linnean Society* 81, 301–306.
- Kaustuv R y Witman J. (2009), *Marine Macroecology*, The University of Chicago Press, Chicago London.
- Lee, H. J., E. G. Boulding (2010): Latitudinal clines in body size, but not in thermal tolerance or heat-shock cognate 70 (HSC70), in the highly-dispersing

- intertidal gastropod *Littorina keenae* (Gastropoda: Littorinidae). *Biological Journal of the Linnean Society*. 100(3): 494-505.
- Legendre P. y L. Legendre. 1998. *Numerical ecology*. Elsevier Science BV. Amsterdam. 853 pp.
- Licona-Chavez, a. Correa-Sandoval, F., de la Rosa-Velez, J., & Camarena-Rosales, F. (2007). Analisis genético y morfométrico de *Chione californiensis* y *C. subimbricata* (bivalva: Veneridae) de Pacífico oriental mexicano y el Golfo de California. *Ciencias Marinas*, 33(2), 149-171.
- Littler, M. M. 1980. Overview of the rocky intertidal systems of southern California. 117 D. M. Power. ed. *The California islands: proceedings of a multidisciplinary symposium*. Santa Barbara Museum of Natural History, Santa Barbara. Calif. (in press).
- Luckhurst, B.E. & Luckhurst, K. *Mar. Biol.* (1978) 49: 317. <https://doi.org/10.1007/BF00455026>.
- MacArthur, R. H. y E. O. Wilson, 1963. An equilibrium theory of insular Zoogeography. *Evolution*. 17: 373-387.
- Mastro, E., V. Chow y D. Hedgecock, 1982. *Littorina scutulata* and *Littorina plena*: sibling species status of two prosobranch gastropod species confirm by electrophoresis. *The Veliger* 24(3): 239.
- McMahon, R. F. (1990): Thermal tolerance, evaporative water loss, air-water oxygen consumption and zonation of intertidal prosobranchs: a new synthesis. *Progress in Littorinid and Muricid Biology*, Springer: 241-260 pp.
- McQuaid, C.D. 1996b. Biology of the gastropod family Littorinidae 2. Role in the ecology of intertidal and shallow marine ecosystems. *Oceanography and Marine Biology: an Annual Review* 34, 263–302.
- Miller, L. P., O'Donnell, M.J. & Mach, K.J. 2007. Dislodged but not dead: survivorship of a high intertidal snail following wave dislodgement. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 87, 735–739.

- Miller, L. P., M. W. Denny (2011): Importance of behavior and morphological traits for controlling body temperature in Littorinid snails. *The Biological Bulletin*. 220(3): 209-223.
- Moran, R. 1996. The flora of Guadalupe Island, México. California Academy of Sciences, San Francisco, California, USA.
- Moran, R. 1999. La Isla Guadalupe y su flora. *Fremontia*, edición especial julio 1999, 42-51.
- Murray, S. N., R. F. Ambrose y M. N. Dethier. 2002. Methods for Performing Monitoring, Impact and Ecological Studies on Rocky Shores. *MMs OCS*
- Norton, T., S. Hawkins, N. Manley, G. Williams, D. Watson (1990): Scraping a living: a review of littorinid grazing. *Progress in Littorinid and Muricid Biology*, Springer: 117-138 pp.
- Nybakken J.W. 2005. *Marine biology: an ecological approach*. Perarson/Benjamin Cummings. E. U. A.579 pp.
- Oberbauer, T. (1984). Pacific coast islands of Baja California-Part one. *Environment Southwest San Diego Society of Natural History Museum*, 17-21.
- Oberbauer, T. (1999) Floristic Analysis of Vegetation Communities on Isla de Cedros, Baja California, Mexico. Department of Planning and Land Use Contryos San Diego 115-131 pp.
- Ortlieb, L. (1979) Quaternary shorelines around Baja California peninsula, Mexico: neotectonic implications. *Geological Society of America, Abstracts with Programs*, 11, 490.
- Ortlieb, L. (1991) Quaternary vertical movements along the coasts of Baja California and Sonora. *The Gulf and Peninsular Province of the Californias, Memoir 47* (ed. by J.P. Dauphin and B.R.T. Simoneit), pp. 447–480. America Association of Petroleum Geologists, Tulsa, OK.
- Panova, M., Blakeslee, A.M.H., Miller, A.W., Mäkinen, T., Ruiz, G.M., Johannesson, K. & André, C. 2011. Glacial history of the North Atlantic marine snail, *Littorina saxatilis*, inferred from distribution of mitochondrial DNA lineages. *PLoS One* 6, e17511.

- Panova, M., K. Johannesson (2004): Microscale variation in Aat (aspartate aminotransferase) is supported by activity differences between upper and lower shore allozymes of *Littorina saxatilis*. *Marine Biology*. 144(6): 1157-1164.
- Perez, K.O., Carlson, R.L., Shulman, M.J. & Ellis, J.C. 2009. Why are intertidal snails rare in the subtidal? Predation, growth and the vertical distribution of *Littorina littorea* (L.) in the Gulf of Maine. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 369, 79–86.
- Pigliucci, M. 2005. Evolution of phenotypic plasticity: where are we going now? *Trends in Ecology and Evolution* 20, 481–486.
- Pielou, E. C., 1979. Biogeography. John Wiley & Sons. New York, USA. 351 p.
- Raffaelli D. y S. Hawkings. 1999. Intertidal ecology. Klumer Academic Publishers. Holanda. 356 pp.
- Raymond, M. y F. Rousset, 1994. GENEPOP. Institut des Sciences de l'Evolution. France.
- Reid, D.G., Dyal, P. & Williams, S.T. 2012. A global molecular phylogeny of 147 periwinkle species (Gastropoda, Littorininae). *Zoologica Scripta* 41, 125–136.
- Riddle, B.R., Hafner, D.J., Alexander, L.F. & Jaeger, J.R. (2000) Cryptic vicariance in the historical assembly of a Baja California peninsular desert biota. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 97, 14438–14443.
- Rochette, R. & Grand, T.C. 2004. Mechanisms of species coexistence: a field test of theoretical models using intertidal snails. *Oikos* 105, 512–524.
- Rolán-Alvarez, E., Zapata, C. & Alvarez, G. 1995. Distinct genetic subdivision in sympatric populations of two sibling species of the genus *Littorina* (Gastropoda: Littorinidae). *Heredity* 74, 1–9.
- Rolán-Alvarez, E., Johannesson, K. & Erlandsson, J. 1997. The maintenance of a cline in the marine snail *Littorina saxatilis*: the role of home site advantage and hybrid fitness in ecotype formation. *Evolution* 51, 1828–1847.

- Rolán-Alvarez, E. 2007. Sympatric speciation as a by-product of ecological adaptation in the Galician *Littorina saxatilis* hybrid zone. *Journal of Molluscan Studies* 73, 1–10.
- Sanford, E. & Kelly, M.W. 2011. Local adaptation in marine invertebrates. *Annual Review of Marine Science* 3, 509–535.
- Storey, K.B., Lant, B., Anozie, O.O. & Storey, J.M. 2013. Metabolic mechanisms for anoxia tolerance and freezing survival in the intertidal gastropod, *Littorina littorea*. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 165, 448–459.
- Swofford, D. L., & Selander, R. B. (1981). systematics, (August), 281–283.
- Santamaría del Ángel, E. M., 1994. El color de las aguas del Golfo de California registrado por el CZCS: relaciones de la biomasa fitoplanctónica y los procesos físicos de mezcla. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Baja California. 137 p.
- Santamaría-del-Ángel E., I. Soto, R. Millán-Nuñez, A. González-Silvera, J. Wolny, S. Cerdeira-Estrada, R. Cajal-Medrano, F. Müller-Karger, J. Cannizzaro, Y. X. S. Padilla-Rosas, A. Mercado-Santana, M. F. Gracia-Escobar, P. Álvarez-Torres, M. C. Ruiz-de-la-Torre (2015). Phytoplankton blooms: new initiative using marine optics as a basis for monitoring programs.
- Stevens, George C. 1989, The Latitudinal Gradient in Geographical Range: How so Many Species Coexist in the Tropics, *The American Naturalist*, The University of Chicago Press Chapter 4 pag. 57-88 in *Coastal Ecosystems: Experiences and Recommendations for Environmental Monitoring Programs*. Eds. M.T. Sebastiá-Frasquet. Ed.Nova Science Publishers. N.Y. 220 p. ISBN: 978-1- 63482-189-6i
- Segura-Aguilar, R. 2008. Análisis socio-ambiental como base para la gestión de la zona intermareal de Punta Morro con fines de investigación, educación y uso sustentable. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Baja California. 76 pp.
- Schmidt, P. S., M. Phifer-Rixey, G. M. Taylor, J. Christner (1979): Genetic heterogeneity among intertidal habitats in the flat periwinkle, *Littorina obtusata*. *Mol Ecol*. 16(11): 2393-2404.

- Seapy, R. R., M. M. Littler (1993): Rocky intertidal macroinvertebrates of the Southern California Bight: an overview and checklist.
- SEMAR, 2015; digaohm.semar.gob.mx/cuestionarios/cnariolslacedros.
- Slatkin, M., 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* 236, 787±792.
- Sokolova, I. M., H.-O. Pörtner (2003): Metabolic plasticity and critical temperatures for aerobic scope in a eurythermal marine invertebrate (*Littorina saxatilis*, Gastropoda: Littorinidae) from different latitudes. *Journal of Experimental Biology*. 206(1): 195-207.
- Stevens, G. C. 1989. The latitudinal gradient in geographical range: How so many species coexist in the tropics. *American Naturalist* 133:240– 56.
- Storch, D., R. G. Davies, S. Zajicek, C. D. L. Orme, V. Olson, G. H. Thomas, T.-S. Ding, et al. 2006. Energy, range dynamics, and global species richness patterns: Reconciling mid- domain effects and environmental determinants of avian diversity. *Ecology Letters* 9:1308– 20.
- Study 2001-070. Coastal Research Center, Marine Science Institute, University of California, Santa Barbara, California. MMS Cooperative Agreement Number 14-35-0001-30761. 217 pp.
- Struhsaker, J. W., 1968. Selection mechanism associated with intraspecific Shell variation in *Littorina picta* (Prosobranchia: mesogastropa). *Evolution* 22: 459 – 480.
- Tatarenkov, A. & Johannesson, K. 1994. Habitat related allozyme variation on a microgeographic scale in the marine snail *Littorina mariae* (Prosobranchia, Littorinacea). *Biological Journal of the Linnean Society* 53, 105–125.
- Tatarenkov, A. & Johannesson, K. 1998. Evidence of a reproductive barrier between two forms of the marine periwinkle *Littorina fabalis* (Gastropoda). *Biological Journal of the Linnean Society* 63, 349–365.
- Tellez-Garcia, G. 2003. Diseño preliminar de un rompeolas sumergido de la costa y su impacto potencial frente a los cantiles marinos de Punta Morro, Ensenada, Baja California, México. Tesis de Licenciatura en Oceanología,

- Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada 72 pp.
- Thorson, G. 1966. Some factors influencing the recruitment and establishment of marine benthic communities. *Neth J. Sea Rea.* 3: 267-293.
- Travis J 1994 Evaluating the adaptive role of morphological plasticity; in *Ecological morphology: integrative organismal biology* (eds) P C Wainwright and S. M. Reilly (Chicago: Chicago University Press) pp 99–122
- Trussell, G.C., Ewanchuck, P.J. & Bertness, M.D. 2002. Field evidence of trait-mediated indirect interactions in a rocky intertidal food web. *Ecology Letters* 5, 241–245.
- Trussell, G.C. & Nicklin, M.O. 2002. Cue sensitivity, inducible defense, and trade-offs in a marine snail. *Ecology* 83, 1635–1647.
- Vermeij, R, D., 1990. Biochemical variation in the genus *Littorina* (Prosobranchia: Mollusca). *Hydrobiologia* 193 (Dev. Hydrobiol. 56): 53-69.
- Vermeij, M.J.A. 2004. Earlylife-historydynamics of Caribbean coral species on artificial substratum: the importance of competition, growth and variation in life history strategy, *Coral Reefs*, 25: 59- 71. TOMADOEN:<http://digaohm.semar.gob.mx/cuestionarios/cnariolslacedros.pdf>.
- Via, S. & Lande, R. 1985. Genotype-environment interaction and the evolution of phenotypic plasticity. *Evolution* 39, 505–522.
- West-Eberhard M J 1989 Phenotypic plasticity and the origins of diversity; *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 20 249–278
- Warwick RM, Clarke KR (1995) New 'biodiversity' measures reveal a decrease in taxonomic distinctness with increasing stress. *Mar EcolProgSer* 129:301-305.
- Wilson, I.F. & Gosling, E.M. 1998. Genetic variability in *Littorina saxatilis* from different habitats on an island in Galway Bay. *Hydrobiologia* 378, 1–10.

10.- Anexos.

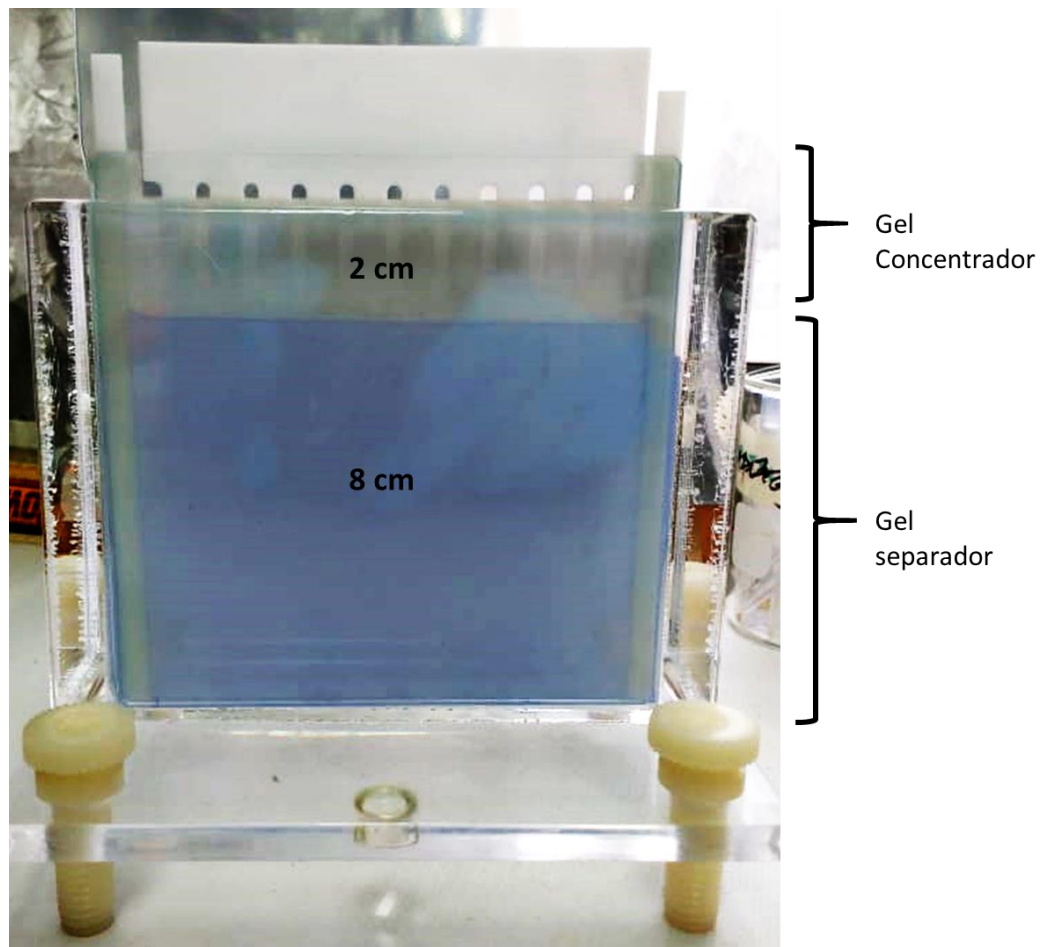
1.- Preparación de geles discontinuos.

A. Gel concentrador (100 x 1000 x 0.7 mm de espesor; 3.8% T, 0.34% C).

Reactivo	Cantidad
Agua Destilada	1.38 ml
Amortiguador Concentrador	0.56 ml
Solucion de Acrilamida	0.29 ml
APS 10%	11 μ
TEMED	3 μ
TOTAL	2.25 ml

B. Gel separador (8% T, 0.71% C).

Reactivo	Cantidad
Agua Destilada	3.82 ml
Amortiguador Separador	2 ml
Solucion de Acrilamida	2.13 ml
APS 10%	40 μ
TEMED	5 μ
TOTAL	8 ml



Estructura del gel discontinuo de bis-acrilamida.

2.- Ejemplo de esquema de sembrado para la realización de la electroforesis.

	<i>L. keenae</i> Isla Guadalupe C. Oeste
	<i>L. keenae</i> Isla Guadalupe Punta Sur.
	<i>L. plena</i> IIO
	<i>Lottia</i>

	IA											
	CARRIL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
	PROBLACION											
	ORGANISMO	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	
	IB											
	CARRIL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
	PROBLACION											
	ORGANISMO	4	5	6	4	5	6	1	4	5	6	
	IIA											
	CARRIL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
	PROBLACION											
	ORGANISMO	7	8	9	1	7	8	9	7	8	9	
	IIB											
	CARRIL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
	PROBLACION											
	ORGANISMO	1	10	11	12	10	11	12	10	11	12	

	IIIA										
	CARRIL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	PROBLACION ORGANISMO	13	14	15	13	14	15	13	14	15	1

	IIIB										
	CARRIL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	PROBLACION ORGANISMO	16	17	18	16	17	18	1	16	17	18

	IVA										
	CARRIL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	PROBLACION ORGANISMO	19	20	21	1	19	20	21	19	20	21

	IVB										
	CARRIL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	PROBLACION ORGANISMO	1	22	23	24	22	23	24	22	23	24

	VA										
	CARRIL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	PROBLACION ORGANISMO	25	26	27	25	26	27	25	26	27	1

	VB										
	CARRIL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	PROBLACION ORGANISMO	28	29	30	28	29	30	1	28	28	30

	VIA										
	CARRIL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	PROBLACION										
ORGANISMO	31	32	33	1	31	32	33	31	32	33	

VIB										
CARRIL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
PROBLACION										
ORGANISMO	1	34	35	36	34	35	36	34	35	36

	VIIA										
	CARRIL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	PROBLACION										
ORGANISMO	37	38	39	37	38	39	37	38	39	1	

VIIB										
CARRIL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
PROBLACION										
ORGANISMO	40	41	42	40	41	42	1	40	41	42

	VIIIA										
	CARRIL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	PROBLACION										
ORGANISMO	43	44	45	1	43	44	45	43	44	45	

VIIIB										
CARRIL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
PROBLACION										
ORGANISMO	1	46	47	48	46	47	48	46	47	48

IXA		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CARRIL											
PROBLACION											
ORGANISMO		49	50		49	50		49	50		1

IXB		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CARRIL											
PROBLACION											
ORGANISMO											

3.- Fórmulas de tinción para los sistemas enzimáticos que se emplearon en el análisis genético de las poblaciones de *L. keenae*, el volumen que se especifica en éstas permite teñir un gel.

PGM: E.C.2.7.5.1 13)

1) Fosfoglucomutasa

225 mg glucosa-1-fosfato

18 mg NADP+

45 mg NBT

9 mg PMS

315 mg MgCl₂·6H₂O

90 Uni. G6PDH

90 ml Tris-HCl 0.1 M pH 8.0

(Abreu-Grobois, 1983)

MDH E.C.1.1.1.37

2) Malato deshidrogenasa

675 mg L-ácido málico

2700 mg Tris

50 mg NBT

45 mg NAD+

10 mg PMS

90 ml H₂O destilada

(de la Rosa-Vélez, 1986)

PEP: E.C.3.4.11 ó 13

3) Peptidasas

100 mg leucil leucina

50 mg peroxidasa

25 mg L-aminoácido oxidasa

25 mg O-dionisidina

100 ml Tris-HCl 0.1 M pH 8.0

(Abreu-Grobois, 1983)

PGI: E.C.5.3.1.9

4) Glucosa fosfato isomerasa

90 mg fructosa-6-fosfato

18 mg NADP+

50 mg NBT

10 mg PMS

90 mg MgCl₂·6H₂O

90 Uni. glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

90 ml Tris-HCl 0.1 M pH 8.0

(Abreu-Grobois, 1983)

IDH: E.C.1.1.1.42

5) Isocitrato deshidrogenasa

50 mg NADP+

45 mg NBT

18 mg PMS

70 mg ácido isocítrico

18 mg MgCl₂·6H₂O

90 ml Tris-HCl 0.5 M, pH 8.0

(Krause et al., 1994)

HK: E.C.2.7.1.1

6) Hexoquinasa

360 mg DL-glucosa

108 mg ATP

18 mg NADP+

18 mg MTT

10 mg PMS

33 mg MgCl₂·6H₂O

63 U G6PDH

90 ml Tris-HCl 0.1 M, pH 7.5

(Licona-Chávez, 1999)

5.- Longitud de la concha de Litorínidos en la costa del Pacífico americano.

ESPECIE Y LOCALIDAD	LONGITUD (MM)	REPORTADO
Isla de Vancouver, Canadá		
<i>Littorina scutulata</i>	9.5 – 9.8	Sacchi y Voltonia (1987)
<i>Littorina sitkana</i>	8.0 – 12.4	Sacchi y Voltonia (1987)
California		
<i>Littorina keenae</i>	9.2 – 15.3	Vermeij (1973)
<i>Littorina scutulata</i>	7.3 – 12.2	Vermeij (1973)
Ensenada, Baja California		
<i>Littorina keenae</i>	5.5 – 11.0	Correa-Sandoval (1994)
<i>Littorina scutulata</i>	5.3 – 10.1	Correa-Sandoval (1994)
Isla Naos, Zona del Canal de Panamá		
<i>Littorina modesta</i>	8.5 – 12.4	Vermeij (1973)
<i>Littorina aspera</i>	10.1 – 14.1	Vermeij (1973)
Estación Biológica Darwin, Galápagos		
<i>Nodilittorina galapagensis</i>	7.5 – 8.7	Vermeij (1973)
<i>Littorina modesta paytensis</i>	5.8 – 7.8	Vermeij (1973)
<i>Littorina astrata</i>	4.8 – 5.7	Vermeij (1973)
Punta Cornero, Ecuador		
<i>Littorina modesta paytensis</i>	7.9 – 14.1	Vermeij (1973)
Isla San Lorenzo, Peru		
<i>Littorina peruviana</i>	8.0 – 11.7	Vermeij (1973)
Montemar, Chile		
<i>Littorina peruviana</i>	8.6 – 16.0	Vermeij (1973)
Isla Guadalupe		
<i>Littorina keenae</i>	17 – 8.9	Este estudio (2018)
Isla de Cedros		
<i>Littorina keenae</i>	13.9 – 6.0	Este estudio (2018)
Ensenada, Baja California		
<i>Littorina plena</i>	8.9 – 4.2	Este estudio (2018)

