



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
BAJA CALIFORNIA**

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS

**ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL DE
Chione cortezi (BIVALVIA, VENERIDAE),
EN EL ALTO GOLFO DE CALIFORNIA**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS
EN OCEANOGRAFÍA COSTERA**

P R E S E N T A

Alejandra Rosalía Mora de la Torre

Ensenada, B.C. junio de 1997

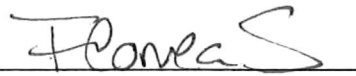
"Estructura Genética Poblacional de *Chione cortezi*
(Bivalvia, Veneridae), en el Alto Golfo de California."

TESIS

QUE PRESENTA:

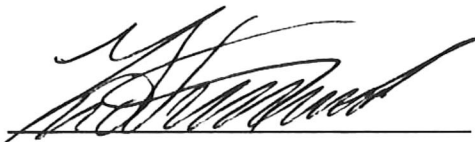
BIOL. ALEJANDRA R. MORA DE LA TORRE

Aprobada por:



Presidente del Jurado

Dr. Francisco Correa Sandoval



Sinodal Propietario

Dr. Guillermo Villarreal Chávez



Sinodal Suplente

M. C. Roberto Escobar Fernández

Este estudio fue financiado por el Censejo Nacional de Ciencia y Tecnología
como parte de los proyectos 431100 5 2595PB CONACYT y el 4054-
UABC-I I O.

A Guillermo, Memo Y Carlos.

AGRADECIMIENTOS.

Al Dr. Francisco Correa Sandoval por su solidaridad y apoyo, y por la buena disposición mostrada al dirigir esta tesis. También agradezco el haberme brindado su cooperación incondicional desde el inicio del trabajo de laboratorio, al proporcionarme toda clase de ayuda, y en todo momento sus conocimientos.

Al Dr. Guillermo Villarreal Chávez por su apoyo en la realización de este proyecto, por los comentarios y sugerencias hechas a lo largo de todo el proceso y durante la revisión crítica del escrito.

Al M. C. Roberto Escobar Fernández por sus valiosas aportaciones durante la revisión crítica del escrito, y por el apoyo desinteresado en la etapa inicial de este trabajo en el laboratorio.

Al Dr. Jorge de la Rosa Vélez por sus valiosos comentarios, sugerencias y aportaciones.

A Memo y Carlos por su inapreciable ayuda en el manejo de la computadora.

A los mejores compañeros que pude haber tenido, mis amigos: Lucy, Tex (Francisco Muñoz), Jazmín, Margarita, Lalo, Fernando y Laura por todo lo que hemos compartido.

A Gladys y Mona por sus sugerencias para la redacción del escrito.

A Mayra y Mary por la digitalización de las figuras.

A Fernando por el diseño y la elaboración de la portada.

A Pacho (Francisco Vélez) por la elaboración de material de apoyo para la exposición de este trabajo.

INDICE

	Página
1. RESUMEN	iii
2. INTRODUCCIÓN	1
3. ANTECEDENTES	3
3.1. Importancia de la genética en el manejo de recursos.	3
4. OBJETIVOS	9
5. AREA DE ESTUDIO	10
6. MATERIAL Y METODOS	16
6.1 Nomenclatura de las poblaciones	16
6.1.1 Colecta y transporte	16
6.2 Ensayos electroforéticos	17
6.2.1 Preparación del gel	20
6.2.2 Incubación del gel	25
6.3 Interpretación de los Zimogramas	25
6.4 Procesamiento estadístico de los datos	26
7. RESULTADOS	29
8. DISCUSIÓN	33
9. CONCLUSIONES	41
10. RECOMENDACIONES	48
11. LITERATURA CITADA	49

INDICE DE TABLAS

		Página
Tabla	I. Soluciones amortiguadoras	18
Tabla	II. Sistemas enzimáticos, amortiguadores y número de <i>loci</i> expresados	19
Tabla	III. Tinciones histoquímicas	21
Tabla	IV. Frecuencias alélicas de las poblaciones de <i>Chione cortezi</i> , según el equilibrio de Hardy-Weinberg: CCAR = <i>C. cortezi</i> fondo arenoso, CCLI = <i>C. cortezi</i> fondo limoso.	31
Tabla	V. Variabilidad genética de 13 <i>loci</i> en las poblaciones separadas de acuerdo al tipo de sustrato y en su conjunto, determinada por medio de las frecuencias alélicas.	33
Tabla	VI a. Análisis de bondad de ajuste de Ji cuadrada para probar el equilibrio genético de la población de <i>Chione cortezi</i> en arenoso, de acuerdo al modelo de Hardy-Weinberg.	34
Tabla	VI b. Análisis de bondad de ajuste de Ji cuadrada para probar el equilibrio genético de la población de <i>Chione cortezi</i> en limoso, de acuerdo al modelo de Hardy-Weinberg.	36
Tabla	VII. Estimador D en las poblaciones de <i>Chione cortezi</i> en fondo arenoso (CCAR), y <i>Chione cortezi</i> fondo limoso (CCLI).	38
Tabla	VIII. Prueba de F promedio para todos los <i>loci</i> , interrelacionando las dos subpoblaciones, respecto al tipo de sustrato: <i>Chione cortezi</i> en fondo arenoso (CCAR) y <i>Chione cortezi</i> fondo limoso (CCLI).	38

INDICE DE FIGURAS

		Página
Figura	1. <i>Chione cortezi</i>	2
Figura	2 . Mapa de localidades de colecta en el área de estudio .	10
Figura	3 Mapa de sedimentos del Golfo de California (Parker, 1964).	11
Figura	4 Mapa de batimetría del Golfo de California (Parker, 1964).	12
Figura	5a. Isotermas de invierno en el Golfo de California.	14
Figura	5b. Isotermas de verano en el Golfo de California.	14
Figura	6 . Zimogramas de GOT-1.	26

1. RESUMEN

Se realizó un análisis de la variabilidad genética de *Chione cortezi*, separando a la especie en dos poblaciones de acuerdo al tipo de habitat (arenoso y limoso), por medio de electroforesis en gel de almidón a ocho sistemas enzimáticos con un total de 13 *loci*, en tejido del músculo aductor. Se hizo un estudio comparativo para determinar la variabilidad y la estructura genética de estas dos poblaciones.

Se detectó una heterocigosis promedio de: $H_e = 0.221$ para *Chione cortezi* en habitat arenoso, y $H_e = 0.125$ para la población de habitat limoso, y en conjunto se tuvo un valor de $H_e = 0.172$. En ambos casos las poblaciones presentaron una deficiencia de heterocigotos respecto al valor esperado según el equilibrio de Hardy-Weinberg. Se encontraron dos *loci* monomórficos (EM-2 e IDH-1), para ambas poblaciones.

Los valores de similitud y de distancia genéticas de Nei, obtenidos entre las dos poblaciones, fue de: $I = 0.939$ y $D = 0.063$.

De acuerdo con los resultados de la prueba de F, no existen subdivisiones ni a nivel intrapoblacional ni interpoblacional, y tampoco se presenta un aislamiento reproductivo. Ambas poblaciones mantienen un flujo genético importante entre sí y constituyen, por lo tanto, una sola población, con un alto grado de variabilidad genética.

2. INTRODUCCION

Chione cortezi es un bivalvo de la familia Veneridae, que se considera endémica de la zona del Alto Golfo de California, ya que hasta ahora no se cuenta en la literatura con ningún reporte de que haya sido hallada en alguna otra localidad. Villarreal *et al.*, (1995), confirman haber encontrado una sola población restringida al extremo norte del Golfo exclusivamente, entre San Felipe, B. C. ($31^{\circ} 05' N$ y $114^{\circ} 50' W$) y el Golfo de Sta. Clara, Son. ($31^{\circ} 45' N$ y $114^{\circ} 28' W$) (Villarreal, 1995). Este hecho contrasta con la amplia distribución que presentan la mayoría de las especies de la subfamilia Chioninae en el Pacífico, cuya localización abarca desde el Golfo de California hasta las costas de Sudamérica. (Cantera, 1991).

Sin embargo, para este estudio es precisamente el hecho de ser una especie endémica, aunado a la reciente declaración del Alto Golfo como zona de reserva de la biósfera, lo que hace a *Chione cortezi* importante objeto de estudio. Además de ser ésta una especie de calidad comercial, y actualmente sujeta a explotación.

Por estas razones se hace necesario determinar el grado de estructuración genética de la población de *Chione cortezi*, para contribuir con esta información a fundamentar la factibilidad del aprovechamiento sustentable de este recurso (Fig.1).

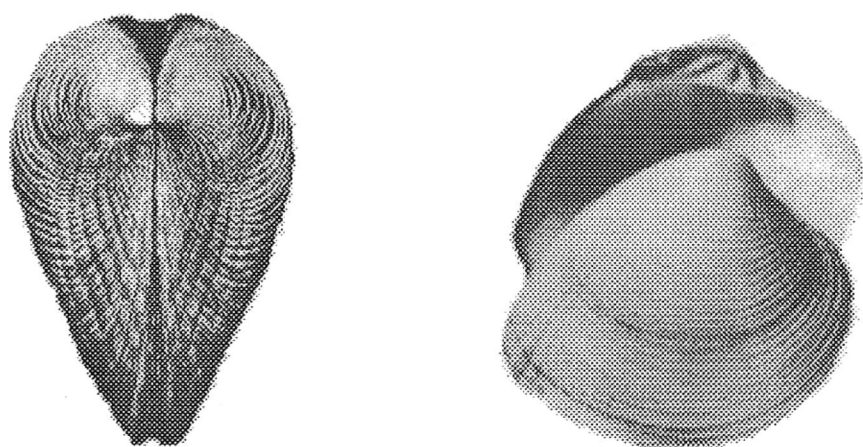


Figura 1. *Chione cortezi* (Keen, 1971).

3. ANTECEDENTES

Para conocer con precisión las características genéticas de una población se emplean las técnicas electroforéticas, las cuales han probado ser adecuadas en estudios como el que aquí se plantea, dado que hacen posible estimar el grado de variación genética en el genoma total de una población, inferir las variantes alélicas en genes individuales, así como también identificar genes tanto de los *loci* monomórficos, como los de los *loci* polimórficos. Así como también posibilitan el muestreo aleatorio de los genes con respecto a la variación, con lo cual es posible cuantificar la variación promedio de la población sin tener conocimiento *a priori* de su variabilidad (Rosa-Vélez, 1986). De esta manera es posible estimar la cantidad de variación del genoma completo de una población, a través del estudio de un número moderado de individuos (Ayala, 1978).

3.1 Importancia de la genética en el manejo de recursos.

Existen por lo menos tres razones biológicas para creer que la genética puede ser la base de una importante y crítica área de la biología de la conservación. Primero, el "Teorema Fundamental de la Selección Natural" (Fisher, 1930) menciona que la tasa de cambio evolutivo en una población es proporcional a la cantidad de diversidad genética disponible. Cuando

decrece la diversidad genética en una población la tasa de cambio evolutivo potencial de la población reduce su respuesta ante los retos ambientales. Esencialmente, la pérdida de diversidad genética reduce las futuras opciones evolutivas.

Segundo, entre los genetistas dedicados al estudio de las poblaciones existe consenso en el sentido de que la heterocigosis, o una variación genética alta dentro de las poblaciones, guarda una relación positiva con la adaptación. La heterocigosis ya sea en *loci* simples o múltiples, puede conferir ventajas adaptativas a los individuos; así como una baja heterocigosis los conduce a una baja adaptación.

Finalmente, el "pool" génico global de la diversidad representa toda la información de los procesos que ha enfrentado la especie en relación con su desarrollo evolutivo y su interacción con el medio ambiente. Cada producto bioquímico, cada patrón de crecimiento, cada comportamiento instintivo, está codificado en una "biblioteca genética". La pérdida de tal diversidad reduciría la habilidad de los organismos para responder a los cambios ambientales, y también descartaría información biológica potencialmente útil para los humanos. El "pool" de diversidad genética existe en tres niveles: variación genética dentro de los individuos (heterocigosis), diferencias genéticas entre los individuos de una población, y diferencias entre las poblaciones. Cada nivel es un recurso genético de importancia potencial

para la conservación, por lo cual cada uno debe ser entendido en relación a los otros. La variación genética heredable es la base del cambio evolutivo, y es esencial si la selección natural opera a nivel de poblaciones. Las causas del cambio en la variación como son la selección, la deriva génica y el flujo génico, tienen un interés particular para la biología de la conservación, que trata de minimizar la pérdida de variación genética o los cambios en su distribución natural. La variación entre las poblaciones se debe a que las especies raramente existen solas; además existen siempre diferencias genéticas entre las poblaciones y estas diferencias geográfico-genéticas constituyen un componente importante de la diversidad genética.

La adaptación es extremadamente difícil de medir en la naturaleza (Endler, 1986), pero las características que parecen contribuir a la adaptación, tales como talla, fecundidad, eficiencia metabólica o tasa de crecimiento, frecuentemente pueden ser cuantificados. Muchos genetistas están de acuerdo en que la heterocigosis mejora las características relacionadas con la adaptación. La evidencia en este sentido es buena (Mitton y Grand, 1984, y Allendorf y Leary, 1986). No obstante, la pérdida de heterocigosis en una población, especialmente en pocas generaciones, puede indicar problemas reales (Frankel, 1983).

Los mecanismos que pueden trasladar una heterocigosis alta a una adaptación alta no han sido claramente entendidos. En algunos casos la alta

adaptación puede deberse a la sobredominancia de un *locus* simple o de *loci* múltiples, cuando el genotipo heterocigoto es superior al homocigoto. En otros casos, la alta adaptación puede derivar no de *loci* heterocigotos individuales, sino de alelos recesivos letales o subletales que están enmascarados por alelos alternativos. Esto es, la homocigosis en estos *loci* que podrían ser letales, o que por lo menos podrían reducir la adaptación, como ocurre particularmente en el entrecruzamiento.

Es importante señalar que la heterocigosis *per se* no necesariamente indica que ha ocurrido un cuello de botella demográfico, o que la población se encuentra en peligro genético. Sherwin *et al.* (1991), reportan estudios acerca de pequeñas poblaciones en peligro y aisladas, donde no se detectó variación en 27 *loci*, sugiriendo un efecto de población pequeña. Sin embargo, tampoco encontraron variación en dos poblaciones control grandes, indicando que el tamaño de la población por sí solo no cuenta para la baja diversidad genética de las especies objeto de su estudio.

Zourus y Foltz (1984), reportan que numerosos estudios electroforéticos sobre poblaciones naturales de moluscos bivalvos, en los cuales se correlaciona la heterocigosis con algunos componentes de la adaptación, tales como son las tasas de crecimiento, la fecundidad, etc, muestran una heterocigosis baja (Singh, 1984; Zourus, 1978).

Mayr (1969) argumenta que la especie es la única categoría taxonómica para la cual se tiene una definición objetiva. Todas las demás categorías, incluyendo la de subespecie, necesitan ser definidas por criterios más objetivos.

De acuerdo con el concepto de especie biológica se dice que la especiación (formación de nuevas especies mediante cualquier proceso), consiste en el desarrollo del aislamiento reproductivo (y por lo tanto genético) entre las poblaciones, el cual subsecuentemente resulta en patrones evolutivos diferentes, independientes de otras líneas.

Diferentes conceptos de lo que constituye una subespecie han sido empleados en sistemática y este nivel taxonómico generalmente corresponde a unidades genéticas definidas por electroforesis.

Desde el punto de vista de la conservación, el valor de este concepto en la identificación de unidades importantes de diversidad, puede evaluarse examinando su singularidad y juzgarse mediante datos electroforéticos, o bien, utilizando alguna otra medida de diversidad genética. Lo apropiado de una clasificación a nivel de subespecie, para definir la diversidad alélica en una especie en particular, puede determinarse aplicando el análisis de diversidad genética (Nei, 1972,1978; Chambers , 1980).

Mayr (1969), define especie como "grupos de entrecruzamiento en las poblaciones naturales, que están reproductivamente aislados de otros

grupos". De los muchos conceptos de especie que se utilizan actualmente este es el más aceptado por muchos zoólogos. Ya que ésta se considera una definición fundamentada genéticamente, debido a que el criterio esencial es el aislamiento reproductivo o recíprocamente, la habilidad para reproducir y además intercambiar material genético. Mayr (1969) explicó que, bajo este concepto, la especie tiene tres "funciones" separadas: constituye una unidad reproductiva, es una unidad ecológica y comprende una unidad genética, que consiste de un gran "pool" génico intercomunicado (Wiley, 1978). Los diferentes tipos de barreras reproductivas entre las especies han sido revisadas por Mayr (1963); incluyendo incompatibilidades en el comportamiento y en el desarrollo.

4. OBJETIVOS

El presente estudio tiene como objetivo principal analizar la estructura genética de dos poblaciones de *Chione cortezi* provenientes de sustratos diferentes, en el Alto Golfo de California, para establecer su nivel de variabilidad genética y su grado de estructuración.

Mediante la comparación de la variabilidad genética entre dos poblaciones de *Chione cortezi*, provenientes de distintos habitats, se probó la hipótesis de que el tipo de sustrato pudiera ser un factor que indujera determinado tipo de adaptaciones, las cuales probablemente se reflejarían en sus características genéticas.

Este trabajo pretende sentar un precedente importante en la gestión de recursos, mediante la aplicación de los resultados de los análisis genéticos a la evaluación de un recurso endémico, aportando información útil en el dictamen de factibilidad de explotación de la especie, en el cual se fundamente el aprovechamiento racional y sostenido del recurso.

5. AREA DE ESTUDIO

El área de estudio se encuentra ubicada dentro de la zona declarada, a partir de 1993, como “Zona de Reserva de la Biósfera del Alto Golfo de California”, en el Delta del Río Colorado. Esta es una zona muy rica en producción biológica (Farfán y Alvarez-Borrego, 1992). Se extiende desde el Puerto de San Felipe, B.C. ($31^{\circ} 05'N$, $114^{\circ} 50'W$), hasta el poblado de Golfo de Santa Clara, Son. ($31^{\circ} 45'N$, $114^{\circ} 28'W$) (Fig. 2).

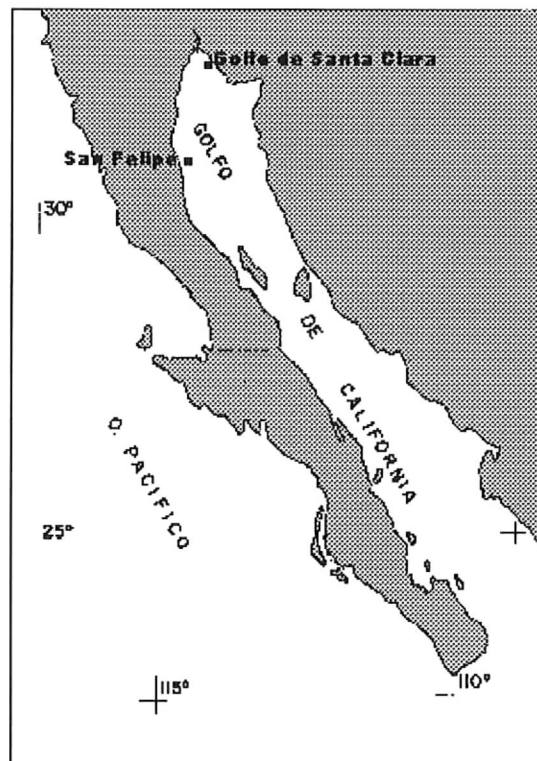
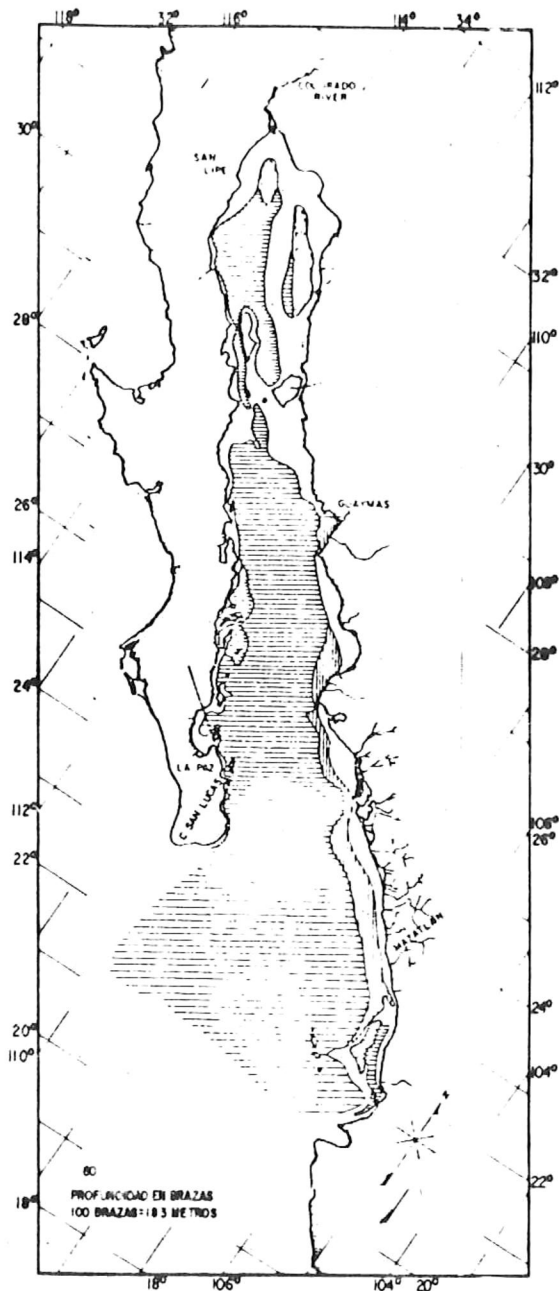


Figura 2.- Localidades de colecta en el área de estudio



El tipo de sedimento a lo largo de la línea de costa varía en esta zona formando, desde playas arenosas en San Felipe, B.C., hasta las playas limoso-arenosas cercanas al Delta del Río Colorado. La costa del lado sonorense es similar a la de Baja California, con playas lodosas en el extremo norte, cerca de la desembocadura del Río Colorado. En el Golfo de Santa Clara, a 20 Km al sur de este punto, el tipo de sustrato cambia a areno-limoso y, a medida que se avanza más en dirección sur, se encuentran playas de arena (Villarreal *et al.*, 1995).

Figura 3.- Mapa de sedimentos del Golfo de California (Parker, 1984).

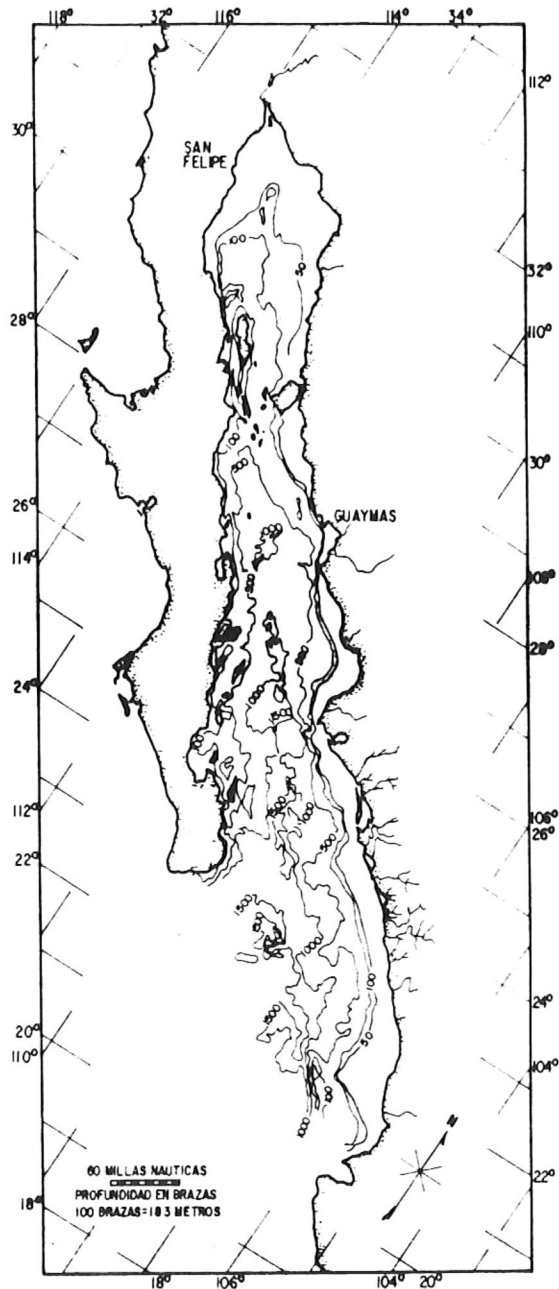


Figura 4.- Mapa de batimetría del Golfo de California (Parker, 1964).

De acuerdo con Brusca (1980), la península de Baja California es

una de las áreas peninsulares más grandes y más aisladas en el mundo. En la cabeza del Golfo se encuentra el Delta del Río Colorado el cual aporta alrededor del 50% de los sedimentos del Golfo, principalmente en el tercio superior, haciéndolo más plano y más somero que el resto (Fig.3).

Las aguas del norte del Golfo se caracterizan por ser heterogéneas y es común en ellas la presencia de patrones distribucionales localizados. En

general, las temperaturas de las aguas someras tanto costeras como deltaicas son afectadas principalmente por las temperaturas locales del aire

y por la circulación de mezcla de las corrientes de agua. La variación de la temperatura en las aguas superficiales de aguas más profundas, presenta variaciones considerablemente menores tanto en ciclos atmosféricos diurnos como estacionales.

A latitudes superiores a los 28° N en esta zona, existe una gran fluctuación estacional en la temperatura de la superficie del mar, que va desde los $30-32^{\circ}$ C hasta los $10-12^{\circ}$ C. La región de entremareas experimenta una fluctuación mayor a causa de la exposición periódica a las condiciones atmosféricas.

El Alto Golfo experimenta periódicamente inviernos excepcionalmente fríos, durante los cuales la temperatura del agua desciende hasta a 8° C ó menos, lo que trae como consecuencia grandes mortandades, principalmente de fauna estenotérmica subtropical, lo cual permite que dominen el habitat las formas euritérmicas. De hecho, la mayoría de las poblaciones animales que habitan regiones con estacionalidad muy marcada, como lo es el norte del Golfo de California, tienden a estar limitadas por las temperaturas invernales.

La temperatura de las aguas superficiales en el sur del Golfo (debajo de los 28° N) presenta menos fluctuaciones estacionales que en el norte. En

invierno las temperaturas más bajas alcanzan los 17- 18° C, y suben hasta 32 - 35° C en verano (Fig.5).

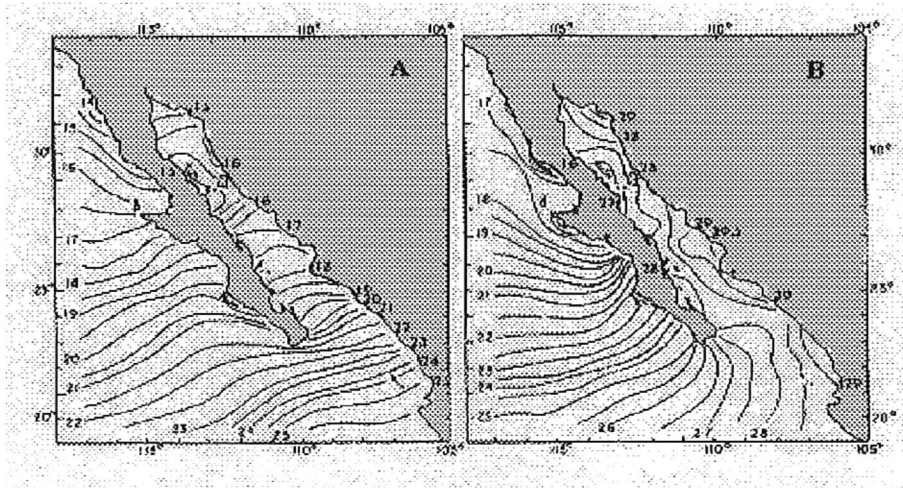


Fig. 5.- Isothermas de invierno (a) e isothermas de verano (b), del Gofu de California.

La mayor parte del Golfo actúa como una cuenca de evaporación, dando una salinidad superficial que comúnmente llega a ser de 1-4 partes por mil más alta que en la costa pacífico-bajacaliforniana. Las aguas someras en esta zona presentan una salinidad de 36 a 39 partes por mil, mientras que en el sur del Golfo la salinidad es cercana a la de mar abierto, aproximadamente de 35 a 36 partes por mil. Las salinidades más bajas se presentan en invierno y las más altas durante los meses de verano. Las altas salinidades en el norte del Golfo son en parte el resultado de la elevada evaporación en esta región semi-aislada, en donde la evaporación supera a la precipitación por aproximadamente por 250 cm al año en esta

zona, mientras que la evaporación del Golfo entero es de $5 \times 10^8 \text{ cm}^2/\text{seg}$. Las costas de Sonora y Sinaloa generalmente reciben mayores precipitaciones pluviales que las costas de Baja California.

Gran parte del intercambio de la mezcla de agua entre el norte y el sur del Golfo se realiza en la región del Delta del Río Colorado, donde el agua tibia e hipersalina de los numerosos canales de marea se junta con el agua fría menos salina que viene del sur, originando fuertes corrientes y mezclas de marea que traen como resultado temperaturas atípicas a todas las profundidades, frecuentemente más bajas en la superficie que en la subsuperficie. La turbulenta mezcla del agua fría del fondo con el agua tibia de la superficie produce elevadas temperaturas ocasionales y tiene un efecto directo sobre la costa de Baja California ya que, debido a estos movimientos de las masas de agua, los nutrientes del fondo son frecuentemente inyectados en las aguas superficiales (Brusca, 1964), lo cual hace de este sistema la zona de más alta productividad en México, (Santamaría Del Angel *et al.*, 1994).

6. MATERIAL Y METODOS

6.1 Nomenclatura de las poblaciones

En este estudio los organismos fueron separados en dos grupos de acuerdo al tipo de sustrato en que se colectaron, con el fin de determinar si este factor pudiera inducir cierto tipo de adaptaciones que se vieran reflejadas genéticamente. De esta manera se consideraron dos grupos: la población de *Chione cortezi* colectada en fondo arenoso, a la cual se denominó como CCAR, y la correspondiente al fondo de tipo limoso, denominada CCLI.

6.1.1 Colecta y transporte de los organismos:

La distribución geográfica de *Chione cortezi* se consideró, tomando los datos de la bibliografía existente. Las colectas dentro de la zona entremareas, en las playas donde se encuentra distribuída esta especie: El límite sur de su distribución se localiza a 5 Km al norte de San Felipe, B.C. en una zona de arena limosa, mientras que el límite norte corresponde al extremo norte de la isla de Motague, en el Delta del Río Colorado. Por la costa de Sonora se distribuye desde el Estero de Santa Bárbara hasta el pueblo de Golfo de Santa Clara (Villarreal, 1997).

Para efectos del presente trabajo se consideraron dos zonas de colecta: la zona sur, cercana a San Felipe, B.C. y la zona norte al Golfo de Santa Clara. En cada uno de los puntos se colocaron 12 cuadrantes de 9 m² con una separación de 100 m entre cada uno de ellos, en sentido perpendicular con respecto a la línea de costa, y cubriendo el área desde el límite inferior de la zona entremareas hasta su límite superior, escarbando a una profundidad aproximada 5 cm dentro del sedimento. En ambas localidades se colectaron organismos tanto en arena como en limo.

Los organismos se transportaron vivos hasta las instalaciones del Laboratorio de Genética del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la UABC, en Ensenada, B. C.,

6.2 Ensayos Electroforéticos

La selección del tejido (músculo aductor) y de la solución homogeneizadora, se determinó con base en estudios electroforéticos previos (Buroker *et al.*, 1975), para lo cual se agregaron al tejido 2 volúmenes de solución amortiguadora de Tris-HCl 0.1 M, pH 7.0, NAD⁺, NADP⁺, PVP (10: 1 : 1 : 100; v:p:p:p). El extracto crudo se centrifugó a 12,000 xg por 20 minutos a 4°C; se separó el sobrenadante en tubos tapados herméticamente y se congeló a -4°C, para su conservación.

Posteriormente fueron analizadas por el método de electroforesis horizontal en gel de almidón hidrolizado (Sigma Chemical Co., Lote # 123H0318), preparado al 10%, en el amortiguador correspondiente. Se emplearon cuatro soluciones amortiguadoras: A, B, C y D (Tabla I).

Tabla I.- Soluciones amortiguadoras.

A) Tris-citrato pH 8.0 (Selander *et al*, 1971)

ELECTRODO			GEL		
Tris	22.24	g	Diluir 36.4 ml del amortiguador en 1000 ml de agua destilada		
Acido cítrico	19.21	g			
Agua destilada	1000	ml			

B) Tris-EDTA-borato -LiOH pH 8.1 (Buroker *et al* 1975)

ELECTRODO			GEL		
Acido bórico	37.098	g	Acido bórico	2.5969	g
Hidróxido de litio	5.053	g	Hidróxido de litio	0.4616	g
Agua destilada	2000	ml	Tris	1.9134	g
			Acido cítrico	0.9605	g
			Agua destilada	1000	ml

C) Tris-EDTA-borato pH 8.6 (modificado de Wilson *et al*, 1973).

ELECTRODO			GEL		
Tris	60.57	g	Diluir el amortiguador del electrodo en agua destilada 1 : 9		
EDTA-Na	5.99	g			
Acido bórico	14	g			
Agua destilada	1000	ml			

D) Sistema discontinuo de Poulik (Poulik ,1957).

ELECTRODO (pH 8.2)			GEL (pH 8.7)		
Ac bórico	18.55	g	Tris	91.21	g
Na OH	2.4	g	Ac. cítrico anhidro	0.9605	g
Agua destilada	1000	ml	Agua destilada	1000	ml

Se analizaron ocho sistemas enzimáticos y se determinó el amortiguador más apropiado para cada uno de ellos, durante la fase de estandarización previa a los ensayos electroforéticos (Tabla II).

TABLA II.- Sistemas enzimáticos, amortiguadores y número de *loci* expresados.

Sistema enzimático	E. C. N. (Enzyme Comission Number)		Sist. amortiguador	Loci expresados
Enzima málica	E.C.1.1.1.40	(EM)	B	1
Glutamato oxalacetato transaminasa	E.C. 2.6.1.1	(GOT)	C	2
Isocitrato deshidrogenasa	E.C 1.1.1..42	(IDH)	B	1
Fosfoglucomutasa	E.C. 2.7.5.1	(PGM)	C	1
Esterasas	E.C. 3.1.1.1	(EST)	B	2
Leucinaminopeptidasa	E.C. 3.4.1.1	(LAP)	B	2
Fosfoglucosa isomerasa	E.C. 5.3.1.9	(PGI)	A	1
Peptidasas	E.C. 3.4.11/ 3.4.13 (PEP)		D	3

6.2.1 Preparación del gel

Para preparar el gel se empleó un matraz kitasato de 2000 ml y se suspendieron 50 gr de almidón en 200 ml del amortiguador seleccionado en la estandarización, con agitación continua, a temperatura ambiente. Al mismo tiempo, se calentaron 300 ml de solución amortiguadora del gel en una plancha hasta ebullición. Una vez que la solución hirvió, se vació en la suspensión de almidón, agitando vigorosamente. Se extrajo el aire contenido en el gel con una bomba de vacío, hasta que las burbujas grandes desaparecieron (30 a 60 seg). La mezcla se vertió en celdas de electroforesis, se colocaron los peines correspondientes y se dejó enfriar a temperatura ambiente durante toda la noche para ser usado al día siguiente.

Se inyectaron aproximadamente 50 μ l de cada uno de los homogeneizados en forma alternada, para facilitar la comparación de las dos poblaciones a simple vista, en los orificios formados en el gel al retirar los peines. La cuba del electrodo fue llenada con el amortiguador correspondiente, el cual se puso en contacto con el gel por medio de mechas de papel filtro Whatman #1. La charola se introdujo en un refrigerador a 4°C y se sometieron al paso de una corriente de 50 mA y un voltaje de 200 V, por un período de 7 horas para los sistemas amortiguadores A, B y C; y 10 h para el sistema D. Después de terminada

la electroforesis, se rebanaron los geles en capas de 2.5 mm. Estas se introdujeron en las tinciones histoquímicas específicas para cada sistema enzimático, según se muestra en la Tabla III.

Tabla III.- Tinciones histoquímicas utilizadas para revelar los sistemas enzimáticos

1.- Enzima málica (EM) (Schaal y Anderson, 1974)

a) Solución sustrato (EM):

ácido málico	1.34	g
Na ₂ CO ₃ 2 M	49	ml
agua destilada	51	ml

Disolver el ácido málico en el agua destilada, en un baño con hielo

Añadir lentamente la solución 2 M de Na₂ CO₃

Ajustar pH (7.0), con HCl concentrado

b) Teñir con:

Sol. sustrato (EM)	2.5	ml
NBT	10	mg
Mg Cl ₂ al 10 %	0.5	ml
MTT	20	mg
NADP	10	mg
PMS	5	mg
Tris-HCl 0.1M pH8.4	10	ml
Agua destilada	32	ml

c) Incubar a 37 °C hasta que las bandas azules aparezcan. Lavar con 50 ml de agua destilada y fijar.

2.- Esterasas (EST) (Shaw y Prasad, 1970)

a) Solución sustrato (EST):

1-naftil acetato	50	mg
2-naftil acetato	50	mg
Acetona	2.5	ml
Agua destilada	2.5	ml

Continuación de la Tabla III

b) Teñir con:

Sol. sustrato (EST)	1.5	ml
Azúl rápido BB	50	mg
Tris-HCl 0.5M pH 7.1	5	ml
Agua destilada	43.5	ml

c) Incubar a temperatura ambiente, en la oscuridad, hasta que las bandas oscuras aparezcan. Lavar con 50 ml de agua destilada y fijar.

3.- Isocitratodeshidrogenasa (IDH) (Shcaal y Anderson, 1974)

Tinción

Isocitrato de Na	75	mg
NADP	10	mg
Mn Cl ₂ . 4 H ₂ O	10	mg
NBT	10	mg
PMS	3	g
Tris-HCl 0.1M pH8.4	13	ml

c) Incubar a 37 °C hasta que las bandas azules aparezcan. Lavar con 50 ml de agua destilada y fijar.

4.- Leucin aminopeptidasa (LAP) (Shaw y Prasad, 1970)

a) Amortiguador de tinción tris-maleato pH 6.0

Solución A

Tris	1.21	g
Acido maleico	1.16	g
Agua destilada	50	ml

Solución B

Na OH	0.4	g
Agua destilada	50	ml

Mezclar: 25 ml sol. A + 13 ml sol. B + 62 ml agua destilada

b) Teñir con:

Sal rápida negra K	25	mg
L-leucil b-naftilamida	10	mg
Amort. Tris- maleato	25	ml
Agua destilada	25	ml

c) Incubar a 37 °C hasta que las bandas oscuras aparezcan. Lavar con 50 ml de agua destilada y fijar.

Continuación de la Tabla III

5.- Transaminasa glutámico-oxalacética (GOT) (Shcaal y Anderson, 1974)

a) Solución sustrato (GOT):

Acido a-ceto glutámico	36.5	mg
Acido L-aspartico	133	mg
EDTA	50	mg
PVP	500	mg
Na ₂ HPO ₄	1.42	g
Agua destilada	50	ml

b) Teñir con:

Sol. sustrato (GOT)	25	ml
Agua destila	25	ml
Azúl rápido BB	125	mg

c) Incubar a 37 °C sin el azúl rápido BB durante 15 minutos

d) Disolver el azúl rápido BB en 5 ml de la solución sustrato GOT, más el agua destilada

e) Incubar a 37 °C hasta que las bandas azules aparezcan. Lavar con 50 ml de agua destilada y fijar.

6.- Fosfoglucomutasa (PGM) (Shcaal y Anderson, 1974)

a) Teñir con:

Glucosa-1- fosfato	500	mg
EDTA	50	mg
NBT	20	mg
NADP	10	mg
PMS	2	mg
Mg Cl ₂ al 10 %	2	ml
G-6-PDH	80	U
Tris-HCl 0.1M pH 7.1	100	ml

b) Incubar a 37 °C hasta que las bandas aparezcan. Lavar con 50 ml de agua destilada y fijar.

Continuación de la Tabla III

7.- Peptidasas (PEP) (Abreu, 1983).

a) Teñir con:

Leucil-leucina	20	mg
Peroxidasa	10	mg
L- aminoácido oxidasa	5	mg
O-dianisidina	5	mg
Tris-HCl 0.1M pH 8	20	ml

b) Combinar con solución de agar hervido

Solución de agar:

Hervir 0.4 gr de agar en 15 ml de Tris - HCl 0.1M pH 8.0

Esperar que se enfríe a 30 °C aproximadamente.

Mezclar con la solución de tinción (a).

Extender sobre la superficie del gel mientras esté líquida, cuidando de no mover ni agitar la charola.

Incubar a 30 °C hasta que las bandas aparezcan.

Dejarlo toda la noche a temperatura ambiente, en la oscuridad si es necesario.

8.- (Fosfoglucosa-isomerasa) (PGI) (Abreu, 1983).

a) Teñir con:

Fructuosa-6-fosfato	40	mg
NADP	4	mg
MTT	7	mg
PMS	2	mg
G-6-PDH	20	U
Mg Cl ₂ al 10%	2	ml
Tris-HCl 0.1M pH8	30	ml

b) Incubar a 37°C hasta que las bandas aparezcan. Lavar con 50 ml de agua destilada y fijar.

6.2.2 Incubación del gel

El gel se incubó con una solución que reacciona con un sustrato específico para la enzima que se quiere revelar, las coenzimas o cofactores requeridos en la reacción y un amortiguador al pH óptimo de reacción de la enzima. Las zonas de actividad enzimática aparecen como bandas en el gel que se tiñen con un colorante adecuado (Rosa-Velez, 1986). Una vez terminado este proceso las placas de gel se sumergieron en una solución fijadora (metanol-ácido acético-agua, 3:1:6), se fotografiaron y se guardaron en bolsas de plástico herméticas.

6.3 Interpretación de los zimogramas:

Los zimogramas se interpretaron tomando en cuenta la variación de las aloenzimas de un mismo *locus*, considerando como homocigotos las representaciones de una sola banda y como heterocigotos las de dos o más bandas, según su estructura cuaternaria. Se hicieron los conteos correspondientes de las diferentes bandas para traducirlas en frecuencias alélicas, a partir del conteo de los electromorfos, ya que los fenotipos obtenidos en los zimogramas corresponden a los genotipos, lo cual permite igualar las frecuencias génicas, posibilitando la cuantificación de la

variación promedio en una muestra de *loci* seleccionados (Rosa-Velez, 1986) (Fig. 6).

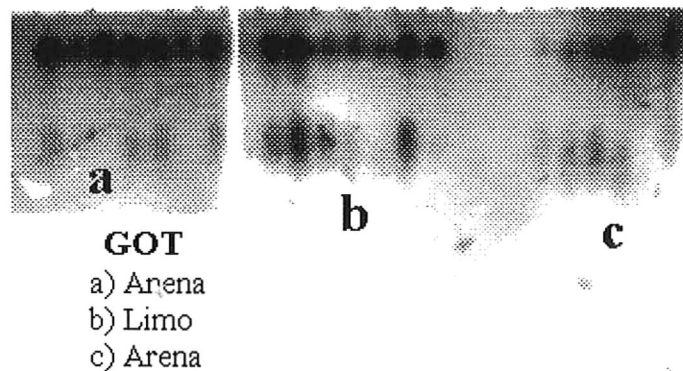


Figura 6- Zimograma de Glutamato oxalacetato transaminasa

6.4 Procesamiento estadístico de los datos

Las poblaciones genéticas se compararon mediante métodos estadísticos. Para el análisis de los datos se empleó el programa Biosys-1 (Swofford y Selander, 1981; adaptado por Swofford (1989) para su utilización en microcomputadora) (Maqueda, 1990). La prueba de F se obtuvo con el programa F Stat (Goudet, 1996), que proporciona los intervalos de confianza.

Los estimadores genéticos obtenidos fueron los siguientes: el grado de variabilidad genética inter e intrapoblacional se estableció midiendo el polimorfismo (P) y la heterocigosis (H). El polimorfismo se determinó a partir de las frecuencias alélicas, considerando polimórfico un *locus*

cuando el alelo más común presenta una frecuencia menor o igual a 0.95. Este cálculo corresponde a la división del número de *loci* variables, entre el número total de *loci* analizados (Ayala y Kiger, 1984). Y la heterocigosis se obtuvo bajo tres criterios: a) Heterocigosis observada por conteo directo (H_o), que se calculó a partir de la frecuencia de los individuos heterocigotos por *locus* (Ayala y Kiger, 1984); b) Heterocigosis esperada (H_e), que es la estimación usual basada en el equilibrio de Hardy-Weinberg; c) Heterocigosis esperada sin sesgo (Hess), que está basada en las expectativas condicionales de Levene (1949) y Nei (1978), para muestras pequeñas.

El equilibrio génico de las poblaciones, con respecto al modelo de Hardy-Weinberg, se determinó por medio de la prueba de bondad de ajuste de Ji-cuadrada, que se aplicó en todos los loci, para determinar el grado de significancia entre las diferencias de los valores de las heterocigosis esperada y observada, tanto para los datos no agrupados, como para los agrupados. Los grados de libertad se consideraron como el resultado de la resta del número de genotipos menos el número de alelos.

Para probar si las poblaciones presentan un exceso o una deficiencia de heterocigosis, con respecto al equilibrio teórico de Hardy-Weinberg, se

aplicó el estimador D , y se obtuvo el índice de fijación F para los diferentes alelos.

Se consideró conveniente aplicar los estimadores de similitud (I) y distancia genética (D) según la prueba sin sesgo de Nei (1978), para establecer la identidad genética entre las dos poblaciones y con este valor calcular el número acumulado de diferencias génicas interpoblacionales, y así determinar el grado de separación filogenética entre ellas.

Para comparar la homogeneidad de las frecuencias génicas en las poblaciones estudiadas, y así establecer tanto el grado de estructuración de cada una, como el nivel de flujo génico existente entre ellas, se hizo un análisis mediante la prueba de F para lo cual se utilizó el programa FSTAT (Goudet, 1996).

7. RESULTADOS:

En la Tabla IV se enlistan los valores de las frecuencias alélicas y los valores de heterocigosis esperada y observada, así como el número de organismos analizados para cada uno de los 13 *loci* en las dos poblaciones estudiadas. Las letras A, B y C representan las diferentes movilidades de los alelos. A excepción de EM-2 e IDH-1, todas los demás *loci* son polimórficos en ambas poblaciones; ésto se debe a un sesgo involuntario en la selección azarosa de los geles.

La heterocigosis observada resultó ser menor a la esperada conforme al equilibrio de Hardy-Weinberg, de acuerdo a la estimación sesgada de Nei (1978), a un nivel de significancia de 0.99, ya que los valores de heterocigosis observada en las poblaciones estudiadas se encuentran entre 0.221 ± 0.074 y 0.125 ± 0.034 , con un valor promedio de 0.172 ± 0.045 (Tabla V) . El polimorfismo promedio en las dos poblaciones fué de 84.62%.

Las Tablas VIa y VIb muestran los resultados obtenidos mediante la prueba de Ji cuadrada. Se encontraron fuera del equilibrio de Hardy-Weinberg la mayoría de los *loci* de *Chione cortezi* de fondo arenoso, a excepción de EST-1, PEP-2 y PEP-3 para valores agrupados. Así como

todos los *loci* para la población de *Chione cortezi* en fondo limoso, a un nivel de significancia de 0.95.

Los valores obtenidos para la prueba del estimador D (Tabla VII), indican que en el caso de la población de habitat limoso, en todos los *loci* existe una deficiencia de heterocigosis. En cambio, para la población de habitat arenoso, esta deficiencia se presenta en la mayoría de los *loci*, a excepción de EST-1, GOT-1 y PEP-3.

El análisis integral de las frecuencias alélicas y genotípicas de las poblaciones muestra un valor promedio de similitud de 0.939, y de 0.063 de distancia genética.

El análisis del grado de estructuración entre las poblaciones muestra un valor de F_{st} tendiente a cero, y un valor de F_{it} mayor al de F_{is} , a un nivel de significancia de 95% (Tabla VIII).

Tabla IV.- Frecuencias alélicas de las poblaciones de *Chione cortezi*, según el equilibrio de Hardy-Weinberg: CCAR = *C. cortezi* fondo arenoso, CCLI = *C. cortezi* fondo limoso. n = número de alelos, He = heterocigosis esperada, He (ss) = heterocigosis esperada sin sesgo, Ho = heterocigosis observada (conteo directo).

LOCUS	ALELO	CCAR	CCLI
EM-2	n	27	21
	A	1.000	1.000
EST-1	n	16	18
	A	0.938	0.806
	B	0.063	0.194
	He	0.117	0.313
	He(ss)	0.121	0.322
	Ho	0.125	0.167
EST-3	n	33	37
	A	0.288	0.203
	B	0.712	0.797
	He	0.410	0.323
	He(ss)	0.416	0.328
	Ho	0.152	0.135
GOT-1	n	41	41
	A	0.573	0.024
	B	0.402	0.902
	C	0.024	0.073
	He	0.509	0.180
	He(ss)	0.515	0.182
GOT-3	n	34	35
	A	0.206	0.300
	B	0.735	0.586
	C	0.059	0.114
	He	0.413	0.554
	He(ss)	0.420	0.562
IDH-1	n	15	12
	A	1.000	1.000
LAP-1	n	20	27
	A	0.650	0.667
	B	0.350	0.333
	He	0.455	0.444
	He(ss)	0.467	0.453
	Ho	0.000	0.074
LAP-2	n	25	28
	A	0.120	0.232
	B	0.880	0.768
	He	0.211	0.357
	He(ss)	0.216	0.363
	Ho	0.080	0.036

Tabla IV (Continuación)

PEP-1	n	35	33
	A	0.357	0.424
	B	0.557	0.394
	C	0.086	0.182
	He	0.555	0.632
	He(ss)	0.563	0.641
	Ho	0.143	0.212
PEP-2	n	11	18
	A	0.318	0.361
	B	0.273	0.417
	C	0.409	0.222
	He	0.657	0.647
	He(ss)	0.688	0.665
	Ho	0.455	0.389
PEP-3	n	13	15
	A	0.500	0.300
	B	0.000	0.367
	C	0.500	0.333
	He	0.500	0.664
	He(ss)	0.520	0.687
	Ho	0.692	0.267
PGI-1	n	38	36
	A	0.092	0.125
	B	0.882	0.861
	C	0.026	0.014
	He	0.214	0.243
	He(ss)	0.216	0.246
	Ho	0.079	0.056
PGM-2	n	35	26
	A	0.257	0.173
	B	0.343	0.500
	C	0.400	0.327
	He	0.656	0.613
	He(ss)	0.666	0.625
	Ho	0.286	0.231

Tabla V.- Variabilidad genética en 13 loci de las poblaciones separadas de acuerdo al tipo de sustrato y en su conjunto, determinada por medio de las frecuencias alélicas. CCAR = *Chione cortezi* en fondo arenoso, CCLI = *Chione cortezi* fondo limoso.

POBLACION	TAMAÑO PROM. DE MUESTRA /LOCUS	NUMERO PROM. DE ALELOS/LOCUS	PORCENTAJE <u>LOCI</u> POLIMORFICOS *	<u>HETEROCIGOSIS</u>	<u>PROMEDIO</u>
				CONTEO DIRECTO	HDY-WBG ESPERADO *
	(D. E.)	(E. E.)		(E. E.)	(E. E.)
CCAR	26.4 (2.9)	2.3 (0.2)	84.6	0.221 (0.074)	0.361 (0.064)
CCLI	26.7 (2.6)	2.4 (0.2)	84.6	0.125 (0.034)	0.382 (0.065)
CCAR + CCLI	53.1 (5.3)	2.4 (0.2)	84.6	0.172 (0.045)	0.392 (0.064)

* Criterio 0.095, 0.099

** Estimación segada.

(D. E.) Desviación estándar

(E. E.) Error estándar

Tabla VI a .- Análisis de bondad de ajuste de Ji cuadrada para probar el equilibrio genético de la población de *Chione cortezi* en fondo arenoso, de acuerdo al modelo de Hardy-Weinberg. Niveles de significancia: (*) 95 %, (**) 99 % y (***) 99.9 %. N.S. = no significativo, S. = significativo, A.S. = altamente significativo.

LOCUS	TIPO	FRECUENCIA OBSERVADA	FRECUE ESPERADA	Ji CUADRADA	P	GRADOS DE LIBERTAD	SIGNIFI- CANCIA
EST-1	A-A	14	14.032	0.034	0.853	1	N. S. *
	A-B	2	1.935				
	B-B	0	0.032				
EST-3	A-A	7	2.631	13.963	0.000	1	A. S ***
	A-B	5	13.738				
	B-B	21	16.631				
GOT-1	A-A	7	13.346	100.544	0.000	3	A. S ***
	A-B	33	19.148				
	A-C	0	1.160				
	B-B	0	6.519				
	B-C	0	0.815				
	C-C	1	0.012				
	(Valores Agrupados)						
	a) HOMO	7	13.346	16.430	0.000	1	A. S ***
	b) HETERO	33	20.309				
	c) OTROS	21	7.346				
GOT-3	A-A	7	1.138	46.087	0.000	3	A. S ***
	A-B	0	10.448				
	A-C	0	0.836				
	B-B	24	18.284				
	B-C	2	2.985				
	C-C	1	0.090				
	(Valores Agrupados)						
	a) HOMO	8	18.284	25.828	0.000	1	A. S ***
	b) HETERO	2	13.433				
	c) OTROS	24	2.284				
LAP-1	A-A	13	8.333	21.280	0.000	1	A. S ***
	A-B	0	9.333				
	B-B	7	2.333				
LAP-2	A-A	2	0.306	11.652	0.001	1	A. S ***
	A-B	2	5.388				
	B-B	21	19.306				
PEP-1	A-A	11	4.348	39.957	0.000	3	A. S ***
	A-B	3	14.130				
	A-C	0	2.174				
	B-B	17	10.739				
	B-C	2	3.391				
	C-C	2	0.217				
	(Valores Agrupados)						
	a) HOMO	13	10.739	18.415	0.000	1	A. S ***
	b) HETERO	5	17.522				
	c) OTROS	17	6.739				

Tabla VI a (continuación)

PEP-2	A-A	1	1.000				
	A-B	0	2.000				
	A-C	5	3.000				
	B-B	3	0.714				
	B-C	0	2.571				
	C-C	2	1.714	13.267	0.004	3	S.**
	(Valores Agrupados)						
(Valores Agrupados)	a) HOMO	2	1.714				
	b) HETERO	5	5.571				
	c) OTROS	4	3.714	0.128	0.720	1	N. S.*
PEP-3	A-A	2	3.120				
	A-B	0	5.217				
	A-C	9	6.760				
	B-B	0	5.156				
	B-C	0	5.491				
	C-C	2	3.120	1.546	0.214	3	N. S.*
	(Valores Agrupados)						
(Valores Agrupados)	a) HOMO	4	3.518				
	b) HETERO	9	6.923				
	c) OTROS	0	3.486	0.118	0.745	1	N.S.*
PGI-1	A-A	2	0.280				
	A-B	3	6.253				
	A-C	0	0.187				
	B-B	32	29.480				
	B-C	0	1.787				
	C-C	1	0.013	87.460	0.000	3	A. S.***
	(Valores Agrupados)						
(Valores Agrupados)	a) HOMO	32	29.480				
	b) HETERO	3	8.040				
	c) OTROS	3	0.480	16.605	0.000	1	A. S.***
PGM-2	A-A	7	2.217				
	A-B	4	6.261				
	A-C	0	7.304				
	B-B	7	4.000				
	B-C	6	9.739				
	C-C	11	5.478	27.687	0.000	1	A. S.***
	(Valores Agrupados)						
(Valores Agrupados)	a) HOMO	11	5.478				
	b) HETERO	6	17.043				
	c) OTROS	18	12.478	15.165	0.000	1	A. S.***

Tabla VI b .- Análisis de bondad de ajuste de Ji cuadrada para probar el equilibrio genético de la población de *Chione cortezi* en fondo limoso, de acuerdo al modelo de Hardy-Weinberg. Niveles de significancia correspondientes son: (*) 95 %, (**) 99 % (***) 99.9 %. N.S. = no significativo, S. = significativo, A.S. = altamente significativo.

LOCUS	TIPO	FRECUENCIA OBSERVADA	FRECUE N ESPERADA	Ji CUADRADA	P	GRADO DE LIBERTAD	SIGNIFI- CANCIA
EST-1	A-A	13	11.66	4.748	0.029	1	S. * N.S. **
	A-B	3	5.800				
	B-B	2	0.600				
EST-3	A-A	5	1.438	13.546	0.000	1	A.S. ***
	A-B	5	12.123				
	B-B	27	23.438				
GOT-1	A-A	1	0.012	129.655	0.000	3	A.S. ***
	A-B	0	1.827				
	A-C	0	0.148				
	B-B	37	33.346				
	B-C	0	5.481				
	C-C	3	0.185				
	(Valores Agrupados)						
	a) HOMO	37	33.346	46.340	0.000	3	A. S ***
	b) HETERO	0	7.309				
	c) OTROS	4	0.346				
GOT-3	A-A	10	3.043	54.315	0.000	3	A. S ***
	A-B	0	12.478				
	A-C	1	2.435				
	B-B	20	11.884				
	B-C	1	4.754				
	C-C	3	0.406				
	(Valores Agrupados)						
	a) HOMO	20	11.884	32.027	0.000	3	A. S ***
	b) HETERO	1	17.232				
	c) OTROS	14	5.884				
LAP-1	A-A	17	11.887	19.810	0.000	1	A. S ***
	A-B	2	12.226				
	B-B	8	2.887				
LAP-2	A-A	6	1.418	24.343	0.000	1	A. S ***
	A-B	1	10.164				
	B-B	21	16.418				
PEP-1	A-A	11	5.585	30.517	0.000	3	A. S ***
	A-B	3	11.200				
	A-C	3	5.169				
	B-B	11	5.000				
	B-C	1	4.800				
	C-C	4	1.015				
	(Valores Agrupados)						
	a) HOMO	11	5.815	13.676	0.000	3	S. **
	b) HETERO	6	16.369				
	c) OTROS	16	10.815				

Tabla VI b (continuación)

PEP-2	A-A	3	2.229				
	A-B	3	5.571				
	A-C	4	2.971				
	B-B	6	3.000				
	B-C	0	3.429				
	C-C	2	0.800	10.038	0.018	3	S. *
							N.S. **
(Valores	Agrupados)						
	a) HOMO	6	3.000				
	b) HETERO	3	9.000				
	c) OTROS	9	6.000	8.500	0.004	1	S. **
PEP-3	A-A	3	1.241				
	A-B	0	3.414				
	A-C	3	3.103				
	B-B	5	1.897				
	B-C	1	3.793				
	C-C	3	1.552	14.395	0.002	3	S. **
(Valores	Agrupados)						
	a) HOMO	5	1.897				
	b) HETERO	1	7.207				
	c) OTROS	9	5.897	12.057	0.001	1	A. S ***
PGI-1	A-A	4	0.507				
	A-B	1	7.859				
	A-C	0	0.127				
	B-B	30	26.634				
	B-C	1	0.873				
	C-C	0	0.000	30.620	0.000	3	A. S ***
(Valores	Agrupados)						
	a) HOMO	30	26.634				
	b) HETERO	2	8.732				
	c) OTROS	4	0.634	23.494	0.000	1	A. S ***
PGM-2	A-A	3	0.706				
	A-B	3	4.588				
	A-C	0	3.000				
	B-B	10	6.373				
	B-C	3	8.667				
	C-C	7	2.667	23.817	0.000	3	A. S ***
(Valores	Agrupados)						
	a) HOMO	10	6.373				
	b) HETERO	6	13.255				
	c) OTROS	10	6.373	8.101	0.004	1	.S *
							N.S. **

Tabla VII.- Estimador D en las poblaciones de *Chione cortezi* en fondo arenoso (CCAR) y en fondo limoso (CCLI).

LOCUS	HETEROCIGOTOS OBSERVADOS		HETEROCIGOTOS ESPERADOS		ESTIMADOR D	
	CCAR	CCLI	CCAR	CCLI	CCAR	CCLI
EST-1	2	3	1.935	5.800	0.033*	-0.483
EST-3	5	5	13.738	12.123	-0.636	-0.588
GOT-1	33	0	21.123	7.457	0.562*	-1.000
GOT-3	2	2	14.269	19.667	-0.860	-0.898
LAP-1	0	2	9.333	12.226	-1.000	-0.836
LAP-2	2	1	5.388	10.164	-0.629	-0.902
PEP-1	5	7	19.696	21.169	-0.746	-0.669
PEP-2	5	7	5.571	11.971	-0.340	-0.415
PEP-3	9	4	6.760	10.310	0.331*	-0.612
PGI-1	3	2	8.227	8.859	-0.635	-0.774
PGM-2	10	6	23.304	16.255	-0.571	-0.631

(*) La diferencia entre H_o y H_e , respecto al equilibrio de Hady - Weinberg, no es estadísticamente significativa.

Tabla VIII.- Prueba de F promedio para todos los loci, interrelacionando las dos subpoblaciones, respecto al tipo de sustrato: *Chione cortezi* en fondo arenoso (CCAR) y *Chione cortezi* fondo limoso (CCLI).

F	CCAR / CCLI (comparación)	INTERVALO DE CONFIANZA 95%
F(is)	0.646	0.509 - 0.800
F(it)	0.648	0.518 - 0.800
F(st)	0.006	- 0.012 - 0.027

F(is) Determina el grado de endogamia de una población.

F(it) Se refiere a la homogeneidad de una población con respecto a las otras.

F(st) Determina el nivel de estructuración de una población.

8. DISCUSION

De acuerdo con numerosos estudios electroforéticos la deficiencia de heterocigosis en los distintos *loci* constituye una de las características genéticas más importantes entre las poblaciones naturales de invertebrados marinos, especialmente en moluscos bivalvos (Volkaert y Zourus, 1989). Existen en la literatura numerosos reportes de deficiencia de heterocigosis en uno o más *loci* enzimáticos, para alrededor de dos docenas de especies de moluscos bivalvos en poblaciones naturales (Zourus y Foltz, 1984). Este es el caso de varias especies de *Mytilus*, *Macoma* y *Crassostrea* (Singh y Green, 1985).

La heterocigosis esperada, calculada a partir de las frecuencias alélicas en la población por medio de la ecuación de Hardy-Weinberg, es considerada la mejor medida para evaluar la diversidad génica ya que estima la probabilidad de que dos alelos de la población tomados al azar, sean diferentes (Ayala y Kiger, 1984).

En este estudio la heterocigosis por conteo directo resultó ser menor a la esperada conforme al equilibrio de Hardy-Weinberg, o sea que el número observado de individuos heterocigotos para un *locus* polimórfico determinado, es significativamente más bajo que el número esperado de acuerdo con el modelo de Hardy-Weinberg (Saavedra *et al.*, 1987). Sin

embargo, se obtuvieron valores superiores al valor de heterocigosis promedio para invertebrados marinos (0.124), calculado por Ayala y Kiger, (1984), (Maqueda, 1990).

La deficiencia de heterocigotos respecto a Hardy-Weinberg se manifiesta también como un desequilibrio genético de la población de *Chione cortezi* (sustrato arenoso), evidente en las deficiencias altamente significativas que se presentan en la mayoría de los *loci*, a excepción de EST-1 y PEP -3, y para los valores agrupados PEP-2, en la población de CCAR a un nivel de confianza de 0.99. En la población de CCLI solamente EST-1 y PEP -2 no presentan deficiencias significativas (Tabla VI).

Dichas deficiencias se observan también en los valores de D (Tabla VII), donde a excepción de EST-1, GOT-1 y PEP-3; los demás *loci* presentan una heterocigosis deficiente con relación al equilibrio de Hardy-Weinberg.

Para explicar las causas de la baja heterocigosis, diversos autores han sugerido diferentes explicaciones no seleccionistas, tales como la autofertilización (Hornbach *et al.*, 1980), la presencia de alelos nulos (Milkman y Beaty, 1970), los resultados sesgados (Ayala *et al.*, 1973; Buroker *et al.*, 1975), el efecto de Wahlund o la subdivisión de las poblaciones (Colgan, 1981), o bien, una selección en contra de los heterocigotos (Beaumont, 1982).

La mayoría de estas explicaciones han sido discutidas como factores únicos de la deficiencia de heterocigotos en bivalvos (Gosling, 1982). Este resultado parece descartar la autofertilización u otras formas de entrecruzamiento cercano como explicación de la deficiente heterocigosis en bivalvos, a causa de los dinámicos procesos que tienen lugar en el Alto Golfo, ocasionados por corrientes debidas a las mareas, a los gradientes de salinidad y temperatura, esfuerzo de vientos locales, etc.

Para los resultados del presente trabajo, una explicación plausible sería la selección natural, tomando en cuenta que los análisis genéticos de poblaciones de larvas han demostrado ser útiles para resolver la "paradoja de la heterocigosis" de los bivalvos marinos, dada por la sustancial deficiencia de heterocigotos que presentan algunos *loci* durante la etapa larvaria y juvenil.

Los efectos de la heterocigosis sobre los fenotipos de interés evolutivo en poblaciones naturales de animales han sido estudiados por Mitton y Grant (1984) y Zourus y Foltz (1984). Con base en estos estudios, además de muchos otros que demuestran una asociación entre la heterocigosis y los componentes de la adaptación (sobrevivencia, resistencia a las enfermedades, crecimiento, tasa y estabilidad de desarrollo), Allendorf y Leary (1986), concluyen que en general hay una

relación positiva entre heterocigosis y adaptación; en los heterocigotos existe una tendencia a incrementar la supervivencia, la resistencia a las enfermedades, la tasa de crecimiento y la estabilidad en el desarrollo. En resumen, se puede concluir que la pérdida de heterocigosis hace a las especies más vulnerables a la extinción (Allendorf y Leary, 1986).

Algunos estudios de bivalvos marinos han indicado que las deficiencias de heterocigotos son más marcadas en clases de talla pequeña (Kohen *et al.*, 1976). Estos resultados podrían sugerir que los heterocigotos tienen menor viabilidad que los homocigotos, al menos durante su etapa larvaria (Milkman y Kohen, 1977), no obstante que los rangos de crecimiento son genotipo-dependientes (Zourus *et al.*, 1980).

Por otra parte, la Teoría del equilibrio de Hardy-Weinberg es el punto de referencia a partir del cual se pueden calcular los efectos de los procesos de cambio, mutación, migración o flujo génico, deriva génica y selección. Todos estos cambios son acumulativos si los alelos se fijan y su fijación o su pérdida dependen en gran parte de la selección (Ayala y Kiger, 1984).

Se ha intentado cuantificar la divergencia genética que se requiere para establecer un aislamiento reproductivo. Estudios hechos por Ayala, *et al* (1974), compara el promedio de identidades y distancias genéticas basadas en electroforesis, entre poblaciones con grados variables de

divergencia taxonómica. Estas comparaciones revelan que la distancia genética aumenta cuando se incrementa la distancia taxonómica

En el presente estudio se observa que *Chione cortezi* no presentó selectividad respecto al tipo de sedimento disponible, esto concuerda con el alto valor de similitud genética interpoblacional obtenido, según los estimadores de similitud y distancia genética de Nei (1972). El análisis integral de las frecuencias alélicas y genotípicas de las poblaciones revela una población homogénea cuyo valor de similitud es de 0.939. Este valor tan alto podría disminuir si se incluyeran también los *loci* monomórficos, ya que se debe al sesgo involuntario en la elección azarosa de los *loci*, los cuales son variables en su mayoría.

Según la prueba sin sesgo de similitud y distancias genéticas de Nei (1972), es posible medir, a partir del número acumulado de diferencias génicas, el grado de identidad genética entre distintas poblaciones, y establecer el nivel de separación filogenética entre ellas.

A su vez, la magnitud de la diferenciación intraespecífica de las poblaciones dentro de una especie a través del tiempo, como resultado de la acción de fuerzas evolutivas, puede cuantificarse de manera adecuada por medio de la prueba de F_{st} , que mide el grado en que están relacionados los alelos en una población.

Cockerham (1996) describió los parámetros básicos de esta prueba de la siguiente manera: F , es el coeficiente de entrecruzamiento total en la población; F_{it} , es la correlación de alelos dentro de los individuos respecto a la población; F_{st} , es la correlación de los alelos de diferentes individuos en la misma población y F_{is} , corresponde a la correlación de los alelos dentro de los individuos y dentro de la población. Si se acepta el supuesto de que las poblaciones se aislaron a partir de una población ancestral, entonces los alelos se comportan de forma independiente entre sí (Weir, 1992).

De acuerdo con los los valores obtenidos para F_{st} , la población total no está subdividida. Los resultados muestran que F_{st} tiende a cero, la heterogeneidad poblacional es sólo de 0.006 entre los *loci* de las dos poblaciones, respecto a las frecuencias de sus alelos.

Por otro lado, existe un flujo génico importante entre las dos poblaciones, ya que el valor de F_{it} tiende a 1. También se encuentra que la homogeneidad interpoblacional (F_{it}), es mayor a la homogeneidad intrapoblacional (F_{is}), lo que indica que no existe aislamiento reproductivo.

Otro aspecto importante de este estudio es que el análisis de variabilidad genética puede enfocarse desde dos perspectivas diferentes:

una desde el punto de vista biogeográfico, y otra desde la de la conservación del recurso.

En biogeografía es usual encontrar especies con distribuciones restringidas, tal como es el caso del endemismo. Los factores bióticos y abióticos que determinan el que una especie se considere dentro de esta categoría biogeográfica pueden ser de diversa índole, basta revisar los trabajos de Mayr (1969). El endemismo puede ser de diferentes tipos, dependiendo de su origen evolutivo. Las especies endémicas se pueden clasificar como neoendémicas o de origen relativamente reciente ó como paleoendémicas o relictos, en el caso de especies que por diferentes causas han visto restringida su área de distribución original.

A partir de los resultados de variabilidad genética de *Chione cortezi*, se puede inferir que esta especie es neoendémica, ya que sus valores de heterocigosis son relativamente altos (aunque deficientes de acuerdo con Hary-Weinberg), con respecto a los de otros bivalvos.

También desde el punto de vista de la conservación, aunque se registran deficiencias de heterocigosis, las cuales fueron previamente explicadas en función de diferentes teorías, se puede afirmar que esta especie presenta niveles relativamente altos de variabilidad genética, y que la población no tiende a la endogamia, por el contrario, se detecta un flujo

génico importante entre las poblaciones, lo cual indica que mantiene una buena salud genética.

Con base en lo anterior se puede considerar a *Chione cortezi* una especie susceptible de continuar siendo aprovechada como recurso de explotación comercial, bajo normas que reglamenten el aprovechamiento del recurso y garanticen la conservación de la especie.

9. CONCLUSIONES

- *Chione cortezi* presenta niveles de variabilidad altos, esta característica denota una buena salud genética.
- De acuerdo con las frecuencias alélicas y al valor de identidad genética entre los dos grupos estudiados (CCAR y CCLI), se infiere que el tipo de sustrato no influye a nivel génico.
- Los valores de F_{st} indican que la población de *Chione cortezi* no se encuentra subdividida, lo cual demuestra que existe un flujo génico importante y, por lo tanto, no presenta tendencia a la endogamia.
- Desde un punto de vista biogeográfico, *Chione cortezi*, se puede definir como una especie neoendémica del Alto Golfo de California. Dado que es una especie con una variabilidad relativamente alta, a pesar de su distribución restringida es susceptible de continuar siendo aprovechada como recurso de explotación comercial.

10. RECOMENDACIONES

- Dado que todo indica que *Chione cortezi* es una especie neoendémica que no tiende a la endogamia, se considera factible continuar con su explotación comercial. Dicha explotación debería seguir los criterios de desarrollo sustentable, que es aquel que satisface las necesidades del presente sin comprometer los recursos de las futuras generaciones, y sin dañar ni el medio ni la diversidad biológica.

- No obstante que *Chione cortezi* mantiene niveles de variabilidad relativamente altos, lo cual es indicio de una buena salud genética, se considera conveniente realizar estudios previos sobre la biología y la evaluación de esta población/especie. Estos permitirían reglamentar y controlar el uso de este recurso natural, desde una perspectiva a largo plazo, para no alterar su condición actual y para prevenir su desaparición.

LITERATURA CITADA

- Abreu-Grobois, (1983). Population genetics of *Artemia*. Tesis Doctoral. University College of Swansea, Wales. 438 pp.
- Allendorf, F. W. and Leary, R. F. In Soulé, M. E. (1986). Conservation Biology. The Science of Scarcity and Diversity. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, MA.
- Ayala, F. J., D. Hedgecock, G. S. Zummalt and J. W. Valentine. (1973). Genetic variation in *Tridacna maxima*, an ecological analog of some unsuccessful evolutionary lineages. *Evolution*. 27:177-191.
- Ayala, F. J. and J. A. Kiger (1984). *Genética Moderna*. Fondo educativo Interamericano. México. 863 pp.
- Ayala, F. J. and J. W. Valentine. (1974). Genetic variability in the cosmopolitan deep-water ophiuran *Ophiomisuim lymani*. *Mar. Biol.* 27: 51-57.
- Beardmore, A. J. and Abreu-Grobois, F. B. (1983). Taxonomy and evolution in the brine shrimp *Artemia* In G. S. Oxford and D. Rollison (eds.), *Adaptation and Taxonomic Significance of Protein Variation*. Academic Press, New York.
- Beaumont, A.R. (1982). Variations in heterozygosity at two loci between year classes of a population of *Chlamys opercularis* (L.) from a Scottish se Loch. *Marine Biology Letter*, 3:25-33.
- Brow, T.A. (1993). *Essential Molecular Biology. A Practical Approach*. The Practical Approach Series. Series Editors: D. Rickwood & B. D. Hames. U. K.
- Brusca, R. C. (1980). Common intertidal invertebrates of the Gulf of California. The University of Arizona. Press. Tucson, Arizona U.S.A. pp 9-31.

- Buroker, N. E. , Hershberg, W. K. and CheW, K. K., (1975). Genetic variation in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. J. Fish. Res. Board. Can. 32:2471-2477.
- Cantera, J. R., (1991). Shallow-water venerid clams (Bivalvia: Veneridae) from the Pacific Coast of Colombia. The Veliger 34(1):78-84.
- Chambers, S. M. (1980). Genetic divergence between populations of *Goniobasis* (Pleuoceridae) occupying different drainage systems. Malacologia. 20:63-81.
- Cockerham C. C. and Weir, B. S. (1996). Estimation of inbreeding parameters in stratified populations. Ann. Human. Genet. 50:271-281.
- Colgan, D. J. (1981). Spatial and temporal variation in the genotypic frequencies of the mussel *Brachiodontes rostratus*. Heredity. 46:197-208.
- Endler, (1986). In Meffe, G. K. and Carroll, C. R. (1994). Principles of Conservation Biology. Sinauer Associates Inc. USA.
- Farfán, C. and Alvarez-Borrego, S. (1992). Zooplankton biomass of the northernmost Gulf of California. Ciencias Marinas, 18(3):17-36.
- Fisher, (1930). In Meffe, G. K. and Carroll, C. R.. (1994). Principles of Conservation Biology. Sinauer Associates Inc. USA.
- Frankel, O. H., and M. E. Soulé (1981). Conservation and Evolution. Canbrdge University Press, Cambridge, England.
- Gosling, E. (1982). Genetic variability in the hatchery-produced Pacific oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg). Aquaculture. 26:273-287.
- Goudet, J. (1996). A program for IBM PC compatibles to

calculate Weir & Cockerham's '(1984) estimators of Fstatistics (versión 1.2). Université de Lausanne, Switzerland.

- Hornbach, D. J. McLeod, M. J. Guttman, S. i. and Seilkop, S.K. (1980). Genetic and morphological variation in the freshwater clam, *Sphaerium* (Bivalvia: Sphaeridae). *Journal of Molluscan Studies*. 46:158-170 .
- Keen, A. M. (1971). *Seashells of Tropical West América. Marine Mollusks from Baja California to Peru*. 2nd Ed. Stanford, California. pp.1064.
- Kohen, R. K., Milkman, R. and Mitton, J. B. (1976). Population genetics of marine pelecypods. IV. Selection, migration and genetic differentiation in the blue mussel. *Mytilus edulis*. *Evolution*. 30:32.
- Levene, H. (1949). On a matching problem Arising in the genetics. *Ann. Math. Stat.* 20:91-94.
- Maqueda, C. M. (1990). Variación genética intrapoblacional y grado de diferenciación interpoplacional del camarón azul *Penaeus stylirostris* del globo de California. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California.
- Mayr, E. (1969). *Populations, Species, And Evolution*. The Belknap Press of Harvard University Press. Cambridge, Mass. and London, England.
- Meffe, G. K. and Carroll, C. R., (1994). *Principles of Conservation Biology*. Sinauer Associates Inc. USA.
- Milkman, R. and Beaty, L. D. (1970). Large-scale electrophoretic studies of allelic variation in *Mytilus edulis*. *Biological Bulletin* 139-430. Abstract.
- Milkman, R. and Kohen, R. K. (1977). Temporal variation in the relationship between size, numbers and an

- allele-frequency in a population of *Mytilus edulis*. Evolution. 31:103-115.
- Mitton, J. B. and Grant, M. C. (1984). Associations among protein heterozygosity, Growth rate and developmental homeostasis. Ann. Rev. Ecol. Syst. 15:479-499.
- Nei, M. (1972). Genetic distance between populatios. Am. Natur. 106:283-292.
- Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics. 89:583-590.
- Parker, R. H. (1964). Zoogeography and ecology of macro-invertebrates of Gulf of California and continental slope of western Mexico. Mem. Symp. Mar. Geol. of Gulf of Cal. 331-373.
- Poulik, M. D. (1957). Starch gel electrophoresis in a discontinuous system of buffers. Nature. 180:1477-1479.
- Rosa-Vélez, J. (1986). Variabilidad genética poblacional en ostiones de la especie *Crassostrea virginica* del Golfo de México. Tesis doctoral. UNAM. 124.
- Rosa-Vélez, J., Gutierrez, W. M. y Radilla C. R. Ciencias Marinas (1991). 17(3) 135-145.
- Saavedra, C., Guerra, A., and Alvarez, G. (1987). Genetic structure of populations of flat oyster (*Ostrea edulis* (Linneo, 1758)) from the NW of the Iberia Peninsula. Investigaciones Pesqueras. 51 (2) : 225-241.
- Santamaría Del Angel, E., Alvarez-Borrego, S., Muller-Karger, F. E., (1994). Gulf of California biogeographic regions based on coastal zone color scanner imagery. Jour. of Geophys. Res. 99 (C4):7411-7421.
- Selander, R. K., Smith, M. H. J. Y. Yang, W. E. Jhonson y J.

- B. Gentry. (1971). Biochemical polymorphism and systematics in the genus *Peromyscus* I, variation in the old field mouse (*Peromyscus polianatus*). Stud. Genet. 6:49-90.
- Schaal, B. A. and Anderson W. W. (1974). An outline of techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from the american oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). Tech. Rep. Ser. Ga. Mar. Sci Cent. Savannah, Ga. 74:1-17.
- Shaw, C. R. and Prasad, R. (1970). Starch gel electrophoresis of enzymes.- A compilation of recipies. Biochem. Genet. 4:297-320.
- Sherwin , W. B., Murray, N. D., Graves, J. M. and Brown, P.R. (1991). Mesurement of genetic variation un endangered populations: Bandicoots (Marsupialia: Peramelidae) as an example. Conservation Biology 5:103-108.
- Silva, E. P. and Solé-Cava, A. M. (1994). Genetic variation and population estructure in the tropical marine bivalve *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin) (Veneridae).
- Singh, S. M. y Green, R. H. (1984). Excess of allozyme homozygosity in marine molluscs and its possible biological significance. Malacologia. 25:569-581.
- Soulé, M. E. (1986). Consevation Biology. The Science of Scarcity and Diversity. Sinauer Associates, Inc. Suderland, MA.
- Swofford, D. H. (1989). BIOSYS-I, A computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematics . Univ. of Illinois. 43 pp.
- Villarreal-Chávez, G., García-Domínguez, F. y Castro C. N., (1995). Estudio Poblacional de *Chione cortezi* en la Reserva de la Biósfera Alto Golfo de California y

Delta del Río Colorado. Informe Final del del proyecto 431100 5 25 95PB CONACYT, 76 pp.

- Villarreal-Chávez, G., García-Domínguez, F. y Rosa-Vélez, J. Informe final a CONACYT, del proyecto. (1997). Informe final a CONACYT, del proyecto: "Biología y ecología de tres especies del género Chione en el extremo norte del Golfo de California". 22 pp.
- Volkaert, F. and Zourus, E. (1989). Allozyme and physiological variation in the scallop *Placopecten magallenicus* and a general model for the effects of heterozygosity of fitness in marine molluscs. *Mar. Biol.* 103:51-61.
- Weir, B. S. (1992). *Genetic Data Analysis II. Methods for Discrete Population Genetic Data*. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Mass. USA. pp 443.
- Wiley, E. O., 1978. En: Maffe, G. K. & C. R. Carroll. 1994. *Principles of Conservation Biology* Sinauer Associates, Inc. USA
- Wilson, E. (1973). En Brewer, G. (1970). *An Introduction of Isozyme Techniques*. Academic Press. London.
- Zourus, E., Singh S. M. and Miles, H. E. (1980). Growth rate in oysters: an overdominant genotype and its possible explanations. *Evolution* 34:856-857.
- Zourus, E., Foltz, D. (1984). Possible explanations of heterozygote deficiency in bivalve molluscs. 25: 583-591.