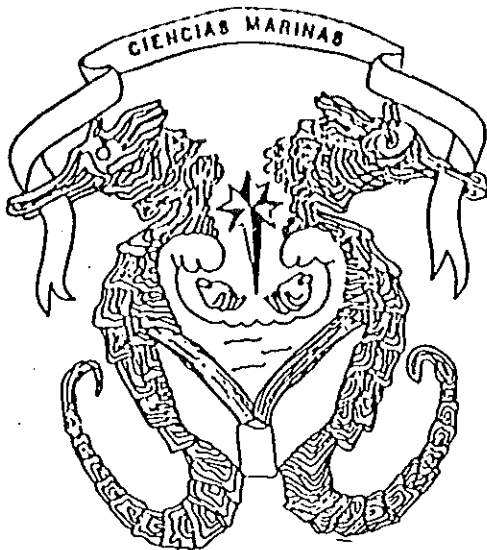


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

GENETICA BIOQUIMICA EN CARACOLES DE LA ESPECIE

Astraea undosa DE LA BAHIA DE TODOS SANTOS, B.C.



**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

**OCEANOLOGO**

PRESENTA

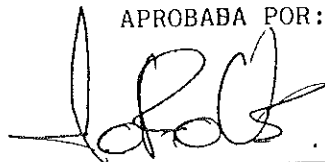
ARACELI SUAREZ VASQUEZ

ENSENADA, B.C. JULIO DE 1989

"GENETICA BIOQUIMICA EN CARACOLES DE LA ESPECIE Astraea undosa  
DE LA BAHIA SE TODOS SANTOS B.C."

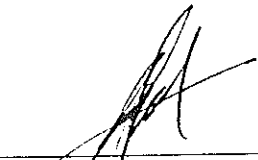
T E S I S  
QUE PRESENTA :  
ARACELI SUAREZ VASQUEZ

APROBADA POR:



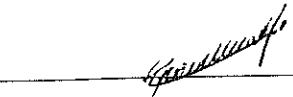
---

Presidente del Jurado  
Br. Jorge de la Rosa Velez




---

Sinodal Propietario  
M.C. Ramon Cajal Medrano



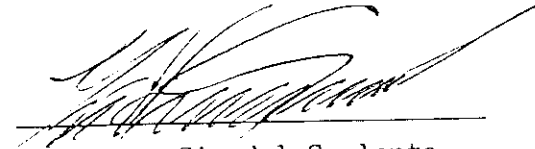
---

Sinodal Propietario  
M.C. Guillermo Torres Moya



---

Sinodal Suplente  
M.C. Rene Pinet Pladencia



---

Sinodal Suplente  
M.C. Guillermo Villareal Chávez

## RESUMEN

Se probaron 6 sistemas amortiguadores para la resolución electroforética en gel de almidón de 14 sistemas enzimáticos. Los resultados se calificaron como buena resolución, pobre resolución y sin actividad.

Los niveles de variación genética fueron determinados para la población del caracol Astraea undosa (Wood, 1828) localizada en la Bahía de Todos Santos mediante el análisis de 25 loci en los cuales la proporción de loci polimórficos fue de 0.40. La heterocigosis por individuo mostró intervalos de 0.055 a 0.200 y la heterocigosis por locus de 0.029 a 0.629.

Los resultados se discuten en base a hipótesis de polimorfismo genético y función enzimática. Se citan procesos de selección y endogamia como posibles explicaciones de la deficiencia de heterocigotos.

A mis padres Alicia y Enrique con respeto y cariño.  
Por su apoyo y comprensión en todo momento, gracias a  
quienes logré lo que ahora soy.

A mis hermanos Patricia, Enrique, Adriana, Ma. Eugenia  
y Eduardo por el cariño que nos ha mantenido cerca a pesar  
de la distancia.

A Roberto siempre presente en la sonrisa de un niño.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jorge de la Rosa Vélez profesor y amigo, por su tiempo, paciencia y enseñanzas.

A los M.C. Guillermo Torres Moye, Ramón Cajal, René Pinet y Guillermo Villareal por sus valiosos comentarios y críticas para el presente trabajo.

A todos los amigos y compañeros que de alguna manera hicieron posible, con sus sugerencias y ayuda la elaboración del presente trabajo.

A Vicky, Cuitlahuac, Salvador, Lulú y Silvia compañeros de siempre.

Al M.C. Eduardo Santamaría por su colaboración en el procesamiento de datos.

A las secretarias de la Facultad de Ciencias Marinas por su cooperación y amabilidad.

A los directivos de la Facultad de Ciencias Marinas por el tiempo que me dedicaron a pesar de sus ocupaciones.

Este trabajo fue financiado en parte por la DGICSA de la SEP mediante los convenios C87-01-0136 y C88-01-0077.

Durante el desarrollo de este trabajo se contó con el apoyo de una BECA-TESIS de la DGIP-UABC.

## INDICE

	Página.
INTRODUCCION.....	1
OBJETIVOS.....	7
ANTECEDENTES.....	8
LOCALIZACION DEL AREA DE ESTUDIO.....	12
MATERIALES Y METODOS.....	14
Material biológico.....	14
Fase experimental.....	14
i).- Homogeneización.....	16
ii).- Preparación del gel de almidón.....	16
iii).- Electroforesis.....	17
iv).- Tratamiento de los geles de almidón al finalizar la electroforesis. Rebanado y teñido.....	20
v).- Tinciones histoquímicas.....	21
Tratamiento estadístico de los resultados.....	31
RESULTADOS.....	34
DISCUSION.....	50
CONCLUSIONES.....	61
LITERATURA CITADA.....	62

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Vista lateral y parte inferior del caracol <u>Astraea undosa</u> .....	6
2	Localización del area de estudio y zona de muestreo.....	13

## LISTA DE TABLAS

TABLA		Página
I	Corriente aplicada, voltaje obtenido y tiempo de electroforesis para cada sistema amortiguador.....	18
II	Resultados de la prueba de sistemas - amortiguadores y colorantes durante la etapa de estandarización.....	35
III	Sistemas amortiguadores utilizados en la - resolución de los sistemas enzimáticos - analizados.....	36
IV	Frecuencias alélicas en 10 loci polimórfi - cos en una población de <u>Astraea undosa</u> .	38
V	Sumario de resultados para el equilibrio - genotípico en la población del caracol - <u>Astraea undosa</u> de la Bahía de Todos - Santos.....	39
VI	Prueba de bondad de ajuste de chi cuadrada ( $X^2$ ) por locus heterocigoto en la población del caracol <u>Astraea undosa</u> en la Bahía de Todos Santos, B.C.....	41

## INTRODUCCION

Desde hace años se reconoce la importancia que tiene la identificación de las unidades poblacionales marinas de valor económico, como medio de protección y utilización racional de las mismas (Altukhov, 1981 citado por Villaescusa, 1984). Entre las tareas preliminares indicadas cuando se pretende explotar un recurso biótico, se encuentra el acopio de conocimiento de sus aspectos biológicos, incluyendo la genética, cuya vinculación con las ciencias pesqueras, ha logrado avances significativos en años recientes (Newkirk, 1980).

Para inferir la estructura genética de una población, se requiere obtener el valor de la variabilidad genética de dicha población, con base en las frecuencias de los genotipos de diferentes loci.

Hunter y Markert (1957) (citados por Selander, 1980) desarrollaron la técnica del zimograma para identificar enzimas de extractos de tejidos, combinando la electroforesis con los métodos de tinción histoquímica. Su aplicación condujo al descubrimiento de formas moleculares múltiples de enzimas. Dicha técnica fue introducida en la biología de poblaciones por Hubby y Lewontin (1966), quienes intentaron sistemáticamente medir la variación genética en poblaciones naturales.

Para contar genotipos se requiere que las diferencias en el fenotipo producidas por substituciones génicas sean detectadas independientemente de la magnitud de éstas. Lewontin (1974) menciona que para los fenotipos como tamaño, forma, viabilidad, probabilidad de sobrevivencia y fecundidad, los efectos promedio de substitución génica son pequeños comparados con las fluctuaciones del ambiente, por lo tanto, propone que cualquier técnica que pretenda enumerar genotipos en las poblaciones, debe satisfacer ciertos requerimientos como la detección inequívoca de una substitución alélica en un locus y que los loci sujetos a estudio sean una muestra al azar del genoma.

Si se estudia la secuencia de aminoácidos de una proteína, cualquier cambio en dicha secuencia puede ser equiparada con un cambio en la secuencia de nucleótidos del DNA del cual se originó y, por tanto, podemos estudiar la variación génica. La secuencia lineal de nucleótidos en el DNA determina la estructura primaria de un polipéptido, utilizando las reglas del código genético. La alteración en la secuencia del DNA modificará la secuencia de los aminoácidos de la proteína que codifica. Esta alteración cambia la carga eléctrica y/o la conformación de la proteína debido a que algunos aminoácidos poseen cadenas laterales ionizables. La variación molecular es entonces detectada en la separación de proteínas ante la aplicación

de un campo eléctrico, mediante la técnica llamada electroforesis.

Debido a que las proteínas son un fenotipo que satisface los requerimientos del programa metodológico, Lewontin (1974) sugiere estudiarlas como producto directo del genoma, para cuantificar genotipos y conocer su variabilidad. Una substitución alélica es detectada ya que se resuelve en un cambio discreto del fenotipo (substitución, adición o eliminación de un aminoácido).

Se ha probado que las técnicas electroforéticas son útiles en el estudio de la variabilidad genética ya que los fenotipos obtenidos en los electroferogramas se pueden igualar con los genotipos, permitiendo enumerar las frecuencias genotípicas y detectar proteínas variables y no variables. Así, es factible cuantificar la variación promedio en una muestra de loci seleccionados sin un conocimiento previo de su variabilidad (Rosa Vélez, 1986).

La aplicación de los estudios de la genética poblacional radica en verificar cuando un recurso está sometido a presiones inadecuadas y así evitar el peligro de erosión genética con consecuencias tales como una sorpresiva caída de la producción sin causas aparentes; falta de fijación en zonas reconocidas, presencia de infestaciones y alto índice de mortalidad (Rodríguez Romero, 1987).

En la Facultad de Ciencias Marinas, se está llevando a cabo un programa de evaluación integral de los recursos con potencial económico de la costa oeste de Baja California. Este estudio plantea la necesidad de generar información sobre los aspectos básicos de la ecología, pesquerías, acuicultura y genética poblacional. El programa inició con el estudio del caracol marino Astraea undosa (Wood, 1828), conocido comúnmente como "caracol panocha".

En la evaluación integral de un recurso es importante generar información acerca de su estructura genética ya que de este modo es posible determinar su capacidad adaptativa al ambiente. De aquí se deriva su valía en el desarrollo de pesquerías y cultivos acuícolas y nos ayuda a regular la captura comercial.

#### El caracol Astraea undosa

El caracol Astraea undosa es un organismo que se presenta como un recurso con potencial económico en las costas de la península de Baja California, por sus características organolépticas y alto valor comercial.

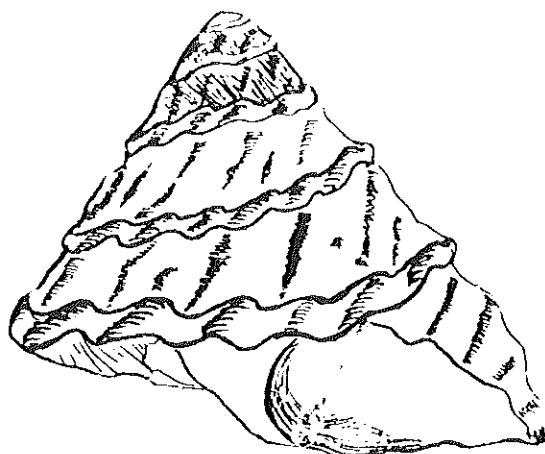
Este recurso ha sido subutilizado, ya que se ha empleado principalmente como carnada para la captura de langosta (Chenaut, 1985). Los registros de captura por parte de la Secretaría de Pesca datan desde 1981, período desde el cual se ha destinado para consumo humano directo.

El caracol Astraea undosa se distribuye desde Punta Concepción (Santa Bárbara, California E.U.A.) a Punta Abreojos B.C.S (México), (Morris et al., 1983).

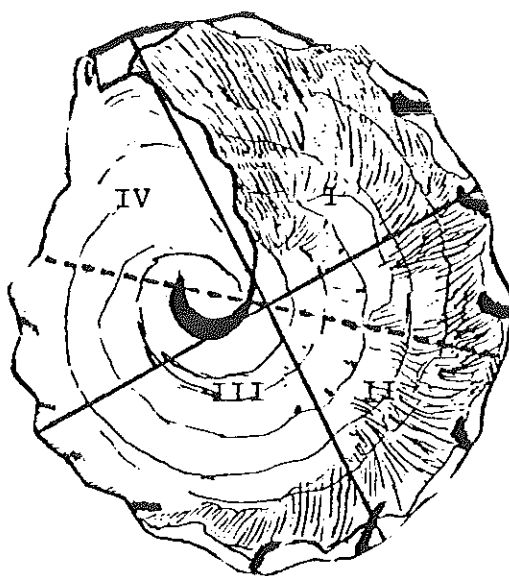
La localización preferente de las poblaciones de Astraea undosa de la Bahía de Todos Santos fue en la zona del sublitoral rocoso (Rosa Vélez et al., 1987).

El caracol Astraea undosa es un organismo ovíparo de fecundación externa que presenta estadios larvarios característicos de los moluscos (trocofora, veliger y pediveliger). El 7.7% de los organismos con talla promedio de 23.25 mm ya muestran madurez sexual según reportan Rosa Vélez et al., 1987 en un estudio anual realizado en este organismo.

Los especímenes pueden llegar a medir hasta 110 mm tanto en diámetro como en altura, tienen una concha calcárea que presenta orillas ondulantes bien definidas en toda la superficie (Figura 1). La base de la concha es plana con líneas de espiral conspicuas. Su periostraco es café. El opérculo presenta núcleos laterales y aristas dentadas y fuertes (Morris et al., 1983).



(A)



(B)

Figura 1.- (A) Vista lateral del caracol A. undosa  
(B) Parte inferior de la concha de A. undosa

## OBJETIVOS

- 1).- Diseño de un método bioquímico de separación electroforética.
- 2).- Aplicación del método bioquímico diseñado para el estudio de la variabilidad genética de la población del caracol Astraea undosa localizada en la Bahía de Todos Santos.

## ANTECEDENTES

La caracterización de la estructura genética de las poblaciones naturales es posible gracias al empleo de la electroforesis, técnica que se ha venido aplicando en este tipo de estudio desde hace más de 20 años (Shaw, 1965; Hubby y Lewontin, 1966).

Los estudios de variabilidad genética en poblaciones naturales han aportado información valiosa acerca de los procesos evolutivos que intervienen en la adaptación de las especies a los ambientes que habitan. Se ha reportado polimorfismo en poblaciones de vertebrados en un intervalo de 10 a 20% y heterocigosis promedio de 5.8%; en los invertebrados es del orden de 25 a 50% y 17.07%, respectivamente (Selander y Kaufman, 1973). Estos autores explican la variación en el nivel de heterocigosis en términos de la teoría de Levins (1968) de estrategias adaptativas en relación con la inseguridad ambiental o grano. Según esta hipótesis, los organismos con cuerpo más grande, mayor movilidad y mayor control homeostático tienden a experimentar el ambiente como de grano fino y, por consiguiente la estrategia óptima es más a menudo un fenotipo único especializado frente al conjunto de condiciones que se encuentran con mayor frecuencia. Los organismos más pequeños, menos móviles y con control homeostático pobre experimentan el ambiente

como de grano grueso, siendo su estrategia óptima el desarrollo de morfos especializados cuya existencia depende de la frecuencia de las distintas zonas del ambiente.

En las poblaciones marinas, parece existir una tendencia similar, las formas grandes y activas (asteroides de aguas poco profundas y crustáceos decápodos) tienden a experimentar niveles más bajos de polimorfismo genético que las especies sésiles procedentes de regímenes ambientales semejantes (Valentine, 1980).

Entre los análisis genéticos de poblaciones naturales mediante el uso de técnicas electroforéticas, se encuentran los realizados por Koehn et al (1976), quienes probaron que el gen leucinamino peptidasa estaba involucrado en la adaptación de las poblaciones de pelecípodos marinos a cambios de salinidad y que los diferentes alelos tienen diferentes óptimos fisiológicos bajo diferentes condiciones, presumiblemente de salinidad.

Mediante el análisis genético del músculo aductor de Crassostrea gigas, Buroker et al (1975) encontraron una variación genética considerable en las poblaciones localizadas en Mud Bay (Washington) y detectaron que el 21% de sus loci son heterocigóticos. En este estudio se trató de correlacionar la variabilidad presente en éste y otros loci con la resistencia a enfermedades producidas por especies de Vibrio. Schaal y Anderson (1974) mediante el

análisis de 31 loci detectaron una heterocigosis promedio del 12% en una población de Crassostrea virginica. Pesch (1974) reporta observaciones preliminares en las poblaciones genéticas de la comunidad bentónica estuarina de la almeja Mercenaria mercenaria de 4 localidades diferentes obteniendo un rango de heterocigosis de 32.30 a 38.33% y para Mercenaria campechiensis de 2 localidades una heterocigosis promedio de 34.57%.

Gaines et al (1974) analizaron el locus esterasa para determinar posibles diferencias genéticas asociadas con la distancia entre 20 poblaciones, del caracol Littorina angulifera, encontrando diferencias en las frecuencias del gen esterasa entre las 20 poblaciones con una heterocigosis promedio de 30.59%.

Los datos electroforéticos obtenidos en estas poblaciones muestran los altos niveles de variación genética de pelecípodos marinos.

La propiedad del método de discernir entre poblaciones aisladas reproductivamente ha sido aprovechada para delimitar reservas de captura en algunas pesquerías como la del cangrejo, donde Cole y Morgan (1978) observaron similitud entre cangrejos azules de dos Bahías diferentes.

Tracey et al (1975) intentaron probar la hipótesis de que existe una correlación entre la deficiencia de heterocigosis y presión pesquera de la langosta Homarus americanus, pero no encontraron diferencias significativas

entre las poblaciones costeras sometidas a explotación pesquera y poblaciones oceánicas no explotadas que les dieran evidencias para apoyar su hipótesis, por lo que concluyeron que la deficiencia de heterocigosis en las poblaciones costeras es una característica de dicha población debido a sus efectos de entrecruzamiento. Así mismo, encontraron que las poblaciones locales eran genéticamente similares.

La genética aplicada a la acuicultura se ha orientado a la asociación entre genotipos detectados por técnicas electroforéticas y caracteres cuantitativos de interés potencial para el acuicultor, así como el planteamiento de estrategias de mejora genética (Longwell y Stiles, 1973 citados por Rosa Vélez, 1986).

### LOCALIZACION DEL AREA DE ESTUDIO

La Bahía de Todos Santos se localiza en el extremo noroeste de la Península de Baja California, entre los  $31^{\circ} 40'$  a  $31^{\circ} 56'$  de Latitud Norte y los  $116^{\circ} 47'$  de Longitud Oeste, alojando en su interior al puerto de Ensenada. Por su situación geográfica recibe la mayor parte del año vientos del noroeste.

La Bahía de Todos Santos es una bahía abierta, con un área aproximada de 24,000 hectáreas. Está limitada al norte por Punta San Miguel, al Sur por la Península de Punta Banda, y al oeste por las Islas de Todos Santos, formadas por salientes rocosas.

El área específica de colecta se encuentra localizada en el Cabo de Punta Banda (figura 2). En esta zona la pendiente del litoral es abrupta y el fondo está formado de rocas ígneas basálticas con cantos rodados de dos a tres metros de diámetro (García Pámanes y Chee Barragán, 1976).

Las razones por las cuales se eligió este sitio para estudio fueron: la presencia de la especie en densidades más altas que en otras localidades de la bahía, la baja energía del oleaje y la poca probabilidad de extracción del organismo por pesca comercial o deportiva por no contar con vías de acceso terrestre.

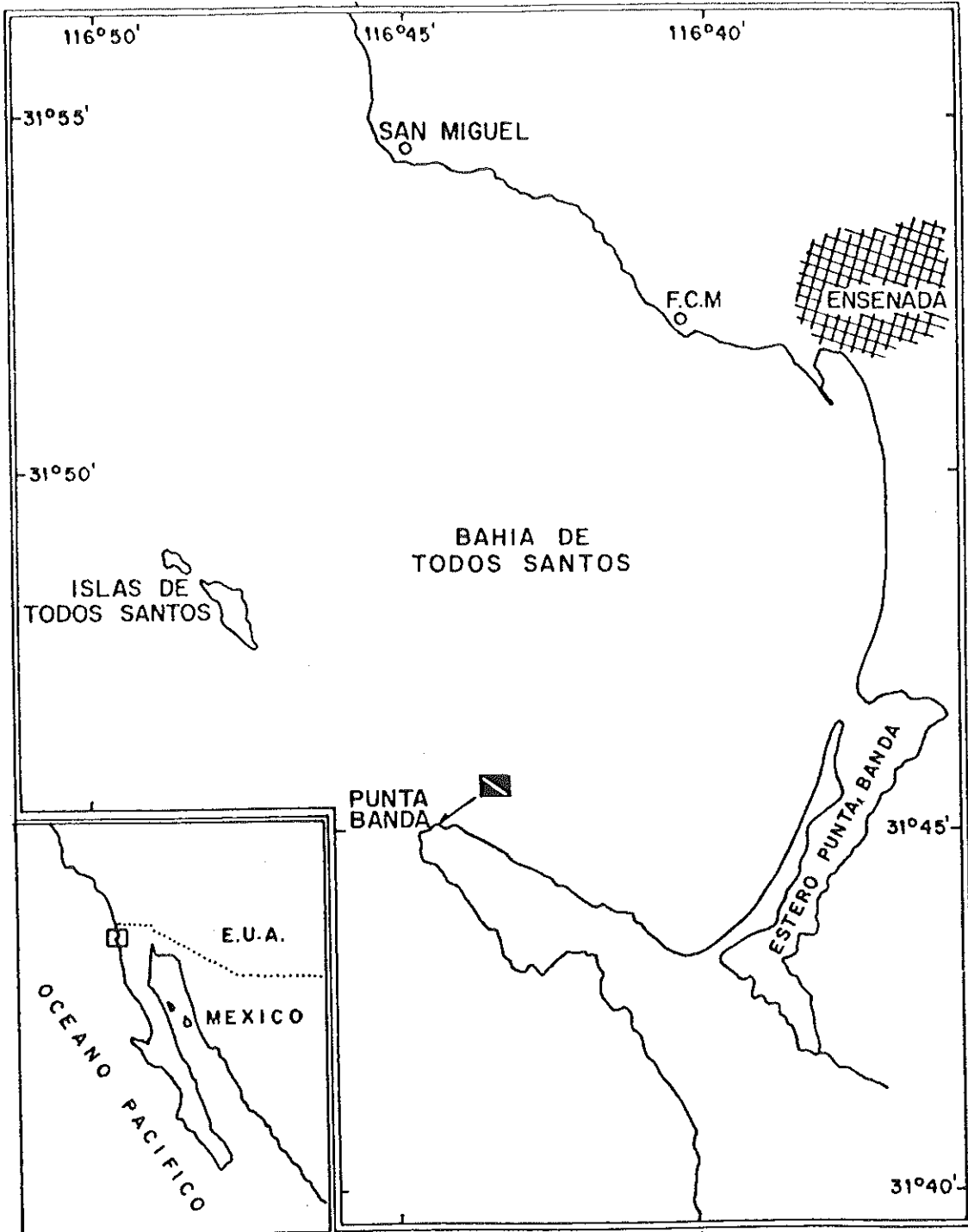



FIG.2.- LOCALIZACION DEL AREA DE ESTUDIO Y 'ZONA' DE MUESTREO (  ) TOMADO DE BECERRIL, 1988

## MATERIAL Y METODOS

### Material biológico

Los especímenes del caracol Astraea undosa utilizados en este estudio fueron colectados de una zona del Sublitoral de la Bahía de Todos Santos B.C. de febrero a junio de 1988 (fig.2).

Los especímenes se transportaron vivos al laboratorio en donde fueron colocados en acuarios preparados ad hoc. Al momento de realizar el análisis los organismos fueron separados de sus conchas, disecados y colocados inmediatamente en hielo para posteriormente llevar a cabo la homogeneización y procesamiento electroforético correspondiente.

### Fase experimental

Con el fin de estandarizar el método electroforético que permitiera detectar la variabilidad genética de la población de Astraea undosa se llevaron a cabo pruebas preliminares que consistieron en la elección de tejidos, elección de sistemas amortiguadores empleados para cada sistema enzimático, uso de diferentes fórmulas de tinción correspondientes a cada enzima, preparación del gel de almidón y corriente aplicada a cada sistema amortiguador. Esto último, con el fin de obtener la mejor resolución en el tiempo mínimo de corrimiento.

Para la elección de los tejidos a emplear en el

análisis de los diferentes sistemas enzimáticos, se realizaron pruebas con 28 organismos de Astraea undosa. La elección se hizo con base en el tejido que diera un bandeo claro y que revelara para la mayoría de los sistemas enzimáticos en el gel de almidón, así como a la facilidad de homogeneización, que permitiera obtener la mayor concentración de enzima.

Los tejidos que se probaron fueron el manto, el pie, el músculo aductor, la branquia y el hepatopáncreas como lo sugieren Schaal y Anderson, (1974); Cole y Morgan, (1978); Levinton y Suchanek, (1978); Buroker et al, (1979). Con el manto y el músculo el número de enzimas reveladas fue pequeño y las bandas obtenidas fueron en su mayoría difusas. El problema con el pie fue que debido a su consistencia era difícil de homogeneizar y la concentración de enzima en el extracto no permitió la resolución adecuada en la mayoría de los casos. Con la branquia y el hepatopáncreas se lograron buenos resultados al optimizar la concentración de extractos, ya que son tejidos de fácil homogeneización. Estos dos tejidos dieron, además, buena resolución para la mayoría de los sistemas enzimáticos analizados. (Tabla II), por lo tanto, fueron seleccionados para realizar el estudio de variabilidad genética en el cual se analizaron 65 organismos de Astraea undosa.

## i) Homogeneización

La preparación del tejido para el corrimiento electroforético en gel consistió en homogeneizar una parte de tejido en 1 a 2 volúmenes de solución amortiguadora de Tris-HCl 0.1 M, pH 7.0, en baño de hielo como lo recomienda Buroker, (1975). Los homogeneizados se pasaron entonces a tubos de centrifuga de 15 ml y se centrifugaron durante 10 minutos a 3000 r.p.m. La fase acuosa se recuperó por decantación y se colocó en tubos de ensaye que se cubrieron con papel Parafilm. Los extractos se almacenaron a 4 °C hasta efectuar la serie de ensayos electroforéticos. El almacenamiento no excedió de 4 días.

## ii) Preparación del gel de almidón

Se mezclaron 24 gr de almidón Aldrich y 24 gr de almidón Sigma hidrolizado para electroforesis en un matraz quitasato de 2 lt y se agregaron lentamente, agitando, 400 ml de la solución amortiguadora correspondiente para el sistema enzimático a revelar. Se eliminaron grumos y la mezcla se calentó con un mechero Fisher (Aprox. a los 80 °C)\* directamente y agitando fuertemente hasta que la suspensión se hizo viscosa. Cuando la viscosidad disminuyó bruscamente se colocó en la boca del matraz un tapón de hule y se aplicó vacío por espacio de 1 minuto para eliminar el aire de la suspensión.

\* En ocasiones la mezcla se calentó empleando una plancha de calentamiento obteniéndose también buenos resultados.

La solución, ahora transparente, se vertió inmediatamente en una charola de acrílico de 18X18X1 cm. La solución debe ser vertida en el centro de la placa a manera que se llenen las esquinas del marco. Una vez que se formó el gel se cubrió con papel autoadherente. El gel está listo para usarse tan pronto llegue a la temperatura ambiente.

### iii) Electroforesis

Las electroforesis se llevaron a cabo en charolas de electroforesis en placa horizontal de acrílico. Se utilizó una fuente de poder (Buchler 3-1500) de 0-1000 volt aplicándose, en todos los casos, corriente constante de 50 mA. El voltaje generado para cada uno de los sistemas amortiguadores se reporta en la tabla I.

La inserción de las muestras se efectuó mediante mechas de papel filtro Whatman # 3 de 1 X 0.5 cm empapadas con cada una de las muestras. Estas mechas se insertaron en un corte hecho al gel con un bisturí. Dicho corte se hizo a 5 cm del extremo catódico del gel. La placa que contenía al gel se colocó en una celda de electroforesis a la que se agregaron 500 ml de la solución amortiguadora en cada uno de los electrodos. El gel se puso en contacto con la solución amortiguadora mediante mechas de papel filtro Whatman # 1 de 18 X 8 cm. En cada una de las electroforesis se utilizó un colorante pista que fue azul de bromofenol.

Se aplicaron 50 mA durante 15 minutos para lograr la

Tabla 1. Corriente aplicada, voltaje obtenido y tiempo de electroforesis para cada sistema amortiguador.

Sistema Amortiguador	Corriente aplicada(mA)	Voltaje producido(V)		tiempo de electroforesis (Heras).
		Inicial	Final	
A	50	145	158	4
B	50	280	300	5
C	50	655	669	3
D	50	170	170	4
E*	50	46	---	---
F	50	177	195	5

\*Debido al lento desplazamiento de la muestra fue necesario aumentar a 120 mA la corriente a las 4 horas de iniciar la electroforesis, - la cual se detuvo 8 horas despues porque el desplazamiento siguió - siendo nulo.

incorporación de las enzimas al gel. Se cortó la corriente y las mechas con que se aplicaron las muestras fueron retiradas del gel. La parte superior del gel se cubrió con papel autoadherente y se le colocó una bolsa de hielo para evitar el calentamiento del gel durante el paso de la corriente. La electroforesis continuó hasta que el colorante pista alcanzó el extremo anódico. En cada electroforesis se corrieron de 15 a 20 muestras. En un inicio se probaron 6 sistemas amortiguadores para el análisis de los sistemas enzimáticos en estudio, pero de estos sólo 4 fueron seleccionados. La elección se hizo de acuerdo a los resultados de los experimentos realizados con diversas soluciones amortiguadoras recomendadas en la literatura. Los sistemas amortiguadores que se eliminaron están señalados con una cruz (+).

A) Sistema TC (Schaal y Anderson. 1974)

Electrodo: Tris 0.2 M - Acido cítrico 0.1 M, pH 5.8

Gel: Diluir 36.4 ml de solución del electrodo en  
1000 ml de agua, pH 5.8

B) Sistema discontinuo de Puolik (Poulik, 1957)

Electrodo: Acido bórico 0.3 M - NaOH 0.05 M, pH 8.1

Gel: Tris 0.076 M - Acido cítrico 0.005 M, pH  
8.65

## C) Sistema DH (Ayala, 1972)

Electrodo: Tris 0.087 M - Acido bórico 0.0087 M -  
NaEDTA 0.001 M, pH 9

Gel: El mismo del electrodo.

## +D) Ayala, 1972

Electrodo: Tris 0.135 M - Acido cítrico 0.045 M

Gel: Tris 0.009 M - Acido cítrico 0.003 M, pH 7

## +E) Sistema TME7 (Dillon, R.T., Jr., 1985)

Electrodo: Tris 0.10 M - Acido maleico 0.10 M -  
EDTA 0.01 M - Cloruro de magnesio  
hexahidratado 0.01 M ajustando el pH a  
7.4 con hidróxido de sodio.

Gel: Dilución 9:1 del amortiguador del electrodo.

## F) Sistema TEB8 (Dillon, R.T., Jr., 1985)

Electrodo: Tris 0.50 M - Acido bórico 0.645 M -  
EDTA 0.0179 M, pH 8

Gel: Tris 0.05 M - Acido bórico 0.097 M - EDTA  
0.0018 M, pH 8

El sistema amortiguador D se eliminó por dar una resolución muy pobre, casi nula, en la mayoría de los sistemas enzimáticos probados. El problema con el amortiguador E fue que el desplazamiento era muy lento.

iv) Tratamiento de los geles de almidón al finalizar la electroforesis. Rebanado y teñido.

Al finalizar la electroforesis se retiró la placa de la celda de electroforesis y se procedió a rebanar el gel.

Esta es una ventaja del gel de almidón usado como medio de electroforesis, ya que se le puede rebanar en capas delgadas, lo que permite una serie de tinciones distintas por cada corrimiento. El rebanado se realizó con una cuerda de guitarra tensada en un marco de acrílico. De esta forma se obtuvieron 5 rebanadas de 2 mm de espesor. La primera rebanada era eliminada debido a los efectos de superficie que se pudiesen presentar (Ayala et al., 1972). Las rebanadas restantes se utilizaron para teñir. El alambre debe mantenerse libre de adherencias para garantizar la limpieza del corte.

La distribución de los sistemas enzimáticos en el gel se revelaron sumergiendo cada una de las rebanadas en las mezclas de tinción correspondientes.

#### v) Tinciones histoquímicas

Los sistemas enzimáticos estudiados se eligieron en base a aquellos sobre los cuales se tenía información para otras especies de invertebrados (Gaines et al., 1974; Pesch, 1974; Buroker et al., 1975; Koehn et al., 1976; Huber, 1985), así como a la disponibilidad de reactivos en el laboratorio.

Una vez elegidos los sistemas enzimáticos estos fueron resueltos por cada sistema amortiguador (Tabla III). Las fórmulas de tinción se describen a continuación y están marcadas con una cruz (+) aquellas que fueron eliminadas

durante la etapa de prueba, ya fuera por dar resultados negativos o bien por no tener acceso al reactivo.

1) Aspartato aminotransferasa

a) Solución substrato, pH 7.4

0.146 gr de ácido alfa cetoglutárico

0.532 gr de ácido L-aspartico

2.000 gr de polivinil pirrolidona

0.200 gr de NaEDTA

5.680 gr de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

200 ml de agua

b) Tinción,

250 mg de azul rápido BB

50 ml de solución substrato

50 ml de agua

c) Incubar a 37°C hasta la aparición de manchas azules sobre fondo rosa aproximadamente en 15 minutos.

d) Lavar con agua destilada y fijar.

(Schaal y Anderson, 1974)

2) Catalasa (Tinción 1) +

a) Cubrir el gel con  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 0.5% por un minuto y enjuagar con agua.

b) Agregar 100 ml de solución de KI al 0.5% acidificada con 0.5 ml de ácido acético concentrado.

c) Incubar a temperatura ambiente hasta la aparición de bandas blancas sobre fondo azul.

- d) Anotar el resultado inmediatamente ya que la formación del complejo continúa hasta cubrir las bandas.

(Schaal y Anderson, 1974)

Catalasa (Tinción 2) +

- a) Cubrir el gel con 5 ml de  $H_2O_2$  al 3%, 10 ml de amortiguador de fosfatos 0.1 M a pH 7.0, 7 ml de  $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$  0.06 M y 78 ml de agua.
- b) Incubar a temperatura ambiente por 15 minutos y enjuagar con agua.
- c) Adicionar 50 ml de una solución de KI 0.09 M y 50 ml de agua. Aparecerán bandas azules.

(Shaw y Prasad, 1970)

### 3) Enzima málica

- a) Solución substrato, pH 7.0

13.4 gr de ácido L-málico

49 ml de  $Na_2CO_3$  2M

51 ml de agua

Disolver el ácido en agua y agregar lentamente la solución de carbonato mientras se agita en baño de hielo.

- b) Tinción

20 mg de NADP+

20 mg de nitroazul de tetrazolio (NBT)

10 mg de metosulfato de fenacina (PMS)

20 ml de Tris-HCl 0.1 M, pH 8.4

75 ml de agua

5 ml de solución substrato

1 ml de solución de  $MgCl_2$  al 10%

c) Incubar a  $37^\circ C$  hasta la aparición de bandas azules.

d) Lavar y fijar

(Schaal y Anderson, 1974)

#### 4) Esterasas

a) Humedecer el gel en solución de ácido bórico 0.5 M por una hora. No enjuagar.

b) Solución substrato

50 ml de acetona

50 ml de agua

1 gr de alfa naftil acetato

1 gr de beta naftil acetato

c) Tinción

100 mg de azul rápido BB

87 ml de agua

10 ml de Tris-HCl 0.5 M a pH 7.1

3 ml de solución substrato

d) Incubar a temperatura ambiente y en la oscuridad hasta la aparición de bandas color café.

e) Lavar y fijar

(Modificado de Shaw y Prasad, 1970)

## 5) Fosfatasa ácida (Tinción 1)

## a) Tinción

500 mg de polivinil pirrolidona

100 mg de ácido Na-alfa-naftil fosfato

100 mg de azul rápido BB

100 ml de amortiguador de acetatos 0.125 M, pH 5

- b) Incubar a 37°C hasta la aparición de bandas oscuras sobre fondo blanco.

(Ayala et al., 1972)

## Fosfatasa ácida (Tinción 2)+

## a) Tinción

100 mg de Na-alfa-naftil fosfato

100 mg de sal negro K

100 ml de acetato de sodio 0.05M, pH 5

- b) Incubar el gel a 37°C hasta aparición de las bandas  
c) Lavar y fijar.

(Shaw y Prasad, 1970)

## 6) Fosfatasa alcalina (Tinción 1)+

## a) Tinción

500 mg de polivinil pirrolidona

100 mg de azul rápido BB

100 mg de Na-alfa-naftil fosfato

60 mg de  $MnCl_2$

60 mg de  $MgCl_2$

2 gr de NaCl

100 ml de Tris-HCl 0.1M, pH 8.6

- b) Incubar a 37°C hasta la aparición de las bandas
- c) Lavar y fijar.

(Ayala et al, 1972)

Fosfatasa alcalina (Tinción 2)+

- a) Tinción

123 mg de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

50 mg de azul rápido BB

50 mg de Na-beta-naftil fosfato

100 ml de agua

- b) Incubar a 37°C hasta aparición de bandas
- c) Lavar y fijar

(Shaw y Prasad, 1970)

7) Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (+)

- a) Tinción

200 mg de glucosa 6 fosfato

30 mg de  $NADP^+$

20 mg de NBT

2 mg de PMS

90 ml de agua

25 ml de Tris-HCl 0.5 M, pH 7.1

- b) Incubar a 37°C hasta que las bandas azules aparezcan
- c) Lavar y fijar

(Shaw y Prasad, 1970)

8) Glutamato deshidrogenasa

- a) Solución substrato, pH 7

4.25 gr de glutamato de sodio

100 ml de amortiguador de fosfatos 0.5 M, pH 7

b) Tinción

50 mg de NAD<sup>+</sup>

30 mg de NBT

2 mg de PMS

5 ml de solución substrato

25 ml de amortiguador de fosfatos 0.5 M, pH 7

70 ml de agua

c) Incubar a 37°C hasta la aparición de bandas azules

d) Lavar y fijar

(Modificado de Schaal y Anderson, 1974)

9) Isocitrato deshidrogenasa (Tinción 1)+

a) Tinción

20 mg de NADP<sup>+</sup>

20 mg de NBT

3 mg de PMS

5 ml de isocitrato de sodio monohidratado 0.1 M

20 ml de MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O

85 ml de agua

b) Incubar el gel a 37°C hasta aparición de bandas azules.

c) Lavar y fijar

(Shaw y Prasad, 1970)

## Isocitrato deshidrogenasa (Tinción 2)

## a) Tinción

135 mg de isocitrato de sodio

30 mg de NADP<sup>+</sup>

20 mg de NBT

2 mg de PMS

30 mg de MgCl<sub>2</sub>

90 ml de Tris-HCl 0.1 M, pH 8

b) Incubar a 37°C hasta que las bandas azules aparezcan

c) Lavar y fijar

(Rosa Vélez, 1986)

## 10) Lactato deshidrogenasa

## a) Solución substrato, pH 7

10.6 ml de ácido D,L-láctico al 85%

49.0 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.H<sub>2</sub>O 1 M

40.4 ml de agua

Esta mezcla debe hacerse en frío.

## b) Tinción

50 mg de NAD

30 mg de NBT

2 mg de PMS

10 ml de solución substrato

15 ml de Tris-HCl 0.5 M, pH 7.1

5 ml de NaCN 0.1 M

70 ml de agua

- c) Incubar a 37°C. Aparecen bandas oscuras
- d) Lavar y fijar

(Shaw y Prasad, 1970)

11) Leucinamino peptidasa (Tinción 1)+

- a) Incubar el gel durante media hora en solución de ácido bórico 0.5 M
- b) Tinción
  - 70 mg de L-leucil-beta-naftilamida HCl
  - 40 mg de sal negro K
  - 50 ml de solución de anhídrido maleico 0.2 M y NaOH 0.2M
  - 10 ml de NaOH 0.2 M
  - 40 ml de agua
- c) Incubar a 37°C hasta la aparición de bandas oscuras.

(Ayala et al., 1972)

Leucinamino peptidasa (Tinción 2)

- a) Incubar el gel durante media hora en solución de ácido bórico 0.5 M
- b) Tinción
  - 50 mg de sal negro K
  - 20 mg de L-leucil-beta-naftilamida HCl
  - 50 ml de Tris-malato 0.2 M, pH 6
  - 50 ml de agua
- c) Incubar hasta la aparición de bandas oscuras
- d) Lavar y fijar

(Shaw y Prasad, 1970)

## 12) Malato deshidrogenasa

## a) Solución sustrato, pH 7

13.4 gr de ácido L-málico

49.0 ml de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2 M

51.0 ml de agua

Disolver el ácido en agua. Agregar lentamente la solución de carbonato mientras se agita en baño de hielo.

## b) Tinción

10 ml de solución sustrato

50 mg de  $\text{NAD}^+$ 

30 mg de NBT

2 mg de PMS

10 ml de Tris-HCl 0.1 M, pH 7

80 ml de agua

c) Incubar a 37°C hasta la aparición de bandas azules

d) Lavar y fijar

(Rosa Vélez, 1986)

## 13) Superóxido dismutasa

## a) Tinción

25 mg de  $\text{NAD}^+$ 

20 mg de NBT

5 mg de PMS

50 ml de Tris-HCl 0.1 M, pH 8.4

50 ml de agua

- b) Incubar a 37°C expuesto a la luz. Aparecen bandas blancas sobre fondo ligeramente azul.
- c) Lavar y fijar

(Ayala et al., 1972)

#### 14) Proteína total

- a) Solución colorante

1.25 gr de azul de Coomasie R-250

227 ml de metanol

46 ml de ácido acético

227 ml de agua

- b) Solución desteñidora

150 ml de metanol

50 ml de ácido acético

300 ml de agua

- c) Teñir incubando a temperatura ambiente por una hora. Desteñir el fondo con cambios sucesivos de la solución desteñidora, por 24 horas.

(Rosa Vélez, 1986)

La solución desteñidora de la tinción de proteína total se utilizó para fijar los geles de los diferentes sistemas enzimáticos.

#### Tratamiento estadístico de los resultados

Una medida de la variación genética es el polimorfismo. En la población del caracol Astraea undosa, la proporción de loci polimórficos, que es el número de

loci polimórficos divididos por el número total de loci observados en la población, fue calculado mediante el criterio del alelo más común menor o igual al 99%.

Las frecuencias alélicas en los loci polimórficos se obtuvieron mediante los conteos hechos en los zimogramas obtenidos durante el corrimiento electroforético divididos entre el total de genes analizados. Las frecuencias de heterocigotos observados se calcularon dividiendo el número de heterocigotos observados en los zimogramas entre el número de organismos analizados. Para el cálculo de la heterocigosis esperada por locus se utilizó la fórmula citada por Ayala y Kiger (1984) que se basa en la ley de equilibrio de Hardy-Weinberg ( $H_e = 1 - (f_1^2 + f_2^2 + \dots + f_n^2)$ ).

La prueba de bondad de ajuste de chi cuadrada ( $X^2$ ) (Siegel, 1986) se aplicó para comparar la frecuencia de heterocigotos observados por locus con las frecuencias esperadas. Se consideraron alelos raros aquellos que se presentaron con frecuencia menor o igual al 10%. Estos alelos fueron sumados al alelo de movilidad electroforética más cercana para obtener una sola clase de alelo y así tener, por consiguiente, frecuencias más altas y poder aplicar la prueba de bondad de ajuste. Los grados de libertad para el cálculo por locus fueron dados por  $(G-A)$ , donde G es el número de clases genotípicas y A el número de alelos (Crow y Kimura, 1970 citado por Ayala y Kiger, 1984).

Para averiguar si las enzimas reguladoras y no reguladoras presentaban heterocigosis diferentes se aplicó la prueba de rangos señalados y pares igualados de Wilcoxon (Siegel, 1986).

## RESULTADOS

Los tejidos seleccionados fueron la branquia y el hepatopáncreas según los criterios de mayor facilidad de homogeneización y mejor resolución en bandas de los zimogramas (Tabla II).

Durante la etapa de estandarización se eliminaron dos sistemas amortiguadores, uno de ellos fue el sistema citado por Ayala (1972) (Tris-citrato) ya que la resolución para la mayoría de los sistemas enzimáticos fue pobre. Las bandas obtenidas se mostraron tenues, o, de hecho no estaban presentes. El sistema TME7 de Dillon (1985) (Tris maleico) sólo desplazó las muestras a 2 mm del origen en 12 horas de corrimiento electroforético, tiempo en el cual se detuvo la electroforesis al observarse que no se estaba logrando un corrimiento eficiente (Tabla I).

Los sistemas enzimáticos que se eliminaron por dar resultados negativos fueron: catalasa, fosfatasa alcalina y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Estos resultados se deben a la poca concentración de la enzima o a la desactivación de la misma debido al manejo de la muestra. Los sistemas enzimáticos con resultados positivos fueron: isocitrato deshidrogenasa, fosfatasa ácida, lactato deshidrogenasa, enzima málica, aspartato aminotransferasa, glutamato deshidrogenasa, malato deshidrogenasa, superóxido dismutasa, esterasa, leucinamino peptidasa; además proteína total (Tabla III).

Tabla II. Resultados de la prueba de sistemas amortiguadores y colorantes durante la etapa de estandarización. Cuando mas de un colorante fue puesto a prueba se designaron las abreviaciones 1,2 para especificar el numero del colorante. Los resultados se clasificaron como buena resolución (e) pobre resolución (xx) y sin actividad(.). Los espacios vacios no se probaron.

RAI	CAT	ME	EST	FAC	FAL	G6PD	GDH	IDH	LDH	LAP	MDH	PT	SOD	SEZ/B	Tej.
xx		.						.1 .2		.1	xx			A	Musculor
	.1 .2	.	.	.1 .2	.1 .2				.	e2		xx	e	B	
xx							.				e	e	e	C	
		.						.2						D	
.		.			.2			.1 .2			.		.	E	
.					.1 .2					e			.	F	
.		.						.1 .2		e 1	xx			A	Hanto
	.1 .2	.	.	.1 .2	.1 .2	.			xx	e 2		xx	e	B	
.							e				e	e	e	C	
.		.						e 2						D	
.		.			.2			.1 .2			.		.	E	
.					.1 .2					e			.	F	
.		.						.1 .2		:1	xx			A	Pie
	.1 .2	.	.	.1 .2	.1 .2	.			.	e 2		xx	e	B	
xx							.				e	e	e	C	
		.						xx2						D	
.		.			.2			.1 .2			.		.	E	
.					.1 .2					e			.	F	
e		xx						.1 e 2		xx 1	xx			A	Hepatopancreas
	.1 .2	xx	xx	.1 xx2	.1 .2	.			e	e 2		e	e	B	
e			xx	e 1 .2			e				e	e	e	C	
.		.						e 2						D	
.		.			xx2			.1 .2			.	.	.	E	
.					.1 .2					e 2			.	F	
xx		.						.1 e 2		.1	xx			A	Branquia
	.1 .2	xx	e	.1 xx2	.1 .2	.			xx	.2		.	xx	B	
e			e	e 1 .2			e				xx	e	e	C	
.		.						.2						D	
.		.			.2			.1 .2			.		.	E	
.					.1 .2					e 2			.	F	

Tabla III. Sistemas amortiguadores utilizados en la resolución de los sistemas enzimáticos - analizados.

Sistema Amortiguador	Tejido empleado	Sistema Enzimático	Abreviatura
A	Hepatopáncreas	Isocitrato deshidrogenasa	IDH
B	Hepatopáncreas	Lactato deshidrogenasa	LDH
		Enzima malica	ME
C	Hepatopáncreas	Aspartato amino transferasa	AAT
		Fosfatasa acida	FAC
		Glutamato deshidrogenasa	GDH
		Malato deshidrogenasa	MDH
		Superoxido dismutasa	SOD
C	Branquia	Aspartato amino transferasa	AAT
		Fosfatasa acida	FAC
		Esterasa	EST
		Malato deshidrogenasa	MDH
		Proteína total	PT
F	Hepatopáncreas	Leucinamino peptidasa	LAP
F	Branquia	Leucinamino peptidasa	LAP

De estos sistemas enzimáticos analizados, resolvieron de 2 a 5 loci diferentes por lo cual el número total de loci fue de 25 (Tabla V). De estos, 10 mostraron ser polimórficos (Tabla IV) y 15 monomórficos entre los que están Aat-1, Em-2, Est-4, Fac-1, Fac-2, Gdh, Ldh, Lap-1, Pt-1, Pt-2, Pt-3, Pt-4, Sod-1, Sod-2 y Sod-3.

El número promedio de genes muestreados fue de 79 33 (Tabla V). La desviación estandar es alta debido a que los 65 organismos analizados no siempre resolvieron de la misma forma para cada uno de los sistemas enzimáticos, probablemente por falta de actividad de la enzima. La variación en el número de organismos que revelaron para cada sistema enzimático osciló desde un mínimo de 6 organismos hasta el máximo de 65 organismos.

El polimorfismo fue de 0.40 (Tabla V). Este resultado nos da una estimación del número de loci que mostraron variantes alélicas estructurales en la población de Astraea undosa estudiada.

La heterocigosis observada por individuo fue de 0.080 y la heterocigosis observada por locus fue de 0.079 (Tabla V) mostrando la primera una varianza de 0.0027 y la segunda de 0.026 (Tabla V). La varianza es menor para la heterocigosis promedio por individuo debido a que el cálculo se hace en base al número de individuos, que es mayor.

Tabla 10. Frecuencias alélicas en 10 loci polimórficos en una población de *Ascaris suum*. N es el número de genes muestreados.  $H_o$  es la frecuencia observada de heterocigotos y  $H_e$  es la frecuencia esperada de heterocigotos.

LOCUS	N	FRECUENCIAS ALELICAS				$H_o$	$H_e$
Aat-2	122	$\frac{104}{0.86}$	$\frac{102}{0.84}$	$\frac{100}{0.82}$		0.480	0.482
Est-1	56	$\frac{100}{0.91}$	$\frac{98}{0.89}$			0.036	0.164
Est-2	60	$\frac{100}{0.95}$	$\frac{91}{0.85}$			0.1	0.095
Est-3	88	$\frac{102}{0.83}$	$\frac{100}{0.66}$	$\frac{98}{0.10}$	$\frac{96}{0.21}$	0.295	0.509
Idh	106	$\frac{105}{0.18}$	$\frac{100}{0.38}$	$\frac{90}{0.44}$		0.130	0.630
Ndh-1	12	$\frac{105}{0.08}$	$\frac{100}{0.92}$			0.166	0.147
Ndh-2	32	$\frac{105}{0.03}$	$\frac{100}{0.97}$			0.063	0.058
Lap-2	130	$\frac{100}{0.98}$	$\frac{96}{0.82}$			0.031	0.039
Pt-4	70	$\frac{100}{0.57}$	$\frac{95}{0.43}$			0.629	0.490
Sod-4	70	$\frac{103}{0.01}$	$\frac{100}{0.99}$			0.029	0.020

Tabla V. Sumario de resultados para el equilibrio genotípico en la población del caracol Astraea undosa de La Bahía de Todos Santos.

PARAMETRO	
Número de loci	25
Número de individuos	65
Promedio de genes muestreados por locus	79+30
Loci polimórficos (p(0.99))	0.40
Frecuencia promedio de heterocigotos:	
Por individuo (observado)	0.080+0.0027
Por locus (observado)	0.079+0.026
Por locus (esperado)	0.105+0.036

Los valores de chi cuadrada ( $\chi^2$ ) en la comparación entre las frecuencias observadas y esperadas se reportan en la tabla VI. La prueba sólo se aplicó a los loci polomórficos que mostraron frecuencias genotípicas mayores o iguales a 5 por lo que sólo hay 4 resultados que podrán ser discutidos con base estadística.

La información para cada uno de los sistemas enzimáticos es la siguiente:

#### Aspartato aminotransferasa

Las amonitransferasas están presentes comúnmente en branquia y hepatopáncreas de algunos invertebrados (White *et al.*, 1983; Slechtova *et al.*, 1982).

Esta enzima transfiere el grupo amino del glutamato a otra cadena carbonada. Se ha visto que está presente en el citoplasma y mitocondria como formas isoenzimáticas que difieren, por lo tanto, en sus puntos isoeléctricos y secuencia de aminoácidos. La transferencia del grupo amino que tiene lugar en el citoplasma resulta en la formación de glutamato. Este último entra en la mitocondria, donde es entonces desaminado por la glutamato deshidrogenasa o cede su grupo amino al oxalacetato por la acción de la aspartato aminotransferasa mitocondrial para originar aspartato, un donador de un grupo amino en la formación de urea (White *et al.*, 1983). La transaminación proporciona un medio para la redistribución del nitrógeno no amínico.

Tabla UI. Prueba de bondad de ajuste de chi cuadrada ( $\chi^2$ ) por locus heterocigoto en la población del caracol A.undosa en la Bahía de Todos Santos E.C.  
 P es la probabilidad (nivel de significancia 5% +++ y nivel de significancia al 0.1% ++) y G.L. los grados de libertad por locus heterocigoto.

LOCUS	$\chi^2$ CALC.	$\chi^2$ CRIT.	G.L	DECISION
Idh	73.95	7.81	3	Con dif.sig. ++
Aat-2	2.25	3.84	1	Sin def.sig.
Est-3	5.303	3.84	1	Con dif.sig. +++
Pt-4	2.806	3.84	1	Sin def.sig.

H<sub>0</sub>: Las frecuencias genotípicas no muestran una desviación del equilibrio de Hardy Weinberg

H<sub>a</sub>: Las frecuencias genotípicas muestran una desviación del equilibrio de Hardy Weinberg

El sustrato para esta enzima fue el ácido alfa cetoglutarico y ácido L-aspartico. La presencia de la enzima se visualizó por aparición de bandas azules sobre fondo rosa. Se observaron dos zonas de actividad enzimática que determinaron dos loci génicos (Aat-1 y Aat-2). El locus Aat-1 fue monomórfico en 112 genes registrados. El locus Aat-2 mostró polimorfismo con tres alelos (104, 102 y 100), dos de ellos comunes (Aat-2<sup>102</sup> y Aat-2<sup>100</sup>) y uno raro (Aat-2<sup>104</sup>) en 122 genes registrados. La heterocigosis observada fue de 0.480 y la esperada de 0.482 (Tabla IV). La prueba de bondad de ajuste para las frecuencias observadas y esperadas arrojó resultados no significativos (Tabla VI), por lo tanto, las frecuencias genotípicas están en equilibrio de Hardy Weinberg.

#### Enzima málica

Esta enzima interviene en las reacciones de transporte del piruvato y malato a través de la membrana mitocondrial. La acción combinada de los conjuntos de reacciones de oxidorreducción y carboxilación en la que interviene la acetil CoA trae consigo la formación de NADPH importante en la síntesis de ácido palmítico y en general en la síntesis de ácidos grasos (lipogénesis), reacción que predomina en hígado y tejido adiposo de mamíferos (White, 1983) y que es importante por la formación de compuestos que funcionan como reservorio de energía química potencial.

El sustrato de la enzima fue malato de sodio, se visualizó por aparición de bandas azules. El número de genes registrados fue de 36. Se observó una zona de actividad enzimática caracterizada por un locus génico (Em-2). El fenotipo de este locus mostró sólo un alelo, por lo tanto, es monomórfico.

### Esterasa

En general, tres grupos de estererasas se han presentado en tejidos y fluidos orgánicos: las arilesterasas, acetilesterasas y colinesterasas. Las estererasas han sido investigadas en suero de conejos, gatos y ratas así como en extractos acuosos de hígado, músculo y cerebro (Latner y Skillen, 1968). En algunos casos se ha demostrado una relación entre la presencia de hormonas sexuales y la acción de esta enzima. Las estererasas intervienen también en la hidrólisis de grasas neutras (White, 1983).

En estudios electroforéticos la actividad de estererasas es detectada por la hidrólisis del alfa o beta naftil acetato seguido de la reacción del alfa o beta naftol con una sal de diazonio.

Se observaron cuatro zonas de actividad enzimática por aparición de bandas de color café después de la tinción. Se determinaron cuatro loci génicos (Est-1, Est-2, Est-3 y Est-4). El locus Est-1 mostró polimorfismo con dos alelos (100 y 98), uno común (Est-1<sup>100</sup>) y uno raro (Est-1<sup>98</sup>) en 56

genes registrados. La heterocigosis observada fue de 0.036 y la esperada de 0.164 (Tabla IV). El locus Est-2 mostró polimorfismo con dos alelos (100 y 96) uno común (Est-2<sup>100</sup>) y uno raro (Est-2<sup>96</sup>) en 60 genes registrados. La heterocigosis observada fue de 0.100 y la esperada de 0.95 (Tabla IV). El locus Est-3 mostró polimorfismo con cuatro alelos (102, 100, 98 y 96), dos comunes (Est-3<sup>100</sup> y Est-3<sup>96</sup>) y dos raros (Est-3<sup>102</sup> y Est-3<sup>98</sup>) en 88 genes registrados. La heterocigosis observada fue de 0.295 y la esperada de 0.509 (Tabla IV). La prueba de bondad de ajuste para la Est-3 para frecuencias observadas y esperadas dio diferencia significativa menor de 0.025, mostrando las frecuencias genotípicas una desviación del equilibrio de Hardy Weinberg (Tabla VI). La Est-4 fue monomórfica en 124 genes registrados.

#### Fosfatasa ácida

Interviene en la ruptura hidrolítica de ésteres fosfóricos. Se ha establecido que las fosfatasas requieren de magnesio y manganeso, pero para algunas el magnesio no causa ningún efecto y el manganeso puede llegar a ser inhibidor. El problema con la clasificación de las fosfatasas estudiadas para la variación genética se intensifica por la diversidad de métodos utilizados para detectarlas, principalmente al usarse substratos no naturales, lo que complica el conocimiento de los substratos verdaderos y su función real.

En el método que se utilizó aquí, substratos no naturales como el alfa y beta naftil fosfato, se hidrolizan y el alfa o beta naftil se acoplan con un colorante diazo para su detección.

La presencia de la enzima se visualizó por aparición de bandas oscuras. Se observaron dos zonas de actividad enzimática caracterizadas por dos loci génicos (Fac-1 y Fac-2). Los fenotipos de estos dos loci mostraron monomorfismo. El locus Fac-1 en el registro de 72 genes y el locus Fac-2 con el registro de 30 genes.

#### Glutamato deshidrogenasa

Interviene en el paso de la glutamina (donador de nitrógeno en biosíntesis de varias biomoléculas, especialmente purinas y pirimidinas) a alfa. cetoglutarato, liberando urea.

El sustrato fue glutamato de sodio, la presencia de la enzima se visualizó por la aparición de bandas azules, producidas por la reacción con un colorante sensible a las reacciones de oxidorreducción (NBT). Se realizó el análisis de 70 genes y sólo se presentó una zona de actividad enzimática determinada por un locus génico (Gdh-1) que mostró monomorfismo.

#### Isocitrato deshidrogenasa

Las células eucarióticas contienen dos tipos diferentes de esta enzima. Una es dependiente de NAD<sup>+</sup> y otra de NADP<sup>+</sup>. La primera se localiza en la mitocondria y

la segunda es una enzima soluble localizada en el citoplasma. Tienen dos funciones distintas pero catalizan la misma reacción. La enzima dependiente de NAD<sup>+</sup> funciona en el ciclo del ácido cítrico, mientras que la enzima dependiente de NADP<sup>+</sup> se piensa que funciona generando alfa cetoglutarato en el citoplasma para usarlo en reacciones anabólicas.

El substrato empleado fue isocitrato de sodio. Se registraron 108 genes y se observó una zona de actividad enzimática por aparición de bandas azules determinada por un locus génico (Idh) que mostró polimorfismo con tres alelos comunes (Idh<sup>105</sup>, Idh<sup>100</sup> e Idh<sup>90</sup>). La heterocigosis observada fue de 0.130 y la esperada de 0.630 (Tabla IV). La prueba de bondad de ajuste para frecuencias observadas y esperadas mostró diferencias significativas con una probabilidad de ocurrencia menor de 0.001, mostrando que las frecuencias genotípicas tienen una desviación del equilibrio de Hardy Weinberg (Tabla VI).

#### Lactato deshidrogenasa

Esta enzima cataliza la reacción reversible de la formación de piruvato a partir de lactato. En los animales el lactato generado en el metabolismo anaeróbico de algunos tejidos, tales como el músculo esquelético, puede ser transportado a otros tejidos aeróbicos tales como hígado, donde es convertido nuevamente a piruvato, el cual puede

ser metabolizado en el ciclo del ácido cítrico o reconvertido en compuestos carbohidratados como glucosa libre, o almacenado como glucógeno (Bohinski, 1978).

Se empleó una solución de lactato como sustrato. La presencia de la enzima se visualizó por aparición de bandas oscuras. Se registraron 54 genes y se observó una zona de actividad enzimática determinada por un locus génico (Ldh) que mostró monomorfismo.

#### Leucinamino peptidasa

La leucinamino peptidasa es cualquier enzima que hidrolice la leucil beta naftilamida. Su principal sitio de acción es el enlace  $\text{NH}_2$  terminal de varios residuos. Es muy útil en estudios de polimorfismo proteínico por producir zonas muy bien definidas en una gran variedad de amortiguadores. No presentan complicación con zonas satélite y casi siempre son polimórficas (Manwell y Baker, 1970).

Se identifican permitiendo que las peptidasas actúen sobre el L-leucil-beta-naftilamida y tificando con sal negro K. La actividad se revela como zonas claras sobre fondo obscuro.

Se observaron dos zonas de actividad enzimática determinada por dos loci génicos (Lap-1 y Lap-2). Para el locus Lap-1 se registraron 124 genes que mostraron monomorfismo. Para el locus Lap-2 se registraron 130 genes,

este locus mostró polimorfismo con dos alelos (100 y 96), uno común (Lap-2<sup>100</sup>) y uno raro (Lap-2<sup>96</sup>). La heterocigosis observada fue de 0.031 y la esperada de 0.039 (Tabla IV).

#### Malato deshidrogenasa

Cataliza una reacción de óxido reducción reversible entre malato y oxalacetato. Depende de NAD<sup>+</sup>. Se dice que hay dos tipos de esta enzima en función de la ubicación celular, ya que una se encuentra dentro de la mitocondria y otra fuera de ella, o sea, en el citoplasma (Bohinski, 1978).

El substrato empleado fue malato de sodio. La presencia de la enzima se detectó por aparición de bandas azules. Se observaron dos zonas de actividad enzimática que desternaron dos loci (Mdh-1 y Mdh-2). Para el locus Mdh-1 se registraron 12 genes que mostraron polimorfismo con presencia de dos alelos (105 y 100), uno común (Mdh-1<sup>100</sup>) y uno raro (Mdh-1<sup>105</sup>). La heterocigosis observada fue de 0.166 y la esperada de 0.147 (Tabla IV). El locus Mdh-2 para el cual se registraron 32 genes mostró polimorfismo con dos alelos (105 y 100), uno común (Mdh-2<sup>100</sup>) y uno raro (Mdh-2<sup>105</sup>). La heterocigosis observada fue de 0.063 y la esperada de 0.058 (Tabla VI).

#### Superóxido dismutasa

Estas enzimas catalizan reacciones de óxido reducción. Se encuentran en todas las células que respiran y también

en bacterias anaeróbicas facultativas. Son metaloenzimas; su ciclo catalítico implica la reducción y la reoxidación de un ion metálico tal como el  $\text{Cu}^{2+}$  o el  $\text{Fe}^{3+}$  en el sitio activo.

Se observaron cuatro zonas de actividad enzimática que determinaron cuatro loci (Sod-1, Sod-2, Sod-3, SOD-4). Los loci Sod-1, Sod-2 y Sod-3 mostraron monomorfismo en el registro de 78, 100 y 72 genes respectivamente. El locus Sod-4 mostró polimorfismo con dos alelos (103 y 100), uno común (Sod-4<sup>100</sup>) y uno raro (Sod-4<sup>103</sup>) en el registro de 70 genes. La heterocigosis observada fue de 0,029 y la esperada de 0.020 (Tabla IV).

#### Proteína total

Se observaron cinco loci (Pt-1, Pt-2, Pt-3, Pt-4 y Pt-5) de los cuales sólo uno fue polimórfico. Los loci Pt-1, Pt-2, Pt-3 y Pt-5 mostraron monomorfismo en el registro de 70, 70, 100 y 130 genes respectivamente. El locus Pt-4 mostró polimorfismo con dos alelos comunes (Pt-4<sup>100</sup> y Pt-4<sup>95</sup>) en el registro de 70 genes. La frecuencia observada fue de 0.629 y la esperada de 0.490 (Tabla IV). La prueba de bondad de ajuste para frecuencias observadas y esperadas mostró diferencias no significativas (Tabla VI) por lo que los genotipos se encuentran en equilibrio de Hardy Weinberg.

## DISCUSION

La estimación de la variabilidad genética en la población del caracol Astraea undosa puede ser discutida en base a la función de los diferentes sistemas enzimáticos, ya que se ha propuesto que algunas clases de enzimas pueden ser más variables que otras según su función (Gillespie y Kojima, 1968).

Entre las hipótesis que mencionan el papel que juega el polimorfismo enzimático en las funciones fisiológicas de un organismo se encuentra la citada por Johnson (1974), que sugiere que el polimorfismo puede estar asociado con enzimas específicas y no específicas y con reacciones reguladoras en el metabolismo.

En base a la heterocigosis esperada por loci, se analizaron las enzimas específicas y no específicas, ya que Johnson (1974) cita que algunas enzimas presentan una mayor variabilidad que otras debido a que han perfeccionado su actividad sobre un substrato específico, de tal manera que un cambio fijado en ellas es menos probable que en las que tienen actividad sobre una variedad de substratos. Por lo tanto, las últimas mostrarán una mayor variabilidad. Aquellas enzimas que se han especializado en un substrato serán poco variables porque no pueden tolerar un cambio, que altere su actividad, modificando la cinética de la reacción que catalizan.

Para los sistemas enzimáticos en estudio se encontró que IDH, EST-1, EST-2 y EST-3, que son enzimas no específicas, la variabilidad fue alta (Tabla IV). No fue así para la enzima FAC que también es no específica y mostró monomorfismo. Existe también contradicción para las enzimas específicas que, apoyando la hipótesis anterior, deberían presentar una menor variabilidad. Por ejemplo, las enzimas AAT-2 y MDH-1 fueron más variables que las enzimas no específicas EST-1, EST-2 y EST-4.

Johnson (1974) menciona que desde un punto de vista fisiológico, la selección actuará sobre cada paso de un proceso bioquímico como una función del proceso que afecta al producto, es decir, el "fenotipo" metabólico y que aquellos loci que regulan rutas metabólicas, al presentar cambios, es de esperarse que produzcan alteraciones más grandes en su función que en aquellos cambios que pudieran presentarse en enzimas que no regulan el flujo metabólico. Por lo tanto, las enzimas reguladoras deben presentar menor variabilidad genética que las no reguladoras. Las enzimas como la AAT, EST, IDH, ME y GDH, que son enzimas reguladoras, deberían haber presentado una variabilidad menor que las enzimas LDH, LAP y MDH que son no reguladoras. Al observar la tabla IV encontramos que las enzimas codificadas por los loci Aat-2, Est-1, Est-2, Est-3 e Idh presentan valores altos de heterocigosis a diferencia

de Me y Gdh, que presentaron monomorfismo. Para Lap, Mdh-1 y Mdh-2 se reportó heterocigosis pero más baja que la que presentaron las enzimas reguladoras, por lo que no se sigue el patrón esperado. Al aplicarse la prueba estadística de chi cuadrada ( $X^2$ ) no se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos a un nivel del 95% de confianza. Esto coincide con lo reportado por Johnson (1974) quien no encontró diferencias significativas entre enzimas reguladoras y no reguladoras presentes en especies de *Drosophila* a un 99% de confianza.

Se ha reportado (Johnson, 1974) que las enzimas moduladoras redox así como las enzimas reguladoras de carga de energía (ATP/AMP, NAD<sup>+</sup>/NADH o NADP<sup>+</sup>/NADPH) aportan un medio por el cual una célula puede coordinar su respuesta metabólica frente a una perturbación fisiológica generalizada, tal como la causa un cambio de temperatura. Las fluctuaciones de temperatura pueden ocasionar un cambio en los loci por selección de modo que fomenten la presencia de ciertas formas que convengan a su función metabólica. Un cambio en la temperatura altera las tasas metabólicas tan lenta o rápidamente como el metabolismo en general. Entre las enzimas reguladoras de carga de energía con las que se trabajó se encuentran la ME, GDH, IDH, LDH y MDH, y según la hipótesis de Johnson (1974) es de esperarse una variación polimórfica en los loci de estas enzimas como una

respuesta a una fluctuación metabólica por encontrarse el organismo en aguas templadas donde existen variaciones de temperatura. Existen pocos datos que apoyen esta hipótesis. Para LDH por ejemplo, se ha encontrado que no es muy polimórfica en homeotermos donde la temperatura es uniforme. En poiquilotermos como los peces, se ha reportado polimorfismo para la enzima LDH y se ha relacionado con la temperatura ambiental (Merrit, 1972 citado por Johnson, 1974). Para las enzimas en estudio, ME, GDH y LDH presentaron monomorfismo y MDH e IDH polimorfismo por lo que no se comprueba la hipótesis de que las enzimas reguladoras de carga de energía sean más polimórficas que las que no lo son.

La hipótesis de enzimas reguladoras de rutas metabólicas puede ser argumentada contra la de temperatura (Johnson, 1974) como en el caso de la ME, en la que se ha reportado polimorfismo tanto en homeotermos como poiquilotermos y se explica en base a su papel regulador (Johnson, 1974). Era de esperarse que la enzima LDH presentara polimorfismo debido a su relación con la temperatura ambiental y a que es no reguladora, pero no fue así. Las enzimas GDH y ME también mostraron monomorfismo probablemente porque un cambio en la temperatura no les afecte por ser enzimas de metabolismo interno si es que realmente el cambio en la temperatura es tan grande que

pueda afectarles. Las enzimas IDH y MDH presentaron polimorfismo, por lo que es claro que los datos son poco consistentes con tal hipótesis y se requeriría someter a los sistemas enzimáticos a diferentes condiciones de temperatura para conocer su comportamiento, asimismo conocer las fluctuaciones de temperatura en la zona de muestreo.

Aunque los patrones de polimorfismo enzimático sugieren que puede existir una importancia en las enzimas reguladoras es necesario un mayor número de datos, en un número mayor de enzimas, para corroborar las hipótesis.

Los resultados encontrados en Astraea undosa nos indican que de los 25 loci estudiados en 65 organismos, se presentó un polimorfismo de 0.40, el cual queda dentro de los valores reportados para invertebrados (Selander y Kaufman, 1973). El polimorfismo, aunque es una medida imprecisa de la variabilidad debido a que un locus ligeramente polimórfico cuenta tanto como los muy polimórficos, es útil, ya que nos da una aproximación de la variabilidad que presenta una población.

La heterocigosis promedio encontrada en los loci analizados fue de 0.079; este valor, es menor al valor esperado para los invertebrados, cuya estimación es de 0.17 (Selander y Kaufman, 1973) y no es comparable con el valor promedio de 0.148 reportado para otros 46 moluscos (Nevoet

al, 1984, citado por Woodruff *et al*, 1986). Esto puede estar relacionado con que dentro de los invertebrados marinos el caracol Astraea undosa es de los organismos de mayor talla. También presenta un alto control homeostático y fisiológico relativo al grupo de los invertebrados (Rosa Vélez *et al*, 1987). Por lo tanto, tiende a experimentar su ambiente como de grano fino y ha desarrollado un fenotipo poco variable, pero suficiente para adaptarse a las condiciones que lo rodean, por ello su variabilidad genética es baja, con sólo algunos alelos favorecidos para alcanzar la eficacia biológica adecuada frente a las condiciones ambientales del hábitat.

Por los datos reportados en la tabla V es claro que existe una deficiencia de heterocigotos en la población de Astraea undosa estudiada, ya que el valor esperado es de 0.105 en tanto que el observado fue de 0.079. Fujino y Sasaki (1984) han encontrado que existe asociación entre la edad de los organismos y las frecuencias genotípicas de algunos loci y que la razón de los valores de heterocigosis observada y esperada (O/E) está por abajo de 1 en organismos juveniles y aumenta gradualmente con la edad del organismo.

Para la población de Astraea undosa de Punta Banda en la Bahía de Todos Santos los organismos que se analizaron se encontraban en estadio de madurez gonadal, por lo que la

deficiencia de heterocigotos no puede explicarse en base a este factor ya que si existe realmente una asociación entre la edad y presencia de heterocigotos era de esperarse una dominancia de éstos sobre los homocigotos y no fue así.

Singh y Green (1984) (citados por Woodruff et al., 1986) proponen que la endogamia, presencia de alelos nulos y la selección pueden ser posibles explicaciones para la deficiencia de heterocigotos observados con respecto a los esperados según el equilibrio de Hardy-Weinberg.

Para conocer la probabilidad de que un proceso de endogamia pudiera estar afectando las frecuencias genotípicas en la población de Astraea undosa de Punta Banda y, en específico, estuviera influyendo en las frecuencias de los loci heterocigóticos se llevó a cabo el cálculo del coeficiente de endogamia (F), que está definido como la probabilidad de que dos alelos en un locus provengan de idénticos descendientes (Crow, 1986) y se expresa como:

$$F = pq/2N$$

e influye en la frecuencia de los genotipos heterocigotos de la siguiente manera:

$$P_{Aa} = 2P_A P_a (1-F)$$

En base a los datos de heterocigosis observada y heterocigosis esperada se le dieron valores arbitrarios a F considerando que la mayor probabilidad era de 1. Se

encontró que para que el valor de heterocigosis esperada de 0.105 (Tabla V) se redujera al valor de heterocigosis observada de 0.079 (Tabla V), únicamente por efectos de endogamia, se necesitaría un  $F$  de 0.25 lo que nos está indicando que existe apareamiento entre hermanos por lo que es un valor muy alto para este organismo, ya que Astraea undosa tiene un estadio larval dispersivo (trocófora a veliger) de más de dos semanas (Rosa-Vélez *et al.*, 1987) por lo que existe poca probabilidad de que se de una reproducción consanguínea; y la endogamia, como única explicación de la deficiencia encontrada no es factible para esta especie.

En cuanto a la selección, esta actúa de modo que facilita las combinaciones genéticas favorables y elimina aquellas que no lo son. De esta manera, permite que la población se adapte de manera más eficaz a su ambiente. En la población de Astraea undosa estudiada, para los loci EST-3 e IDH se reportó una desviación del equilibrio de Hardy Weinberg (Tabla VI) la cual pudiera explicarse en base a procesos de selección. Para ello, puede calcularse el coeficiente de selección que se representa por  $S$  (Zourus y Foltz, 1984) y nos da una medida de la reducción de la eficacia biológica de un genotipo. Para poder confirmar si realmente las frecuencias genotípicas observadas se habían reducido con respecto a las esperadas por efectos de

selección en los loci Est-3 e Idh, se consideró una selección en contra de los heterocigotos ya que hay situaciones en que los heterocigotos tiene una menor eficacia que cualquiera de los homocigotos. En este caso la frecuencia de heterocigotos se define como:  $(2pq(1-S))$  (Zourus y Foltz, 1984).

Para el locus Est-3 se encontró que los genotipos 102/100 y 102/98 no se habían presentado en los genes muestreados y por tanto se reportó un  $S=1$  lo que está indicando que para que estas frecuencias se vieran afectadas únicamente por procesos de selección sería necesario que los organismos con estos genotipos desaparecieran de la población. Para los genotipos 100/98 y 100/96 se encontró que se necesitarían coeficientes de selección de 0.48 y 0.42 respectivamente, que son muy altos, ya que se necesitaría que de 100 organismos con el genotipo 100/98 48 desaparecieran de la población y que 42 de 100 organismos con el genotipo 100/96 sucediera lo mismo, por lo que es poco probable que las frecuencias encontradas se vean afectadas a este nivel exclusivamente por procesos de selección. Si este proceso se estuviera dando a ese nivel la población estaría soportando un lastre genético considerable, con consecuencias negativas sobre su eficacia biológica global. En cuanto al locus Idh también presentó desviación del

equilibrio de Hardy Weinberg, en este caso los coeficientes de selección también fueron muy altos. Para el genotipo 105/100 fue de 1 y para los genotipos 105/90 y 100/90 de 0.77 y 0.72 respectivamente. En este caso, parece ser que el problema fue de resolución en las bandas de los zimogramas, ya que en varias ocasiones se presentaron muy tenues o bien no se lograban diferenciar claramente los diferentes alelos.

Entre otro de los factores que pueden afectar las frecuencias génicas en una población se encuentra el llamado efecto de Wahlund (Li, 1955) por el cual pueden darse ciertas modificaciones en las frecuencias alélicas cuando algunos organismos de otras poblaciones con frecuencias diferentes a la de la población original ingresan en éstas.

Para realizar este cálculo se considera una población subdividida en grupos de igual tamaño y cruzamiento al azar, las proporciones de los heterocigotos quedan definidas por:

$$Aa: 2\sum P_i q_i / K = 2pq - 2\sigma^2 q$$

Si el proceso de migración afectara las frecuencias genotípicas la varianza tendería al valor de 1 entre más semejanza existiera entre las poblaciones ya que no habría mucha diferencia entre una y otra.

Para la población de Astraea undosa en los loci Est-3 e Idh se encontró que era suficiente que las poblaciones aledañas fueran semejantes en un 10.7% y 25% respectivamente para que por el efecto de Wahlund las frecuencias génicas se vieran afectadas. Por el momento no se cuenta con datos acerca de la estructura genética de poblaciones cercanas de Astraea undosa para poder saber si hay un proceso de migración que esté afectando las frecuencias génicas de la población de Punta Banda y qué tan semejantes son unas con otras.

La afirmación reportada en la literatura nos indica que la interacción de procesos como la selección, migración y endogamia son importantes en la caracterización de la estructura genética de una población.

## CONCLUSIONES

- 1).- Se logró establecer un método bioquímico para la resolución de loci adecuados.
- 2).- El caracol Astraea undosa presenta baja heterocigosis media debido a sus características biológicas como son la talla y homeostasis alta.
- 3).- La selección, endogamia y migración no son las responsables únicas de la deficiencia de heterocigotos en la población de Astraea undosa de Punta Banda.

## LITERATURA CITADA

- AYALA, F.J. y J.A. Kiger Jr. 1984. Genética moderna. Fondo Educativo Interamericano. México. 863 pp.
- AYALA, F.J., J.B. Powell; M.L. Tracey; C.A. Mourao y S.P. Salas. 1972. Enzyme variability in the Drosophila Willistoni group. IV. Genic variation in natural populations of Drosophila willistoni. Genetics. 70: 113-139.
- BECERRIL-BOBADILLA, F.J.U. 1988. Distribución y abundancia del caracol Astraea undosa Wood, 1828 (Mollusca:Gasteropoda) en la Bahía de Todos Santos Mayo a Octubre de 1987. Tesis Licenciatura UABC. Facultad de Ciencias Marinas.
- BOHINSKI, R.C. 1978. Bioquímica. Fondo Educativo Interamericano. México. 667 pp.
- BULMER, M.G. 1971. Protein polymorphism. Nature. 234:410-411.
- BUROKER, N.E., W.K. Hershberg y K.K. Chew. 1975. Genetic variation in the Pacific oyster, Crassostrea gigas. J. Fish. Res. Board. Can. 32:2471-2477.
- BUROKER, N.E., W.K. Hershberg y K.K. Chew. 1979. Population genetics of the family Ostreidae. Intraspecific studies of Crassostrea gigas and Crassostrea commercialis. Marine Biology. 54: 157-169.
- COLE, M.A. y R.P. Morgan. 1978. Genetic variation two populations of blue crab C. sapidus. Estuaries. 1: 202-205.
- CROW, F.J., 1986. Basic concepts in population quantitative and evolutionary gen. W.H. Freeman and Company. New York.
- CHENAUT, V. 1985. Los pescadores de Baja California; costa del Pacífico y Mar de Cortés. Centro de Investigaciones y Estudios Superiores en Antropología Social, Museo Nacional de Culturas Populares. Cuadernos de la Casa Chata 111. México. 180 pp.
- DILLON, R.T. Jr. 1985. Correspondence between the buffer systems suitable for electrophoretic resolution of bivalve and gastropod isozymes. Comp. Biochem. Physiol. 82(4): 643-645.

- FUJINO, K. y K. Sasaki. 1984. Age association of genotypic proportions of isozymes in the Pacific abalone. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries. 50(1): 11-15
- GAINES, M.S., J. Caldwell y A.M. Vivas. 1974. Genetic variation in the mangrove periwinkle Littorina angulifera. Marine Biology. 27: 327-332.
- GARCIA-PAMANES, L. y G. Chee-Barragán. 1976. Ecología de la zona entremareas de la Bahía de Todos Santos. Ciencias Marinas. 3(1): 10-29.
- GILLESPIE, H.J y K. Kojima. 1968. The degree of polymorphisms in enzymes involved in energy production compared to that in nonspecific enzymes in two Drosophila ananassae populations. Proc.N.A.S. 61:582-585
- HUBBY, J.L. y R.C. Lewontin. 1966. A molecular approach of the study of genetic heterozygosity in natural populations.I. The number of allele in different loci in Drosophila pseudoobscura. Genetics. 54: 595-609.
- HUBER, M.E. 1985. Population genetics of eight species of trapezia (Brachyura:Xanthidae), symbionts corals. Marine Biology. 85: 23-36.
- JOHNSON, G.B. 1974. Enzyme polymorphism and metabolism. Science. 184: 28-37.
- KOEHN, R.K., R. Milkman y J.B. Mitton. 1976. Population genetics of marine pelecypods. I. Ecological heterogeneity and evolutionary strategy at an enzyme locus. Am.Natur. 106:47-56.
- LATNER, A.L. y W.A. Skillen. 1968. Isoenzymes in biology and medicine. Academic Press. London. 289 pp.
- LEVINTON, J.S., y T.H. Suchanek. 1978. Geographic variation, niche and genetic differentiation at different geographic scales in the mussels Mytilus californianus y M. edulis.
- LEWONTIN, R.C. 1974. The genetic basis of evolutionary change. Columbia University Press. Nueva York. 346 pp.

- LI, C.C. 1955. Population genetics. University of Chicago Press. Chicago and London. 365 pp.
- MANWELL, C. y C.M. Ann Baker. 1970. Molecular biology and the origen of species: Heterosis, protein polimorphism and animal breeding. University of Washington Press. Seattle 394 pp.
- MORRIS, R.H., D.P. Abbott y E.C. Haderlie. 1983 Intertidal invertebrates of California. Stanford University Press. 690 pp.
- NEWKIRK, G.F. 1980. Review of the genetics and the potential for selective breeding of commercially important bivalves. *Aquaculture*. 19: 209-228.
- PESCH, G. 1974. Protein polymorphism in the hard clams Mercenaria mercenaria and Mercenaria campechiensis. *Biol. Bull.* 146: 393-403.
- POULIK, M.D. 1957. Starch gel electrophoresis in a discontinuous system of buffers. *Nature*. 180: 1477-1479.
- RODRIGUEZ-ROMERO, F. 1987. Perspectivas de la mejora genética en las ostras comerciales de México. Avances actuales: genética, bioquímica, citogenética y citología. En: III Reunión Nacional de Malacología y Conquiología. Sociedad Mexicana de Malacología FCB, UANL.
- ROSA-VELEZ, J. De la. 1986. Variabilidad genética poblacional en ostiones de la especie Crassostrea virginica del Golfo de México. Tesis Doctorado UNAM. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología.
- ROSA-VELEZ, J. De la., G. Torres Moye; A. Silva Loera; J.A.E. Almanza Heredia y E. Almanza Heredia .1987. Evaluación integral de los recursos con potencial económico de la costa oeste de Baja California: El caracol Astraea undosa (Mollusca:Gastropoda). Primer informe académico. DGICSA. SEP. 30 pp.
- SCHAAL, B.A. y W.W. Anderson, 1974. An outline of techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from the american oyster Crassostrea virginica . Gmelin. Tech. Rep. Ga. mar. Sci. Cent. Savannah, Ga. 74(3): 1-17.

- SELANDER, R.K. 1980. Variación genética en las poblaciones naturales. En: Evolución molecular. (F.J. Ayala, ed.) Omega. Barcelona. 21-46 pp.
- SELANDER, R.K. y D.W. Kaufman. 1973. Genic variability and strategies of adaptation in animals. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70: 1875-1877.
- SHAW, C.R. 1965. Electrophoretic variation in enzymes. Science. 149: 936-941.
- SHAW, C.R. y R. Prasad. 1970. Starch gel electrophoresis of enzymes. A compilation of recipes. Biochem. Genet. 4: 297-320.
- SIEGEL, S. 1986. Estadística no paramétrica (aplicada a las ciencias de la conducta) Editorial Trillas. México. 344 pp.
- SLECHTOVA, V., V. Rivalta y A. Camacho. 1982. Las isozimas de la deshidrogenasa láctica (LDH) en peces de la familia Lutjanidae. En: Ciencias Biológicas. No. 8: 25-30. Academia de Ciencias de Cuba.
- SOMERO, N. y M. Soulé. 1974. Genetic variation in marine fishes as a test of the niche-variation hypothesis. Nature. 249: 670-672.
- TRACEY, M.L., K. Nelson; D. Hedgecock; R.A. Slechleser y M.L. Pressick. 1975. Biochemical genetics of lobsters: genetic variation and the structure of american lobster (Homarus americanus) populations. J. Fish. Res. Board. Can. 32: 2091-2101.
- VALENTINE, J.W. 1980. Estrategias genéticas de la adaptación. En: Evolución molecular. (F.J. Ayala, ed.) Omega. Barcelona. 80-97 pp.
- VILLAESCUSA, A., A. Camacho y V. Rivalta. 1984. Polimorfismo de la fosfogluco isomerasa y de la fosfoglucomutasa en el camarón rosado (Penaeus notialis). En: Ciencias Biológicas No. 12: 23-29. Academia de Ciencias de Cuba.
- WHITE, A., P. Handler; R.L. Smith; R. Hill y R.I. Lehman. 1983. Segunda edición en español. Principios de Bioquímica. Mc. Graw Hill. 1582 pp.

- WOODRUFF, S.D., L.L. McMeejin; M. Mulvey y P. Carpenter. 1986. Population genetics of Crepidula onyx: Variation in a californian slipper snail recently established in China. *The Veliger*. 29: 53-63.
- ZOURUS, E. y W.D. Foltz. 1984. Possible explanations of heterozygote deficiency in bivalve molluscs. *Malacología* 25(2): 583-591.