

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

UNIDAD DE POSTGRADO

**Variabilidad morfológica y de la aloenzima Malato
deshidrogenasa en poblaciones peruanas del
gasterópodo intermareal *Stramonita haemastoma*
(Linnaeus, 1767)**

TESIS

para optar el grado de Magíster en Recursos Acuáticos con Mención en
Ecología Acuática

AUTORA

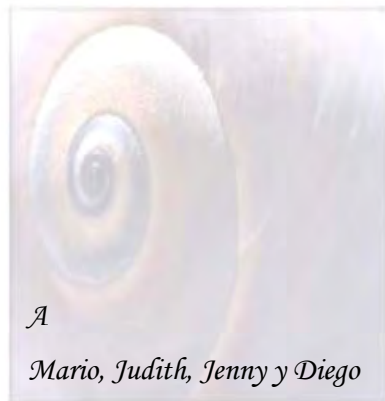
Giovanna Elizabeth Sotil Caycho

ASESOR:

Beatriz Lizárraga de Olarte

Lima - Perú

2008





AGRADECIMIENTOS

Mi especial agradecimiento a la Dra. Beatriz Lizárraga de Olarte, por su asesoría, apoyo y guía durante el desarrollo de esta tesis, además de su preocupación por mi progreso personal y profesional.

Mi mayor respeto y cariño.

A la Mag. Patricia Woll, mi segunda guía durante esta investigación, por sus consejos, apoyo y dedicación en la enseñanza de las técnicas moleculares, así como en la revisión del manuscrito.

Al Biol. Leonardo Romero, por su ayuda desde la concepción del proyecto de tesis y sus importantes críticas a lo largo del desarrollo de este trabajo. Además, agradezco al Dr. Juan Tarazona por su apoyo, observaciones y sugerencias.

A los miembros del Jurado, Dr. Carlos Paredes, Dra. Mercedes Soberón y al Mag. Guillermo Álvarez por sus comentarios y críticas en la revisión de la tesis.

Al Biol. Aldo Indacochea por su permanente colaboración en la colecta de las muestras biológicas de las zonas norte, centro y sur del Perú; y al Biol. Américo Robles de la Universidad de Tumbes por su colaboración en la colecta de las muestras de la zona norte.

El análisis molecular se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular y Ácidos Nucleicos del Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición (UNMSM). El acondicionamiento de los gasterópodos y análisis morfológico se realizó en el Laboratorio de Reproducción y Biología del Desarrollo de la Facultad de Ciencias Biológicas (UNMSM). Agradezco además al Bach Rafael Alvis y al Estud. Diógenes Cerna por su participación en el laboratorio.

Este estudio fue desarrollado gracias al financiamiento del CONCYTEC (Subvención Tesis y Estudios de Postgrado), y GEA-PERU en el “Programa de becas para pequeños proyectos de investigación en la Reserva Nacional de Paracas”.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	pag	1
ABSTRACT		2
INTRODUCCIÓN		3
ANTECEDENTES		
1. Clasificación taxonómica y distribución de <i>Stramonita haemastoma</i> (Linnaeus, 1967)		9
2. Variabilidad morfológica y plasticidad fenotípica.....		11
3. Diversidad genética		14
MATERIAL Y MÉTODOS		21
RESULTADOS		
1. Análisis morfológico		
1.1 Descripción de la morfología externa de la concha		34
1.2 Análisis estadístico		47
2. Análisis aloenzimático		
2.1 Estandarización de la técnica electroforética		62
2.2 Estadística descriptiva de la variabilidad aloenzimática ...		63
DISCUSIÓN		
1. Variabilidad morfológica		73
2. Variabilidad genética poblacional		81
CONCLUSIONES		94
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		96
ANEXOS		108

LISTA DE TABLAS

a.1.	Coordenadas y abreviaturas de los lugares de colecta	pag 24
b.1.	Caracteres considerados para el análisis morfológico	26
1.1.1.	Promedios de los caracteres cuantitativos	39
1.1.2.	Presencia de epibiontes y perforadores expresada en porcentaje	46
1.2.1.	Análisis de varianza (ANOVA) y comparación múltiple entre los caracteres cuantitativos de las poblaciones agrupadas por zonas	49
1.2.2.	Correlación de Pearson y nivel de significancia entre los caracteres cuantitativos	49
1.2.3.	Correlación de Pearson y valores de significancia entre los caracteres cualitativos	50
1.2.4.	Análisis de Componentes Principales basado en la matriz de correlación entre los caracteres cuantitativos	55
1.2.5.	Análisis de Componentes Principales basado en la matriz de correlación entre los caracteres cualitativos	57
1.2.6.	Funciones discriminantes calculadas para 11 variables morfológicas	60
1.2.7.	Porcentaje de individuos correctamente clasificación de acuerdo a los tres grupos predefinidos de <i>S. haemastoma</i>	61
2.2.1.	Frecuencias alélicas, heterocigocidad observada (H_o), esperada (H_e) y promedio para cada locus en cuatro poblaciones	65
2.2.2.	Valores de deficiencia de heterocigotos (D), Chi-cuadrado (χ^2) para cada loci en las cuatro poblaciones de <i>S. haemastoma</i>	66
2.2.3.	Índice F (Nei, 1987) para cada locus en cuatro poblaciones	68
2.2.4.	Identidad genética y distancia genética basado en dos loci para cuatro poblaciones de <i>S. haemastoma</i>	68
2.2.5.	Correlaciones de Pearson y valores de significancia de las correlaciones entre alelos	71
2.2.6.	Análisis de Componentes Principales de los loci <i>Mdh-1</i> y <i>Mdh-2</i> evaluado en cuatro poblaciones	71

LISTA DE FIGURAS

a.1.	Zonas de colecta	pag 25
b1.	Diferencias en la coloración de la concha	27
b.2.	Diferencias en la coloración del labio interno y externo	28
b.3.	Diferencias en presencia de nódulos espirales	29
b.4.	Caracteres Cualitativos: Presencia de epibiontes y perforadores ...	30
1.1.1.	Variaciones en la presencia de tubérculos espirales	40
1.1.2.	Variaciones en la coloración externa	41
1.1.3.	Variaciones en la coloración del labio externo	42
1.1.4.	Variaciones en la coloración del labio interno	42
1.1.5.	Presencia de tubérculos verticales	43
1.1.6.	Variación en la forma del labio interno	43
1.1.7.	Variaciones en el grosor de la concha	44
1.1.8.	Variaciones en el tamaño de los dientes del labio externo	44
1.1.9.	Variaciones en la simetría de los dientes del labio externo	45
1.1.10.	Variaciones en la simetría de las líneas concéntricas	45
1.2.1.	Ploteo de las primera y segunda Componente principal para las variables cuantitativas	55
1.2.2.	Posición relativa de las poblaciones de <i>S. haemastoma</i> de acuerdo al primer y segundo CP basado en una matriz de correlación de las variables cuantitativas	56
1.2.3.	Ploteo bidimensional de las variables cualitativas respecto a los cuatro primeros CP	58
1.2.4.	Posición relativa de las poblaciones de acuerdo a los cuatro primeros CP basado en una matriz de correlación de las variables cualitativas	59
1.2.5.	Posición relativa de los individuos de acuerdo a las dos primeras funciones canónicas	61
2.2.1	Dendograma UPGMA mostrando las relaciones entre las poblaciones basado en distancia genética de Nei	69
2.2.2	Posición relativa de cuatro poblaciones de acuerdo al primer y segundo CP de los loci <i>Mdh-1</i> y <i>Mdh-2</i>	72

2.2.3.	Primer y segundo CP de los alelos de <i>Mdh-1</i> y <i>Mdh-2</i>	
	para las poblaciones de NZO, CPU, SAT y SLA	72
i.	Lugar de colecta en la Playa Paita, Piura, Perú	114
ii.	Lugar de colecta en la Playa Atenas, Ica, Perú	114
iii.	Lugar de colecta en la Playa Lagunilla, Ica, Perú	115
iv.	Lugar de colecta en la Playa Mendieta, Ica, Perú	115
v.	Mapa de TSM de marzo 2006 y 2007	117
vi.	Mapa de TSM de setiembre 2006 y 2007	119

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análisis de variancia
ATP	Adenosina trifosfato
CP	Componentes principales
DMSO	Dimetil sulfoxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
<i>Est</i>	Esterasa
Estadística <i>F</i>	también llamado Índice de Wright
EN	evento El Niño
<i>Fitness</i>	Capacidad de adaptación y reproducción de los organismos
F_{IS}	Reducción de individuos heterocigotos dentro de una subpoblación
F_{ST}	Reducción de heterocigotos en subpoblaciones dentro de una población
F_{IT}	Reducción de individuos heterocigotos en relación al total de la población
<i>Gpt</i>	Glutamato – piruvato transaminasa
He	Heterocigosidad esperada
Ho	Heterocigosidad observada
HWE	Equilibrio de Hardy Weinberg
<i>Idh</i>	Isocitrato deshidrogenasa
<i>Lap</i>	Leucina amino peptidasa
<i>Ldh</i>	Lactato deshidrogenasa
<i>Mdh</i>	Malato deshidrogenasa
<i>Mdhm</i>	Malato deshidrogenasa - isoforma mitocondrial
<i>Mdhc</i>	Malato deshidrogenasa - isoforma citosólica
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonil
RNP	Reserva Nacional de Paracas, Pisco, Ica, Perú
TSM	Temperatura superficial del mar
UPGMA	Unweighted Pair-group Method with Arithmetic Mean

RESUMEN

Variabilidad morfológica y de la aloenzima malato deshidrogenasa en poblaciones peruanas del gasterópodo intermareal *Stramonita haemastoma* (Linnaeus, 1767)

Stramonita haemastoma presenta una amplia distribución en una gran diversidad de ambientes reflejando una alta variabilidad en su morfología y a nivel aloenzimático, tanto dentro como entre poblaciones. En este estudio, 11 poblaciones de la zona norte, centro y sur del Perú fueron colectadas para el análisis de 14 caracteres de la morfología externa de la concha; mientras que 4 poblaciones fueron consideradas para el análisis de la aloenzima malato deshidrogenasa (*Mdh*), a lo largo de una diversidad de hábitats de acuerdo a la temperatura superficial del mar (TSM), exposición al oleaje y corrientes marinas. A nivel morfológico, altas correlaciones fueron observadas entre longitud y peso total. Mayores longitudes fueron observadas en poblaciones expuestas a altas TSM y de alta variabilidad genética. Esto fue atribuido a una mayor actividad, capacidad de fijación a sustrato y en consecuencia a un mayor *fitness* de los organismos. Además, la mayor diferenciación poblacional estuvo influenciada por la variabilidad en la relación entre la longitud total y de la abertura de la boca (índice Lt/Lb) sobretodo entre los organismos de la zona norte. Entre los caracteres cualitativos de influencia ambiental, el desarrollo de tubérculos estuvo relacionado con el nivel de exposición al oleaje. Una diferenciación marcada de las poblaciones del norte se observó a nivel de la coloración y de la variabilidad aloenzimática. A nivel aloenzimático, existe una alta heterocigosidad (H_o 0,14) en el total de las poblaciones de *S. haemastoma*. El índice de fijación de Wright mostró un alto flujo génico (F_{ST} 0,06) entre las poblaciones, mientras que una divergencia de individuos en relación a las poblaciones (F_{IS} 0,154) y al total de las poblaciones (F_{IT} 0,210). Variaciones en el número y frecuencias alélicas estuvieron relacionadas con diferencias en la TSM. Los rangos de la distancia genética de Nei estuvieron entre 0,006 y 0,018, mostrando una mayor similitud entre las poblaciones del norte (Zorritos) y sur (Atenas) de altas TSM. La población de Pucusana (baja TSM) mostró ser monomórfico para *Mdh-2*, mientras que poblaciones de Zorritos y Atenas (altas TSM) presentaron una mayor variabilidad alélica. Además, las variaciones en la heterocigosidad estuvieron relacionadas con variaciones en las tallas de las conchas. La alta H_o (0,9) en Atenas estuvo correlacionada con grandes longitudes de la concha (41,28 mm), mientras un déficit de heterocigotos (0,26) observado en Lagunilla estuvo correlacionado con menores tamaños de conchas (32,38 mm). Sin embargo, no se observó esta correlación cuando las frecuencias alélicas se encontraron cercanos al HWE.

Palabras claves: *Stramonita haemastoma*, morfología, malato deshidrogenasa, variabilidad poblacional, temperatura, distribución.

ABSTRACT

Morphological and malate dehydrogenase allozyme variability in Peruvian populations of the intertidal gastropod *Stramonita haemastoma* (Linnaeus, 1767)

Stramonita haemastoma has a wide distribution in a high environmental diversity, showing a high morphological and allozyme variability, within and between populations. In this study, 11 populations from the north, central and south of Peru were collected, for the analysis of 14 morphological traits of the external shell; whereas 4 populations were considered for the analysis of the malate dehydrogenase (*Mdh*) allozyme, along a diversity of habitats according to the sea surface temperature (SST), wave exposure and marine currents. Morphologically, high correlations were observed between total length and weight. Higher lengths were observed in populations exposed to high SST and of high genetic variability. This was related to a higher activity, fixation capacity to the substrate and in consequence a higher *fitness* of the organisms. A better population differentiation was influenced by the total – aperture lengths index (Lt/Lb), moreover for the north zone. Among the qualitative traits with environmental influence, the growth of nodules was related with the wave exposure level. A wide differentiation of the northern populations was related to the shell color and the allozyme variability. At the allozyme evaluation, a high heterozygosity (H_o 0.14) was observed in the total of *S. haemastoma* populations. Wright's index fixation showed a high gene flow among populations (F_{ST} 0.06), a divergence of individuals relative to the populations (F_{IS} 0.154) and to the total of populations (F_{IT} 0.210). Variations in the allelic number and frequencies were related with the SST differences. Nei's genetic distances range was from 0.006 to 0.018, observing the highest similarity between populations of the north (Zorritos) and south (Atenas) zones with a high SST. Pucusana population (with low SST) was monomorphic for *Mdh-2*, while Zorritos and Atenas populations (with high SST) showed a higher allelic variability. Moreover, variations in the heterozygosity were related with size shell variations. The high H_o (0.9) in Atenas was correlated with larger shells (41.28 mm), while the deficit in heterozygosity observed (0.26) in Lagunilla was correlated with smaller shell sizes (32.38 mm). But, there was no correlation when the allelic frequencies were near the HWE.

Keywords: *Stramonita haemastoma*, morphology, malate dehydrogenase, population variability, temperature, distribution.

INTRODUCCIÓN

La zona intermareal posee una serie de condiciones ambientales muy extremas que influyen en la distribución y abundancia de los organismos que habitan estos ambientes. La variación de los parámetros abióticos, como la temperatura, salinidad, desecación, intensidad de oleaje, entre otros, hacen de éste un ambiente muy heterogéneo, y en ocasiones pueden ser causantes del incremento de la mortalidad poblacional. En este sentido, la diversidad de los microhábitats constituye un factor importante en el desarrollo de mecanismos de adaptación de los organismos, con fluctuaciones en la variabilidad fenética y genética, que pueden significar variaciones en su distribución espacial y temporal.

Uno de los grupos de gasterópodos marinos predadores de exitosa dispersión adaptativa son los murícidos, familia perteneciente al orden Neogastropoda. La mayoría de estos organismos presentan una amplia distribución en la zona intermareal rocosa, y son generalmente utilizados para estudios ecológicos, taxonómicos, fisiológicos o genéticos, debido a su alta variabilidad. Inicialmente, muchos estudios taxonómicos en este grupo estuvieron basados en la morfología externa de la concha; sin embargo, ciertas variaciones son consecuencia de diferencias abióticas típicas de su hábitat, conllevando a una frecuente confusión en su taxonomía (Chiu *et al.*, 2002; Katoh & Foltz, 1994; Kool, 1993).

Diversos autores mencionan que, la influencia de las diferencias geográficas son agentes causantes de presiones selectivas a nivel poblacional, ocasionando variaciones ecofenotípicas en la morfología de la concha (Palmer, 1985a; Palmer, 1985b), referidas como un valor adaptativo a los cambios ambientales. Así por ejemplo, Byers

(1990) y Johannesson *et al.* (1993) reportaron una alta variabilidad en la coloración de la concha en individuos de *Littorina saxatilis*, influenciada por el tipo de sustrato de su hábitat. Variaciones en las esculturas del gasterópodo *Thais lamellosa* han sido relacionados con efectos de predación (Parsons, 1997); mientras que el engrosamiento de la concha ha sido atribuido a diversas causas, como diferencias en el tamaño de los predadores (Kirby *et al.*, 1994), o por efectos de la acción del oleaje (Boulding, 1990).

Por otro lado, cambios en los parámetros abióticos, como la temperatura o salinidad, también han sido relacionados con el desarrollo de procesos adaptativos a nivel fisiológico. Kapper *et al.* (1985) reportaron cambios en la concentración de aminoácidos como alanina y glicina, como mecanismos de regulación de la presión osmótica y de resistencia de los gasterópodos frente a las gradientes de salinidad. Estudios en el género *Haliotis* han correlacionado los cambios de temperatura con las variaciones observadas en el polimorfismo estructural de proteínas (Dahlhoff & Somero, 1991), así como con variaciones cinéticas de algunos alelos aloenzimáticos (Dahlhoff & Somero, 1993).

Muchas veces estas adaptaciones a nivel fisiológico se encuentran relacionadas con cambios ocurridos a nivel genético, de tal manera que le proporcionan a los organismos un mayor *fitness*, es decir una mayor capacidad de sobrevivir y reproducirse ante factores abióticos fluctuantes. Algunos autores mencionan que estas adaptaciones pueden reflejarse en una mayor ventaja en el crecimiento, abundancia y comportamiento (Gosselin & Chia 1995; Langston *et al.*, 2002; Przeslawski, 2004), así como en la capacidad de distribución y dispersión de los organismos, con el

consecuente incremento en el flujo génico (Liu *et al.*, 1991; Apte & Gardner, 2001). Así, Foltz *et al.* (1993) sugieren una aparente ventaja en la viabilidad, dada por cambios en la tasa de crecimiento y consumo de oxígeno, entre los organismos que presentan una alta variabilidad genética o heterocigosis.

Variaciones en las frecuencias alélicas y en la cinética de ciertas aloenzimas como por ejemplo la malato deshidrogenasa (*Mdh*), lactato deshidrogenasa (*Ldh*), entre otras, han sido evaluadas en su relación con una mayor eficiencia catalítica entre poblaciones expuestas a fluctuaciones de temperatura. Así, Freeth & Sin (1986) reportaron variaciones en las frecuencias génicas poblacionales del poliplacóforo *Sypharochiton pelliserpentis* frente a diferencias térmicas a lo largo de una gradiente latitudinal. En este sentido, la diferenciación a nivel intraespecífica varía no sólo de acuerdo a una correlación entre el genotipo y el fenotipo, sino también considerando su interacción con parámetros ambientales (Pigliucci 1996; Johansson *et al.*, 1993; Astorga *et al.*, 2002), pudiendo existir, tal como ha sido reportado en gasterópodos, variaciones morfológicas a pesar de un alta similaridad genética intraespecífica (Laudien *et al.*, 2003; Staton *et al.*, 2000).

La familia Muricidae comprende especies que se encuentra distribuidas a lo largo del litoral peruano, incluyendo algunas especies de importancia ecológica y económica. *Stramonita haemastoma* es un gasterópodo perteneciente a este grupo, de amplia distribución, que habita en la zona intermareal rocosa (Clench, 1947; Kool, 1993). Estudios previos realizados por Liu *et al.* (1991) para poblaciones de las costas del Atlántico norte, mencionan la presencia de una alta variabilidad morfológica de esta

especie influenciado por diferencias en su distribución geográfica, sin presentar grandes diferencias genéticas.

En el Perú, *S. haemastoma* es una de las especies de amplia distribución a lo largo de dos zonas biogeográficas, comprendiendo una zona de transición entre la Provincia Panameña y Peruana (de aguas cálidas) en la costa norte; y una Provincia Peruana (de aguas frías) en la costa centro y sur del Perú (Ramírez, *et al.*, 2003). Si bien la zona sur se caracteriza por presentar temperaturas más bajas, sin embargo diferencias en la circulación de aguas y en la plataforma continental de la Reserva Nacional de Paracas (RNP, Pisco, Ica), incrementan la temperatura de este lugar, registrándose promedios más altos comparado por ejemplo con las temperaturas de la zona central (Romero, 2000). En tal sentido, en este estudio se buscó determinar la variabilidad de la morfología externa de la concha y la variabilidad alélica de la aloenzima *Mdh*, dentro y entre poblaciones de *S. haemastoma* distribuidas entre los 3°28' y 14°02' LS, considerando una diversidad de hábitats como diferencias en tipos de orillas, corrientes marinas y temperatura superficial del mar (TSM) de la costa norte (Tumbes y Piura), centro (Lima) y sur (RNP) del Perú.

Las diferencias a las que se encuentran expuestos los organismos de esta especie, son factores importantes que estarían incrementando la variación intra e interpoblacional, sea por cambios en su distribución o en su genética poblacional. Sin embargo, las características morfológicas y genéticas pueden alterarse en el tiempo por la presencia de cambios eventuales, sea por influencia antropogénica, como contaminación, o por factores naturales como la ocurrencia de Eventos El Niño (EN). Así, variaciones en la distribución de poblaciones o de especies marinas han sido reportados por efectos de

corrientes de aguas durante EN (Paredes *et al.*, 1998), y a lo largo de gradientes latitudinales de temperatura con variaciones a nivel genético (Vermeij & Kool, 1994; Rugh, 1997). Por lo tanto, la determinación de la variabilidad poblacional de la morfología y genética de *S. haemastoma*, resulta importante en la medida en que se encuentran relacionados con procesos adaptativos frente a diferencias abióticas a lo largo de su distribución, permitiendo de esta forma el entendimiento de los procesos involucrados en el mantenimiento y la divergencia poblacional, además de ser importantes a considerar para la conservación de los hábitats.

OBJETIVO GENERAL

- Determinar las variaciones fenéticas dentro y entre poblaciones de *Stramonita haemastoma* (Linnaeus, 1767) distribuidas en una gradiente latitudinal y frente a diferentes tipos de orilla rocosa de las costas del Perú.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Describir las variaciones de los caracteres cuantitativos y cualitativos de la morfología externa de la concha en 11 poblaciones de *S. haemastoma*
- Describir las variaciones de las frecuencias alélicas de dos loci de la enzima Malato deshidrogenasa en 4 poblaciones *S. haemastoma*.
- Determinar la relación entre la variación morfológica y la variabilidad alélica en las poblaciones de *S. haemastoma* distribuidas en condiciones ambientales diferentes.

ANTECEDENTES

1. Clasificación taxonómica y distribución de *Stramonita haemastoma* (Linnaeus, 1767)

La familia Muricidae es la segunda familia más grande del orden de los Neogastropoda, con 500 a 600 especies exclusivamente marinas y de distribución global. Muchos estudios filogenéticos en los Neogastropoda se han basado en el análisis de caracteres de la concha, opérculo, anatomía interna de la probóscide, entre otros. Kool (1993) considera a la morfología de la rádula (importante en la perforación de las valvas para la obtención de su alimento) como un carácter útil para la clasificación taxonómica a nivel de géneros, y como fundamental para los estudios de adaptación en los mecanismos de alimentación. Los Muricidae se distinguen de otros neogastropodos por la presencia de tubérculos o espinas en la concha; sin embargo, el estado taxonómico de los miembros dentro de esta familia no se encuentra bien definido.

Dentro de los Muricidae, la subfamilia Rapaninae son un grupo de gasterópodos predadores, predominantemente habitantes de la zona intermareal rocosa, expuestos a grandes variaciones del oleaje que, consecuentemente, representa un gran impacto en las variaciones de su morfología externa. Vermeij & Carlson (2000) realizaron un análisis filogenético de la subfamilia Rapaninae de acuerdo a descripciones de los caracteres de la concha, en la que se incorporaron además caracteres funcionales, ecológicos, así como evidencia fósil. Ciertas variables como la longitud de la abertura de la boca, dentículos del labio o tamaño de los tubérculos, son considerados como

caracteres de defensa que han evolucionado múltiples veces, sin proporcionar inferencias a nivel filogenético.

Entre los Thaididae, existe una amplia variabilidad en la morfología de la concha conllevando a una frecuente confusión en su taxonomía. Inicialmente, el género *Stramonita* fue ubicado dentro del género *Thais* (Clench, 1947; Abbot, 1974), incluyendo especies carnívoras generalmente predadores de otros moluscos. Keen (1971) hace referencia a los Thaididae como una subfamilia que integra al género *Thais*, posteriormente siendo incluidos dentro de la subfamilia Rapaninae (Kool, 1993). Además, Kool (1993) reporta una separación entre el género *Thais* y *Stramonita*, basado en diferencias anatómicas y morfológicas.

La especie *Stramonita haemastoma* es un gasterópodo marino, frecuente de la zona intermareal rocosa. Posee una amplia distribución geográfica, extendiéndose por el Atlántico Este: Francia, Mar Mediterráneo, oeste del África; Atlántico oeste: Trinidad y Uruguay; y por el Pacífico: Islas Cedros, Baja California, México hasta Valparaíso, Chile. En el Perú, su distribución se encuentra extendida en toda la costa, abarcando dos ecorregiones marinas, reportadas como la zona de transición entre la provincia Panameña y Peruana, y la otra denominada la Provincia Peruana (Ramírez *et al.*, 2003), presentando una gran diversidad morfológica. Algunos autores reportan a esta especie dentro del género *Thais*, y la presencia de subespecies como *T. h. haemastoma*, *T. h. floridiana* y *T. h. haysae* para las costas del Atlántico (Clench, 1947; Abbott, 1974; Andrews, 1971). Bandel (1984) se refiere a la especie *T. floridiana* como una forma ecológica de *T. haemostoma*. Dentro del género *Stramonita*, se han reportado la presencia de dos especies para la zona sur de Estados

Unidos, *S. rustica* distribuida desde Florida a Brasil y la especie *S. haemastoma* distribuída desde Virginia hasta el este de Texas. Sin embargo, otros reportes sugieren que las mencionadas subespecies tan solo se refieren a diferentes morfos de una misma especie, basado en las variaciones externas de la concha. Por otro lado, Kool (1993) sugiere que para la zona del Pacífico ser denominada como *S. biserialis*.

2. Variabilidad morfológica y plasticidad fenotípica

Los organismos marinos, en particular los de la zona intermareal, se encuentran expuestos a una serie de factores causantes de estrés sea por desecación, oleaje, entre otros, que junto con los efectos de predación, competencia, o por impacto humano a causa de la contaminación, destrucción de hábitats, etc., hacen de éste un ambiente de alta variabilidad. El desarrollo de mecanismos adaptativos, base para los procesos de selección natural, permite a los organismos dentro de una población sobrevivir ante los cambios ambientales y que en el tiempo puede conducir a cambios en la variabilidad genética.

Entre los organismos marinos, en particular de la zona intermareal, los caracteres morfológicos pueden responder plásticamente ante los factores ambientales característicos de estas zonas como cambios térmicos, intensidad del oleaje, etc (De Wolf *et al.*, 1997, Leonard *et al.*, 1999). Estudios en la especie de coral *Briareum asbestinum* reportaron la presencia de plasticidad morfológica a nivel del esqueleto que es regulada como una respuesta ante la intensidad de la exposición solar o relacionada con la profundidad del arrecife (West *et al.*, 1993). Reportes en el cirripedio *Chthamalus anisopoma* mencionan modificaciones en la forma de los

individuos a causa de la depredación (Lively, 1986). Por otro lado, entre los crustáceos, las variaciones en los apéndices y del tamaño del cuerpo han sido reportadas estar reguladas por diferentes condiciones oceanográficas (Sarda *et al.*, 1998).

Entre los murícidos, caracteres morfológicos como el tamaño, forma, color y estructura de la concha son utilizados para su clasificación taxonómica, siendo esto una limitante debido a la presencia de una plasticidad fenotípica característica de este grupo frente a cambios ambientales. Palmer (1985b) menciona la influencia de presiones selectivas por diferencias en los tipos de orillas que explican las variaciones observadas entre los morfotipos, con una respuesta morfológica adaptativa. Kirby *et al.* (1994) reportaron un engrosamiento de los labios de la concha en *Nucella lapillus* como un mecanismo de reducción de la vulnerabilidad al ataque de los cangrejos. Parsons (1997) reportó variaciones en la presencia de tubérculos en *Thais lamellosa* relacionado con efectos de depredación. Además, también menciona que si bien el crecimiento en los gasterópodos es parcialmente derivado de una parte genética, también posee una componente de plasticidad fenotípica estacional dada por variaciones en la temperatura, disponibilidad del alimento o densidad poblacional.

La variación de caracteres cuantitativos en los moluscos ha sido relacionada con diferencias en los microhábitats. Así, por ejemplo Chiu *et al.*, (2002) reportaron una reducción en la porción espiral de la concha frente bajas cantidades de calcio en el agua, en la medida en que constituye una limitante en el crecimiento de los gasterópodos. Por otro lado, entre los caracteres cualitativos se ha reportado un alto polimorfismo en la coloración de la concha que se encuentra relacionado con una

variabilidad jerárquica dentro de especies (Ekendahl & Johannesson, 1997). Algunos estudios han determinado la presencia de correlaciones entre los parámetros ambientales (como el color del sustrato) y la frecuencia en la coloración en *L. saxatilis*. Conchas de color más oscuras han sido encontradas en tipos de roca oscura, sugiriendo así la presencia de un efecto de selección críptica (Byers, 1990), mientras que el tipo de coloración de la concha bandeada ha sido relacionada a sustratos más variables y con zonas de bajos niveles de marea (Johannesson *et al.*, 1993).

Si bien las diferencias morfológicas se relacionan con respuestas plásticas moduladas ambientalmente, también pueden estar determinadas por procesos selectivos y genéticos, asociados con algunos loci polimórficos. Así, la correlación entre el tipo de sustrato y la coloración de la concha estaría relacionada con un proceso selectivo visual por parte de los predadores en los gasterópodos, cambiando por lo tanto su componente genética. Por otro lado, el incremento de la plasticidad fenotípica también se encuentra relacionado con la amplia dispersión de los organismos. Los organismos que presentan una restricción en la dispersión de sus larvas estarían relacionados con una adaptación genética local; mientras que largas distancias de migración incrementan el flujo génico de los organismos influenciando en la presencia de diferencias intraespecíficas en una pequeña escala, y que no siempre promueven una homogeneidad fenotípica (Parsons, 1997).

3. Diversidad genética

Heterocigosidad

La deriva, selección, flujo génico y dinámica de las metapoblaciones son factores importantes en los procesos evolutivos y que afectan el nivel de la diversidad genética. La migración se define como el movimiento de los individuos entre poblaciones en donde ocurre un flujo de genes; mientras que las fluctuaciones en las frecuencias de alelos que ocurren al azar y particularmente en pequeñas poblaciones, se denomina deriva génica. Otro de los factores importantes en los procesos evolutivos es la selección natural, que actúa directamente en el fenotipo de los organismos, y que junto con la interacción del ambiente, finalmente actúan en el genotipo produciendo cambios en las frecuencias alélicas.

Una de las medidas de variabilidad genética más utilizadas son las frecuencias alélicas o genotípicas, que expresan la proporción de un determinado alelo o genotipo respecto a todos los alelos o genotipos presentes en un locus en una población. La variabilidad genética que está relacionada con las frecuencias de genotipos heterocigotos son medidos como Heterocigosidad (H). Esta H puede incrementarse dependiendo de la capacidad de dispersión de los organismos así como de la variabilidad en el tamaño poblacional, y cuya variación representa un potencial adaptativo.

Levinton y Suchanek (1978) reportaron para individuos de gran capacidad de dispersión dentro del género *Mytilus*, un alto flujo génico dando como resultado altos

niveles de variación genética. Selander & Kaufman (1973) determinaron que los niveles de heterocigosidad aloenzimática disminuyen en poblaciones grandes y que presenten organismos con altos niveles de migración (como los vertebrados), comparado con aquellos más pequeños y de relativa inmovilidad (como la mayoría de invertebrados). Sin embargo, la variación genética poblacional también se encuentra influenciada por patrones espaciales y temporales de la variación ambiental, presentando estrategias adaptativas relaciona. Levins (1968) propuso la idea de una estrategia de adaptación en individuos que presentan una baja tasa de migración ya que se encuentran expuestos a cambios ambientales espaciales y temporales más drásticos.

Estructura de poblaciones

La pérdida de heterocigosidad relativa a lo esperado dentro del equilibrio de Hardy-Weinberg puede medirse a diferentes niveles jerárquicos mediante la denominada Estadística F, explicando una estructura de las poblaciones a nivel genético. La estructura genética de poblaciones se puede inferir a partir de la distribución de los alelos en los loci de los genes. Así, por ejemplo, mediante la estadística F se puede medir la reducción proporcional de heterocigotos dentro de las subpoblaciones debido al entrecruzamiento (F_{IS}), la diferenciación entre subpoblaciones que generalmente se denomina como Índice de Fijación (F_{ST}), y la reducción en la heterocigosidad de un individuo relativo al total de la población debido al entrecruzamiento dentro de las subpoblaciones (F_{IT}).

Diversos estudios de la estructura poblacional, capacidad de dispersión, niveles de flujo génico, reclutamiento, o efectos de selección realizados en organismos marinos, se han basado en el análisis del polimorfismo de proteínas, observando en ocasiones la presencia de efectos selectivos por factores ambientales que afectan a un locus determinado (Burton, 1994).

Las estrategias de respuesta frente a las variaciones ambientales dependen del nivel de heterocigosidad y de las variaciones en el flujo génico entre las poblaciones, y que en consecuencia se relacionan con la capacidad de dispersión de los individuos. Generalmente, entre los organismos marinos sésiles, la estructura genética poblacional se encuentra correlacionada con los diferentes niveles de dispersión de sus estadíos larvales; así por ejemplo, los organismos con estadio larval planctónico presentan amplia dispersión y por ende bajos niveles en su estructura genética poblacional. Sin embargo, existen ciertas barreras que varían la estructura poblacional, impidiendo la dispersión larval a causa de diferentes corrientes oceánicas, la presencia de un estadio larval corto, o por eventos históricos que ocasionan una fragmentación poblacional. Ciertas poblaciones, a pesar de presentar una amplia dispersión larval, pueden presentar una divergencia genética debido a la presencia de procesos selectivos que se encuentran relacionados con diferencias geográficas y que ocasionan subdivisiones genéticas poblacionales (Burton, 1994; Hilbish, 1996).

Variabilidad genotípica y cambios ambientales

Cambios en las condiciones ambientales pueden inducir a la diferenciación fenotípica de poblaciones que comparten una misma variabilidad genética. Altos niveles de diferenciación genética en especies de desarrollo directo, dan por resultado un mosaico de poblaciones o ecotipos adaptados localmente que se traduce como altos niveles de variación fenotípica entre las poblaciones. Por otro lado, generalmente se menciona que entre los organismos que poseen un estadio larval planctónico ocurre una mayor homogeneidad poblacional a nivel fisiológico y morfológico comparado con aquellos de desarrollo directo. Sin embargo, la amplia dispersión de estos individuos en ocasiones se puede ver restringida por diferencias en los parámetros ambientales, y se refleja con variaciones a nivel genético, en la determinación del flujo génico (Burton, 1994; Knowlton *et al.*, 1993; Parsons, 1998).

Así, los organismos que presentan un bajo flujo génico por una restricción en la dispersión de los individuos, y cuyas diferencias ambientales son mantenidas en el tiempo pueden conducir a una adaptación local por medio de la diferenciación genética. Sin embargo, aunque un alto flujo génico restringe la diferenciación poblacional, también se sabe que ante un alto flujo génico durante variaciones temporales de las condiciones ambientales podrían conducir a una adaptación local donde ciertas variaciones genotípicas confieren un alto *fitness*. Estas diferencias existentes entre los macro-ambientes pueden causar efectos selectivos entre los loci responsables de procesos adaptativos a los cambios ambientales, y generando en consecuencia una diferenciación genética a nivel interpoblacional (Endler, 1995; Carvalho *et al.*, 1996).

Si bien diversos estudios de estructura de poblaciones se han basado en el análisis aloenzimático, también es conocido que ciertas enzimas no son selectivamente neutrales ya que se encuentran relacionadas con ciertos procesos adaptativos. Así, variaciones en la fisiología de los organismos pueden observarse a nivel de diferencias en la bioquímica de ciertas aloenzimas que se encuentran sujetas a procesos de selección ligadas al *fitness* del organismo frente a las diferencias abióticas de su hábitat.

La aloenzima Lactato B deshidrogenasa (*Ldh*) ha sido muy relacionada con procesos adaptativos. Reportes en poblaciones del pez *Fundulus heteroclitu* de la costa norte de América mencionan la existencia de una alta correlación entre las diferencias en las frecuencias alélicas del locus *Ldh* con respecto a su distribución latitudinal. Estas diferencias en las frecuencias alélicas estarían relacionadas con la concentración intracelular de la molécula de ATP en los eritrocitos y la capacidad de disociación del oxígeno en la hemoglobina, permitiéndoles a los organismos adultos una mayor capacidad y resistencia a migraciones por grandes distancias (Crawford & Powers, 1989).

Por otro lado, cambios en la salinidad parecen también ser otro factor que actúa como un agente selectivo con relación a las variantes en las frecuencias alélicas de aloenzimas, y ligado a un genotipo dependiente. Diferencias en la aloenzima Glutamato – piruvato transaminasa (*Gpt*) han sido relacionadas con la distribución poblacional del copépodo *T. californicus* en las zonas intermareales altas frente a severas fluctuaciones de la salinidad. De igual forma, variaciones alélicas de la enzima Leucina amino peptidasa (*Lap*) reportadas en el bivalvo *Mytilus edulis* han

sido relacionadas con una mayor capacidad de respuesta celular del organismo frente a cambios de salinidad (Burton, 1994). Al parecer, el mantenimiento de la variabilidad genética para ambos loci sugiere la presencia de un rol selectivo enzimático de tolerancia frente a las fluctuaciones de la salinidad.

La temperatura es uno de los parámetros físicos importantes que afecta la distribución y abundancia de los organismos marinos. Al parecer cambios en la temperatura se relacionan con diferencias adaptativas térmicas que ocurren en la estructura o función de algunas proteínas proporcionándole al organismo, por ejemplo, una mayor eficiencia catalítica. Una de las aloenzimas que ha sido considerada para estudios de estructura de poblaciones así como para la evaluación de sus variaciones como respuestas adaptativas a los cambios ambientales es la Malato deshidrogenasa (*Mdh*). Dahlhoff & Somero (1993) reportaron en cinco especies del género *Haliotis* del Pacífico este, diferencias en la estabilidad térmica y la sensibilidad de las propiedades cinéticas de la enzima *Mdh* en su forma citosólica, frente a alteraciones de la temperatura, y que además estaría relacionado con una historia evolutiva en este género.

Reportes en invertebrados mencionan la presencia de dos loci que codifican la enzima *Mdh*, correspondiente a una isoforma mitocondrial (*Mdhm*), y a una isoforma citosólica (*Mdhc*), utilizando como sustrato el malato, compuesto orgánico implicado en las rutas principales del metabolismo que interviene en el ciclo de Krebs. Generalmente, esta enzima se encuentra en altas concentraciones en tejidos de alta actividad, tales como en el tejido muscular de los invertebrados (Lazou *et al.*, 1987); actúa en coordinación metabólica a nivel del citosol y la mitocondria, encontrándose

en mayor expresión en animales con alta actividad y frecuencia alimenticia (Maly *et al.*, 1994; Dahlhoff & Somero, 1991). La isoforma mitocondrial (*Mdhm*) es primariamente una enzima del ciclo de ácido tricarboxílico Krebs, presente en tejidos de alta actividad aeróbica, que cataliza un importante paso en la oxidación de carbohidrato; además esta isoforma juega un importante rol en la glucogénesis de procesos anaeróbicos. Por otro lado, la isoforma citosólica (*Mdhc*) ha sido relacionada con el mantenimiento del balance redox en el citosol, así como en la reducción de la conexión de equivalentes entre citosol y mitocondria.

MATERIAL Y MÉTODOS

a. Colecta de material biológico.

Se colectaron un total de 443 individuos procedentes de 11 playas distribuidas en tres zonas (Tabla a.1). En la zona norte, se realizaron colectas en el departamento de Tumbes: en la Playa Zorritos (número de muestra $n = 95$), Puerto Pizarro ($n = 23$); y en el departamento de Piura: en Máncora ($n = 36$) y Paita ($n = 44$). En la zona centro del Perú, se realizaron colectas en el departamento de Lima: Playa Ancón ($n = 32$) y Playa Pucusana ($n = 35$). En la zona sur, se colectó en cinco playas en el departamento de Ica (Reserva Nacional de Paracas): Playa Atenas ($n = 55$), Playa Arquillo ($n = 36$), Playa La Mina ($n = 27$), Playa Lagunilla ($n = 26$), y Mendieta ($n = 31$) (Fig. a.1). Todas las muestras fueron colectadas al azar en poblaciones naturales de la zona intermareal hasta los 3 m de profundidad. Dentro de las 24 horas de la colecta, las muestras fueron transportadas vivas al laboratorio, limpiadas y acondicionadas en peceras con agua de mar para su posterior disección y análisis. Inmediatamente luego de la colecta de los organismos, porciones de tejido muscular del pie fueron extraídas y almacenadas en tubos eppendorfs a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ para el posterior análisis aloenzimático. Todas las conchas fueron limpiadas de tejido blando y almacenadas para su análisis morfológico.

b. Análisis Morfológico.

La variabilidad morfológica a nivel poblacional se evaluó en 16 caracteres externos de la concha, incluyendo variables cuantitativas y cualitativas (Tabla b.1). Entre los caracteres cuantitativos, se consideraron el peso total (Pt) ($\pm 0,1$ g), así como mediciones de longitud como la longitud total de la concha (Ltt) y del diámetro mayor de la abertura de la boca (Lb) que fueron medidos utilizando un vernier con 0,1 mm de precisión. Con el fin de excluir el efecto de la longitud total en las diferencias del diámetro de la boca, se calculó una nueva variable denominada Índice de longitud (IndLo) que consistió en la relación entre Lb y Ltt. También se consideró el análisis de la relación entre el peso y longitud totales denominándolo como Índice Peso-Longitud (IndPl). Por otro lado, entre los caracteres cualitativos, se evaluaron diferencias en la coloración externa (Col) de la concha (Fig b.1), del labio interno (Licol) y del labio externo (Lexcol) (Fig. b.2), diferencias en el grosor (Gr), la presencia y el tamaño de nódulos o tubérculos tanto espirales (TbH) (Fig b.3) como axiales (TbV), tamaño (Dta) y simetría (Dsi) de los dentículos, simetría de las líneas concéntricas (Lcc), y la forma del labio interno (Lifo). Además, también se evaluó la presencia de epibiontes (Ep) y perforadores (Perf) (Fig. b.4).

Para el análisis estadístico, los datos fueron previamente transformados utilizando $\log_{10}(x)$, luego fueron sometidos al ANOVA para probar las diferencias entre las zonas, y se aplicó la Prueba de Tukey para establecer las diferencias entre las categorías consideradas. Se realizó el análisis de correlación de Pearson entre las variables cuantitativas y entre las cualitativas. Para identificar la relación entre las variables e identificar aquellas que proporcionan la mayor variabilidad, se realizó el análisis de Componentes Principales (CP) (Liu *et al.*, 1991; Day *et al.*, 2000). Además, se aplicó el análisis de Discriminante para identificar las variables que

determinan las mayores diferencias entre los grupos predefinidos como norte, centro y sur, así como para determinar una máxima discriminación entre los individuos de los grupos poblacionales predefinidos (Janson & Sundberg, 1983). Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el Programa estadístico SPSS 16.0.

TABLA a.1. Lugares de colecta, coordenadas y abreviaturas de las localidades consideradas para el análisis morfológico del gasterópodo *Stramonita haemastoma* (*RNP* = *Reserva Nacional de Paracas*)

Zona	Lugar	Departamento	Coordenadas	Código
NORTE	Puerto Pizarro	Tumbes	3°30' S – 80°22' O	NPI
	Zorritos	Tumbes	3°40' S – 80°39' O	NZO
	Máncora	Piura	4°06' S – 81°03' O	NMA
	Paita	Piura	5°05' S – 81°06' O	NPA
CENTRO	San Francisco, Bahía Ancón	Lima	11°47' S – 77°10' O	CAN
	Pucusana	Lima	12°29' S – 76°48' O	CPU
SUR	Atenas, Bahía Paracas	Ica (<i>RNP</i>)	13°50' S – 76°18' O	SAT
	Lagunilla, Bahía Lagunillas	Ica (<i>RNP</i>)	13°53' S – 76°18' O	SLN
	La Mina	Ica (<i>RNP</i>)	13°54' S – 76°19' O	SLA
	Arquillo	Ica (<i>RNP</i>)	13°55' S – 76°20' O	SAQ
	Mendieta	Ica (<i>RNP</i>)	14°02' S – 76°15' O	SMN

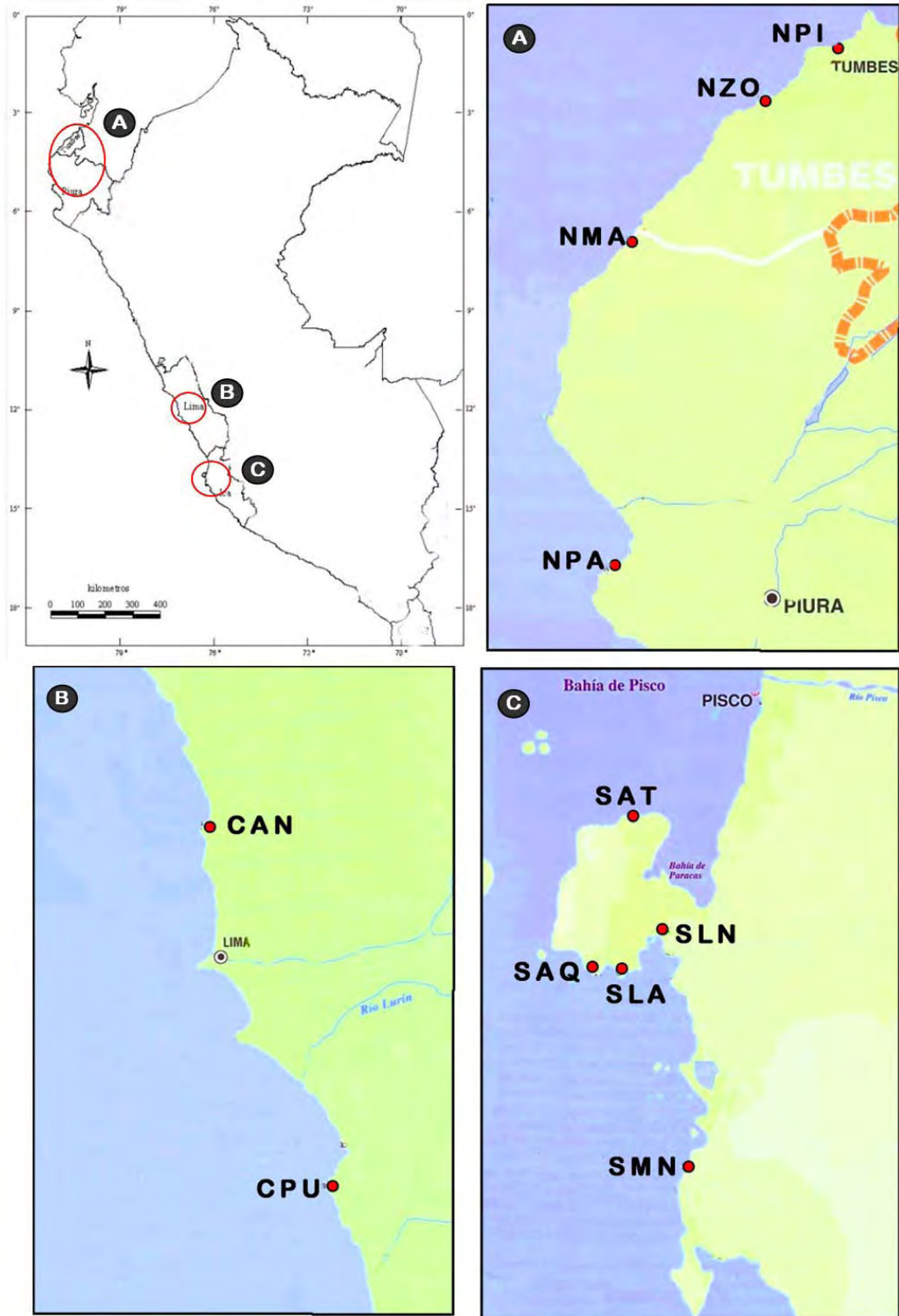


FIGURA a.1. Zonas de colecta de las poblaciones de *S. haemastoma* procedentes del norte (NPI = Puerto Pizarro, NZO = Zorritos, NMA = Máncora, NPA = Paita), centro (CAN = Ancón, CPU = Pucusana), y sur (SAT = Atenas, SAQ = Arquillo, SLA = La Mina, SLN = Lagunilla, SMN = Mendieta) del Perú.

TABLA b.1. Relación de los caracteres considerados para el análisis de la morfología externa de la concha de *S. haemastoma*.

Carácter Morfológico		Categorías
<i>Caracteres cuantitativos</i>		
1. Ltt	Longitud total	(milímetros)
2. Lb	Diámetro mayor de abertura de la boca	(milímetros)
3. Pt	Peso total	(gramos)
4. IndLo	Índice de Longitud	Lb/Ltt
5. IndPl	Índice Peso-Longitud	Pt/Ltt
<i>Caracteres cualitativos</i>		
6. TbH	Nódulos espirales	(0)=ausencia; (1)=pequeños; (2)=medianos; (3)=grandes
7. TbV	Nódulos axiales	(0)=ausencia; (1)= presencia
8. Gr	Grosor	(1)=delgado; (2)=grueso
9. Lsi	Líneas concéntricas: simetría	(0)=simétrico; (1)= asimétrico
10. Dsi	Dentículos del labio externo: simetría	(0)=simétrico; (1)=asimétrico
11. Dta	Dentículos del labio externo: tamaño	(1)=pequeños; (2)=medianos; (3)=grandes
12. Col	Coloración de la concha	(0)=ausencia; (1)=moteado; (2)=bandas espirales; (3)=bandas axiales
13. Lexcol	Coloración labio externo	(1)=blanco-marrón; (2)=marrón- naranja; (3)=naranja
14. Licol	Coloración labio interno	(1)=marrón; (2)=naranja
15. Lifo	Labio interno: forma	(0)=curvo; (1)=recto
16. Ep	Epibiontes	(0) = ausencia; (1) = poca presencia; (2) = parcial; (3)= abundante
17. Perf	Perforadores	(0) = ausencia; (1) = poca presencia; (2) = parcial; (3)= abundante

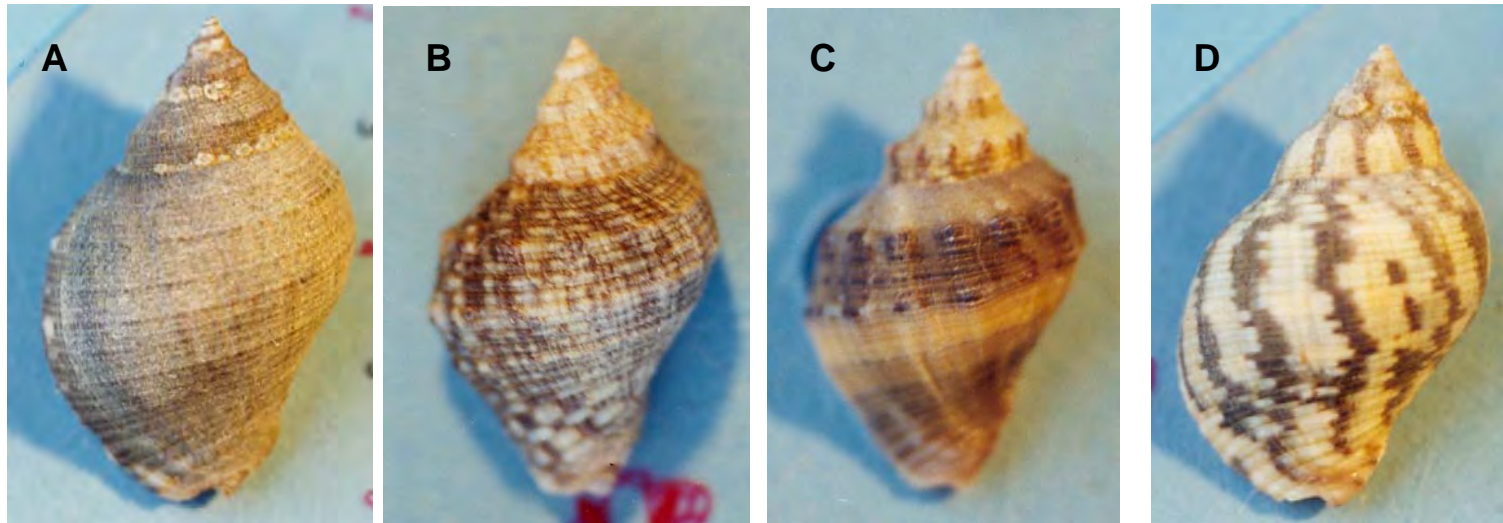


FIGURA b.1. Ejemplares de *S. haemastoma* diferenciados según la coloración de la concha. (A) *Categoría 0* o ausencia de coloración, (B) *Categoría 1* o moteado, (C) *Categoría 2* o patrón de bandas espirales, (D) *Categoría 3* o patrón de bandas axiales

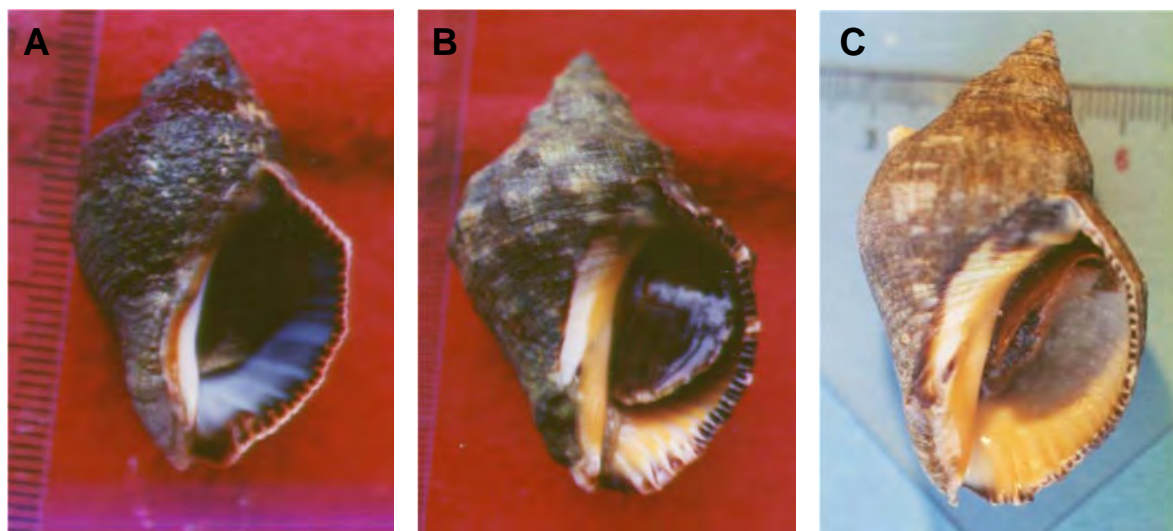


FIGURA b.2. Ejemplares de *S. haemastoma* diferenciados según la coloración del labio interno y externo. (A) *Lexcol* categoría 1 y *Licol* categoría 1, (B) *Lexcol* categoría 2 y *Licol* categoría 2, (C) *Lexcol* categoría 3 y *Licol* categoría 2.

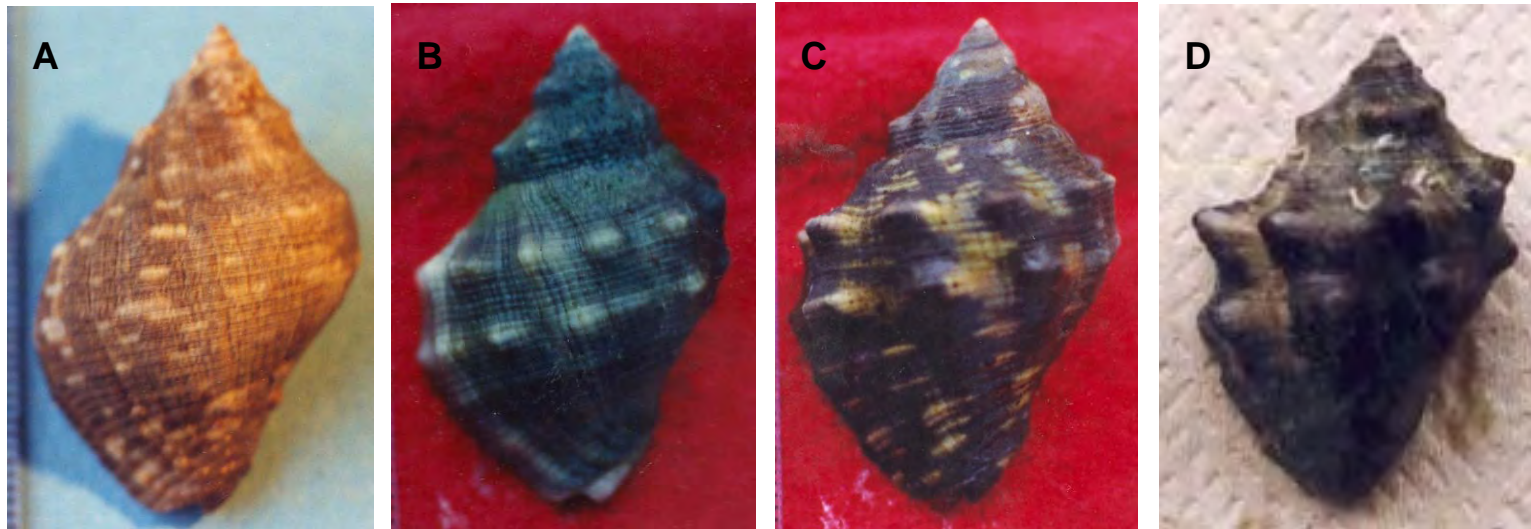


FIGURA b.3. Ejemplares de *S. haemastoma* diferenciados según la presencia de nódulos espirales en la concha. (A) *Categoría 0 o ausencia de nódulos*, (B) *Categoría 1 o nódulos pequeños*, (C) *Categoría 2 o nódulos medianos*, (D) *Categoría 3 o nódulos grandes*.

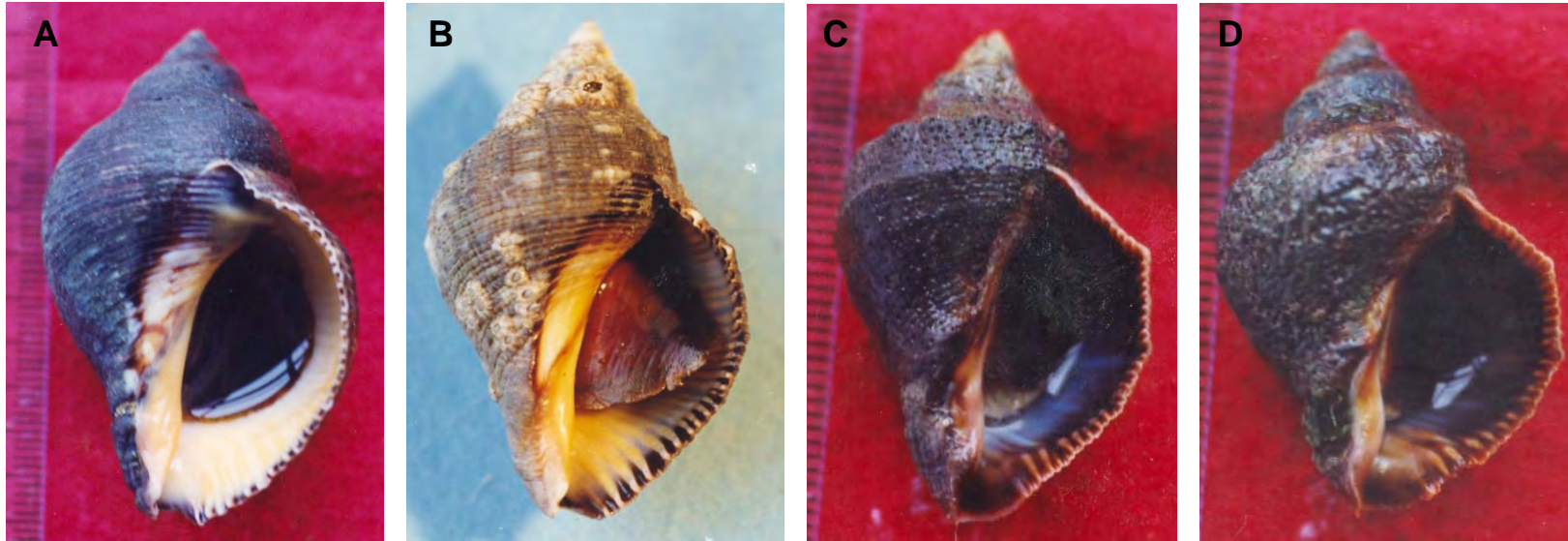


FIGURA b.4. Ejemplares de *S. haemastoma* diferenciados de acuerdo a la presencia de epibiontes y perforadores

Epibiontes: (A) *Categoría 0 o ausencia de epibiontes*, (B) *Categoría 1 o poca presencia*;

Perforadores: (C) *Categoría 2 o presencia parcial* (D) *Categoría 3 o total*.

c. Análisis aloenzimático

Para la extracción de las proteínas, aproximadamente 50 mg de tejido muscular fueron colocados en tubos eppendorfs de 1,5 ml y homogenizados en frío en presencia de un buffer de homogenización. Para la estandarización de la extracción de aloenzimas, se probaron diferentes volúmenes y concentraciones del buffer de homogenización, evaluando la presencia de compuestos como Tritón X-100 y otros que contribuyan a la disminución de la degradación proteica, como EDTA, DMSO, NAD o PMSF (Anexo 1). Las muestras fueron centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos y el sobrenadante fue almacenado a -70 °C. Las proteínas fueron separadas por electroforesis utilizando membranas de acetato de celulosa (Laboratorios Helena) como soporte, previamente sumergidas en un buffer de corrida. Las muestras fueron colocadas en las membranas con la ayuda de un aplicador de 0,5 µl, y luego las membranas fueron colocadas en una cámara electroforética horizontal Microzone. La electroforesis se realizó a 200 voltios por 20 min. Dos loci de la enzima Malato deshidrogenasa (*Mdh* EC 1.1.1.37) fueron evaluados. Para el revelado, se utilizó una solución Malato pH 8,0 como sustrato. Las membranas fueron incubadas a 37 °C por 20 min de acuerdo a Herbert & Beaton (1993), con algunas modificaciones (Anexo 2). Los alelos de cada locus fueron designados por letras teniendo como referencia la movilidad relativa del alelo más común, el cual fue designado como “a”. Para el análisis aloenzimático se consideraron poblaciones distribuidas en localidades que presentan diferencias respecto a tipos de orilla, TSM y distribución latitudinal. Se evaluaron cuatro poblaciones procedentes de la Playa Zorritos (Tumbes), Playa Pucusana (Lima), Playa Atenas (Ica) y Playa Lagunillas (Ica).

La estadística descriptiva fue calculada utilizando el programa POPGENE versión 1.32 (Yeh *et al.*, 1999). Para cada población se calculó el número de alelos por locus, las frecuencias alélicas, heterocigocidad observada (H_o), heterocigocidad esperada (H_e) y heterocigocidad promedio (H') según Nei (1978). Además, para cada locus, se evaluó la desviación de las frecuencias alélicas respecto al equilibrio de Hardy-Weinberg (HW) mediante la prueba de Chi-cuadrado. La deficiencia de heterocigotos se expresó como $D = (H_o - H_e)/H_e$.

Para identificar los alelos de mayor utilidad en la diferenciación poblacional, se realizó el análisis de CP mediante el programa estadístico Multivariado SPSS vs.16. Los alelos de cada locus fueron considerados como variables, donde para cada individuo los alelos de cada loci fueron codificados de la forma binaria, es decir como presencia o ausencia y fueron anotados en la matriz de datos como 0 o 1 (Day *et al.*, 2000).

Tres estadísticas jerárquicas denominados como índice F (Weir & Cockerman, 1984) fueron calculados para medir, a partir del equilibrio esperado de HW, la reducción en heterocigotos de individuos dentro de subpoblaciones (F_{IS}), de individuos en relación al total de la población (F_{IT}), y la cantidad de divergencia entre subpoblaciones respecto a la cantidad limitante bajo total fijación de toda la población (F_{ST}). Cada población fue considerada como una submuestra.

A fin de establecer una diferenciación genética a partir de las diferencias en frecuencias alélicas, se calculó la distancia genética entre poblaciones según Nei (1978) calculada mediante el programa POPGENE. Además, se realizó el análisis de

agrupamiento utilizando el método UPGMA (Unweighted Pair-group Method with Arithmetic mean) mediante el programa MEGA vs.4, donde las relaciones más cercanas entre las poblaciones se identifican en orden de similaridad genética decreciente.

RESULTADOS

1. Análisis morfológico

1.1. Descripción de la morfología externa de la concha

Los resultados del análisis de los caracteres cuantitativos (Tabla 1.1.1) y cualitativos como TbH (Fig. 1.1.1), Col (Fig. 1.1.2), Lexcol (Fig. 1.1.3), Licol (Fig. 1.1.4), TbV (Fig. 1.1.5), Lifo (Fig. 1.1.6), Gr (Fig. 1.1.7), Dta (Fig. 1.1.8), Dsi (Fig. 1.1.9) y Lsi (Fig. 1.1.10), así como la presencia de epibiontes y perforadores (Tabla 1.1.2) en los individuos de cada población, se describen a continuación agrupados de acuerdo a las tres zonas colectadas:

- *Zona Norte:*

Puerto Pizarro y Zorritos: Los individuos presentaron valores del índice de longitud de 0,76 y 0,75; y el índice peso-longitud entre 0,23 y 0,24 respectivamente. Conchas muy nodulosas predominando la categoría 3 (52% y 35% respectivamente). Al igual que para todas las poblaciones colectadas de la zona norte, se observó una predominancia de bandas distribuidas en un patrón axial (> 52%), coloración del labio interno naranja y del labio externo naranja. Escasa presencia de nódulos axiales (35% de los individuos aproximadamente), líneas concéntricas asimétricas. Dentículos pequeños y asimétricos. Ausencia de epibiontes (entre 61 y 65%) y de perforadores (85 a 91% de los individuos).

Máncora: Los individuos presentaron los valores morfométricos promedio más altos de la zona norte, con una longitud total de 34,86 mm, diámetro abertural de 26,86 mm, e Índice de longitud (0,78), e índice peso-longitud de 0,22. Las conchas son nodulosas, presentando entre las categorías 1 y 2 (42% y 47%, respectivamente), con de bandas distribuidas en un patrón axial en la concha, labio interno naranja y labio externo naranja y naranja - marrón. Predominancia de dentículos pequeños y simétricos (75%). Escasa presencia de epibiontes y perforadores.

Paita: Los individuos colectados presentaron los valores morfométricos menores de la zona norte, con un peso total de 5,41 g, longitud total 30,76 mm, diámetro abertural de 23,91 mm y el índice peso-longitud de 0,17, sin embargo presentaron el Índice de longitud promedio más alto (0,78), al igual que Máncora,. Conchas delgadas (59%) y gruesas (41%), y poco nodulosas (64% de los individuos de categoría 1). Predominantemente ausencia de bandas (38%) o con bandas axiales (32%), labio interno curvo naranja, y labio externo naranja. Ausencia de nódulos axiales (68%), líneas concéntricas simétricas. Los dentículos son predominantemente grandes (82%) y simétricos (75%). Nula o escasa presencia de epibiontes y perforadores (categoría 0 y 1).

- Zona Centro:

Los individuos de la Playa Ancón mostraron valores morfométricos promedio más bajos respecto a la población de Pucusana, con un peso total promedio de 5,32 g, longitud total promedio de 31,28 mm, longitud abertural promedio de 20,34 mm e

índice peso-longitud de 0,17. Tanto Ancón (0,65) como Pucusana (0,66) presentaron índices de longitud muy bajos respecto al resto de poblaciones colectadas de la zona norte y sur (excepto La Mina).

Respecto a los caracteres cualitativos, los individuos entre ambas localidades mostraron conchas frecuentemente ausente de coloración (> 50%), de labio interno marrón (100%) y labio externo marrón – blanco (> 90%). Predominantemente ausentes de tubérculos verticales (> 65%). Simetría de dientes (> 78%) y de líneas concéntricas (> 75%).

Se observaron diferencias entre ambas poblaciones respecto a la presencia de nódulos, grosor de la concha y tamaño de dientes. Los individuos de Ancón mostraron predominantemente conchas poco nodulosas (63% con categoría 1), conchas delgadas (72%) y de dientes pequeños a medianos. Mientras que los individuos de la localidad de Pucusana mostraron conchas nodulosas (60% de individuos con categoría 2), conchas más gruesas (> 57%) y de dientes pequeños (94% de grado 1). Además, los individuos de Pucusana mostraron mayores valores promedio de longitud total (34,98 mm) y longitud de abertura (23,13 mm) respecto a Ancón.

- Zona Sur:

Atenas: Los individuos colectados presentaron los valores promedios cuantitativos más altos respecto al resto de localidades del sur, Con una longitud total promedio de 41,28 mm, longitud de abertura de 29,21 mm, peso total 12, 71 g, e índice de longitud de 0,72 ($\pm 0,02$), e índice peso-longitud de 0,27 al igual que Arquillo. Predominando

individuos de concha gruesa (64%) y de dientes del labio pequeños (56% con categoría 1). En cuanto a la coloración, se observó la presencia de bandas axiales y espirales, con coloración del labio interno naranja (67%) y labio externo marrón-blanco (51%) o marrón-naranja (44%). Conchas poco nodulosas (entre categorías 0 y 1) y predominantemente ausencia de tubérculos axiales. Simetría en las líneas concéntricas (53%) y los dientes (66%). Predominantemente ausente de epibiontes (54% de individuos de categoría 0 y 40% de categoría 1), y perforadores (78% de categoría 0).

La Mina: Los individuos presentaron los valores cuantitativos más bajos respecto al resto de localidades colectadas en la zona sur. Con una longitud total promedio de 32,38 mm, longitud de abertura 21,13 mm, índice peso-longitud de 0,18m, e índice de longitud 0,65 ($\pm 0,04$), similar a las poblaciones del centro, Ancón y Pucusana. Con conchas delgadas y de dientes del labio gruesas. Coloración de la concha predominantemente ausente (74% de los individuos), con labio interno marrón (93%) y labio externo de color marrón (92%). Presencia de nódulos medianas de categoría 2 en un 52% de los individuos, y de categoría 1 en un 33%. Ausencia de nódulos axiales. Asimetría en las líneas concéntricas (96%) y en los dientes (82%). Gran presencia de perforadores, predominando individuos (74%) con tipo 3, y menor presencia de epibiontes (52% de individuos de categoría 1).

Arquillo, Lagunilla y Mendieta: Los individuos presentaron valores promedio de índice de longitud similares entre estas poblaciones (0,69 en Mendieta, 0,70 en Arquillo y 0,71 en Lagunilla), mientras que se encontraron diferencias en el índice Pt/Ltt observándose valores más altos en Arquillo (0,27) respecto a Lagunilla (0,18) y

Mendieta (0,16). De acuerdo al análisis cualitativo, presentaron conchas gruesas y presencia de dientes pequeños en el labio externo. Conchas poco a medianamente nodulosas (categoría 1 y 2). Ausencia de coloración de la concha, labio interno marrón y labio externo marrón – blanco predominantemente, o marrón – naranja. Sin embargo, Arquillo se diferenció de las otras localidades por presentar además individuos con coloración a manera de bandas axiales, labio interno de color naranja. Los individuos de la zona de Arquillo mostraron líneas concéntricas y dientes simétricos y asimétricos, mientras que en Lagunilla y Mendieta predominaron los individuos con simetría en líneas y dientes. Poca presencia de epibiontes y abundante incidencia de perforadores.

TABLA 1.1.1. Promedios de los caracteres cuantitativos evaluados de *S. haemastoma* colectados en 11 localidades de las zonas norte, centro y sur del Perú. Además, se incluyen los Índice de longitud e Índice Longitud-Peso. (n = número de individuos, *D.E.* = *Desviación Estándar*)

Localidad	NORTE				CENTRO		SUR				
	NZO	NPI	NMA	NPA	CAN	CPU	SAT	SAQ	SLA	SLN	SMN
(n)	95	23	36	44	32	35	55	36	27	26	31
Ptt (<i>D.E.</i>)	8,08 (6,28)	9,02 (8,56)	8,20 (3,91)	5,41 (1,99)	5,32 (1,22)	8,05 (1,85)	12,71 (10,96)	10,68 (6,37)	6,05 (2,38)	6,20 (2,46)	5,67 (5,02)
Ltt (<i>D.E.</i>)	32,88 (6,84)	33,26 (8,46)	34,86 (6,32)	30,76 (3,21)	31,28 (2,64)	34,98 (3,09)	41,28 (11,03)	36,76 (8,37)	32,38 (3,70)	34,03 (4,02)	32,69 (8,95)
Lb (<i>D.E.</i>)	24,88 (5,20)	24,93 (6,72)	26,86 (4,28)	23,91 (2,37)	20,34 (1,71)	23,13 (2,02)	29,21 (7,64)	25,84 (7,19)	21,13 (2,75)	24,24 (3,48)	22,59 (7,05)
ÍndLo (<i>D.E.</i>)	0,76 (0,03)	0,75 (0,02)	0,78 (0,06)	0,78 (0,04)	0,65 (0,04)	0,66 (0,03)	0,71 (0,02)	0,70 (0,06)	0,65 (0,04)	0,71 (0,04)	0,69 (0,04)
ÍndPl (<i>D.E.</i>)	0,23 (0,11)	0,24 (0,14)	0,22 (0,08)	0,17 (0,05)	0,17 (0,03)	0,21 (0,06)	0,27 (0,17)	0,27 (0,12)	0,18 (0,05)	0,18 (0,05)	0,16 (0,08)

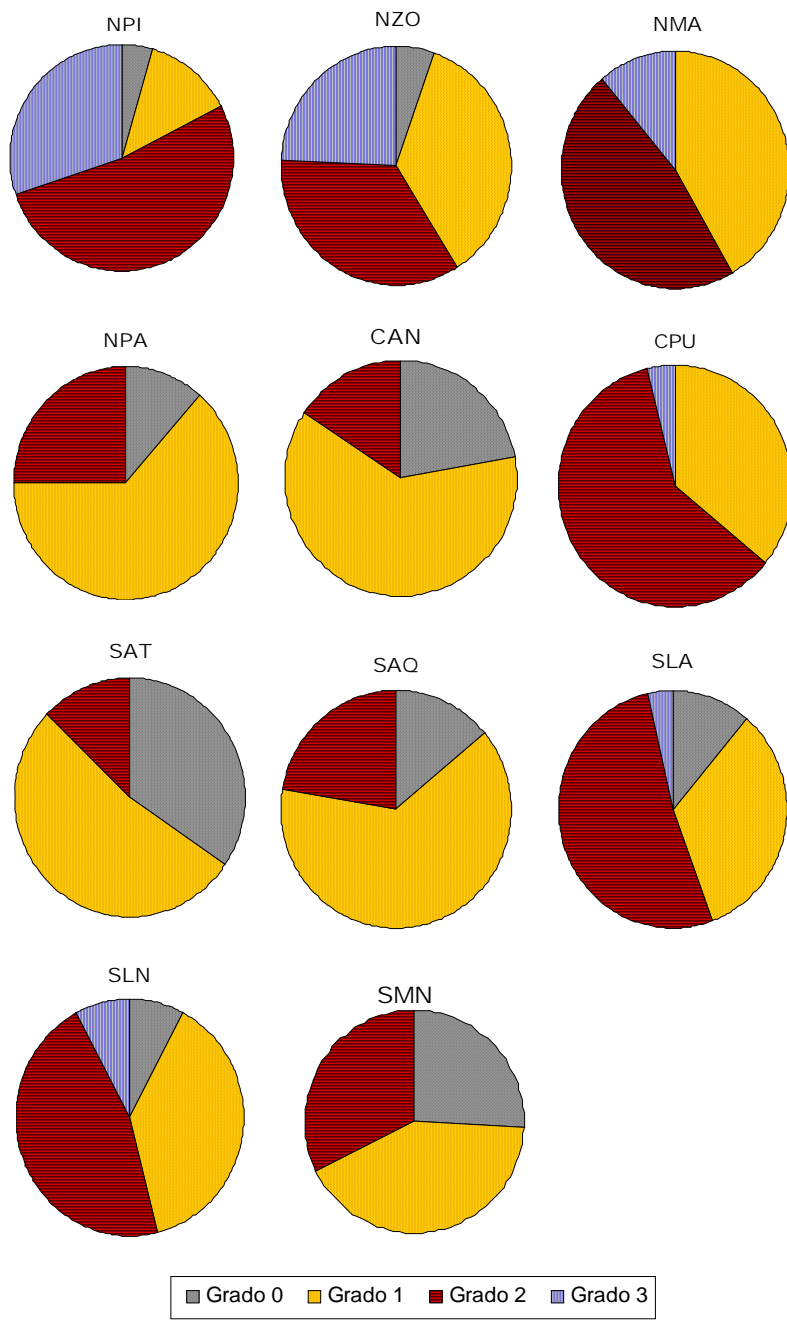


FIGURA 1.1.1. Variación de las categorías de tubérculos espirales en la concha (%) observada en *S. haemastoma* por cada localidad colectada.

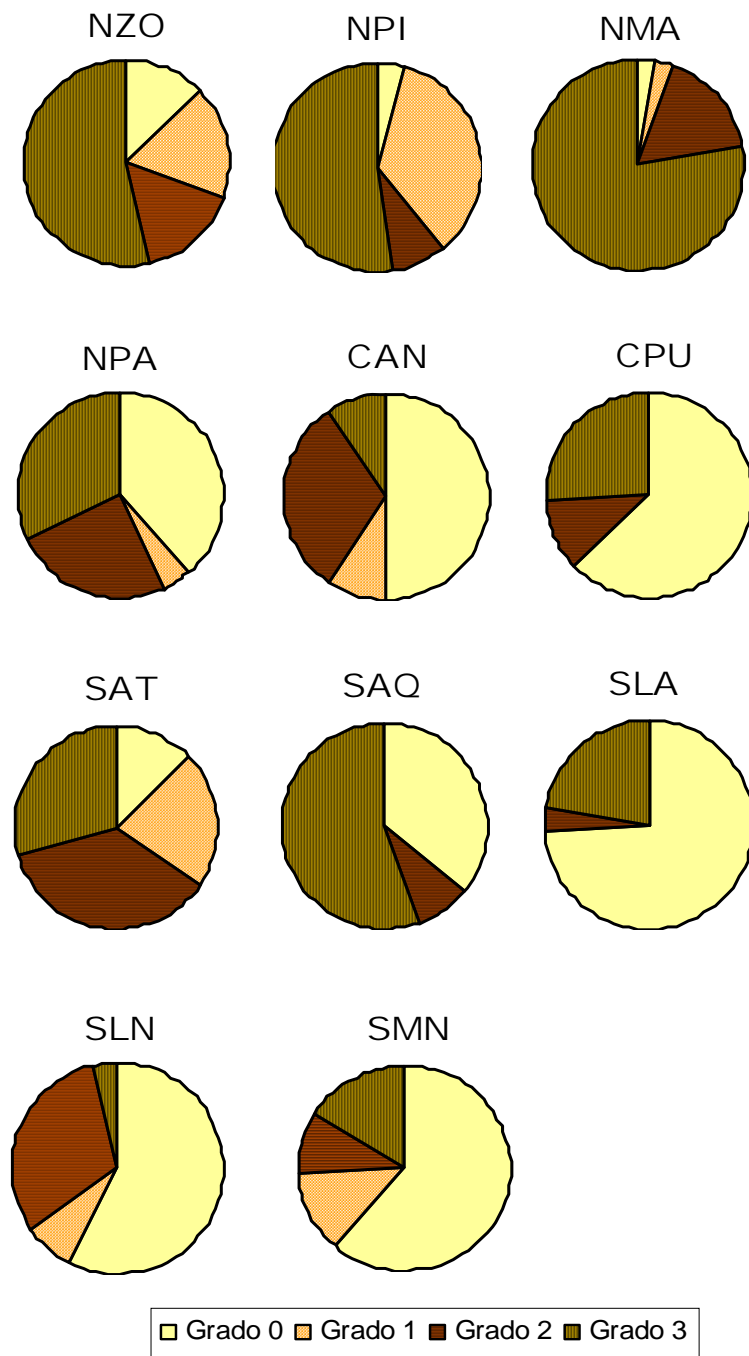


FIGURA 1.1.2. Variación de las categorías de coloración externa de la concha (%) observada en *S. haemastoma* por cada localidad colectada.

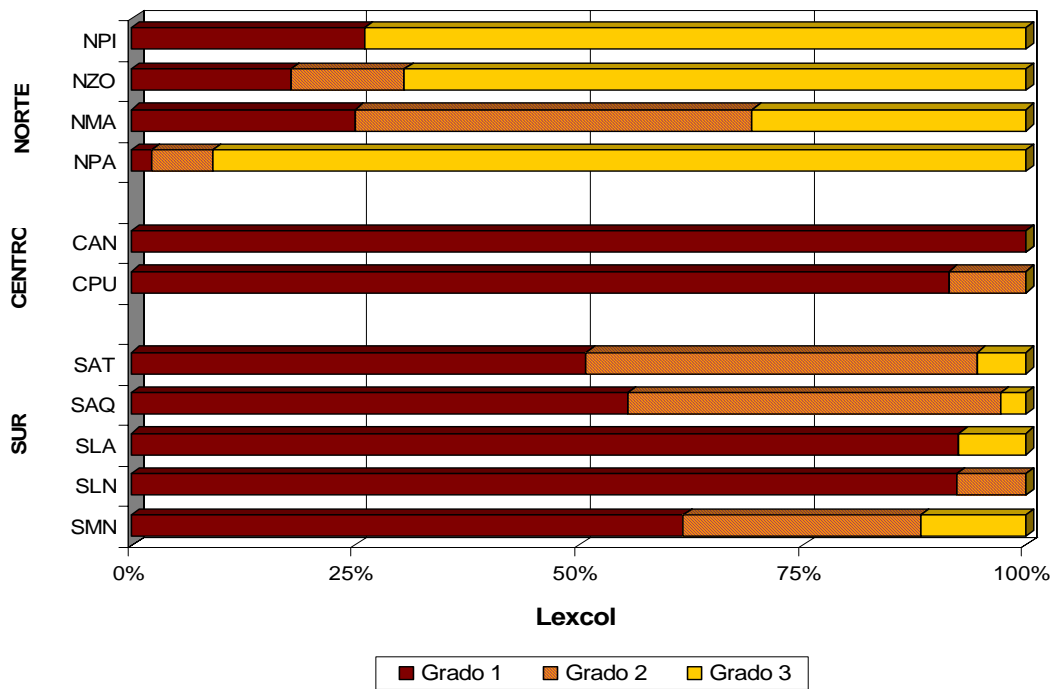


FIGURA 1.1.3. Variación de las categorías de coloración del labio externo en la concha (%) observada en *S. haemastoma* por cada localidad colectada.

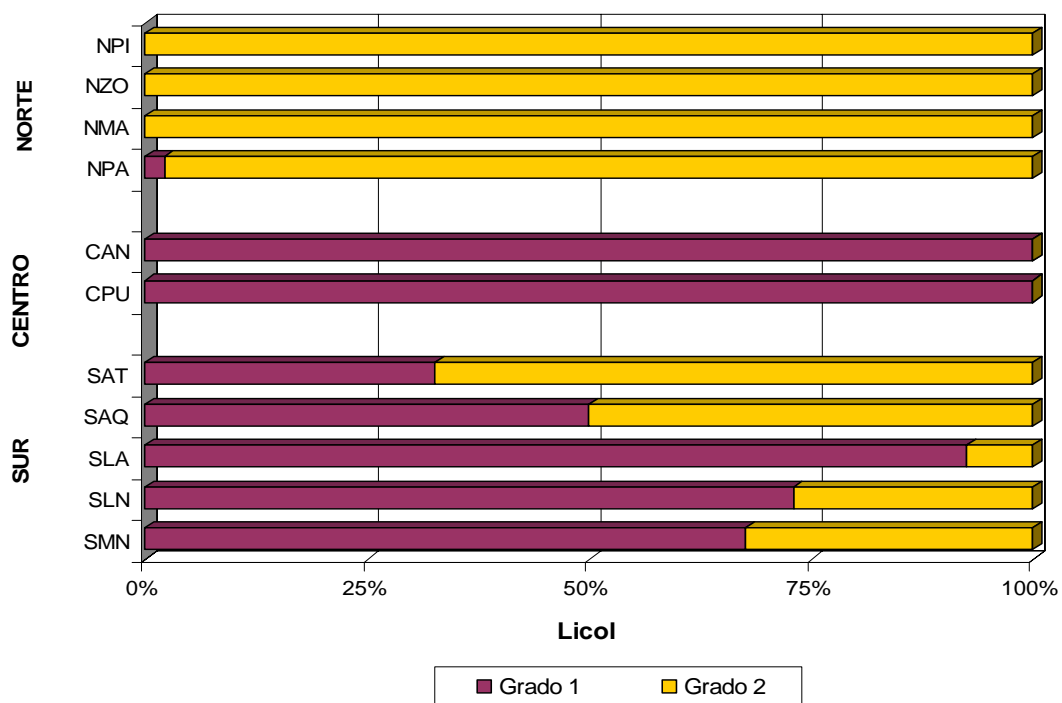


FIGURA 1.1.4. Variación en la coloración del labio interno la concha (%) de *S. haemastoma* por cada localidad colectada

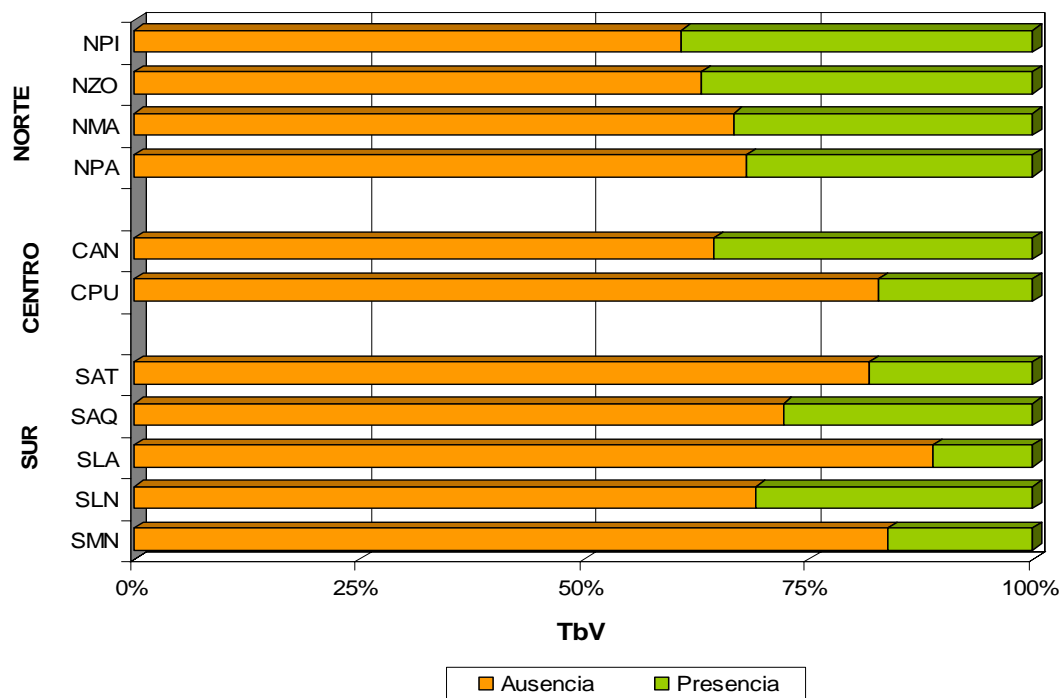


FIGURA 1.1.5. Presencia de tubérculos verticales en la concha (%) observada en *S. haemastoma* por cada localidad colectada.

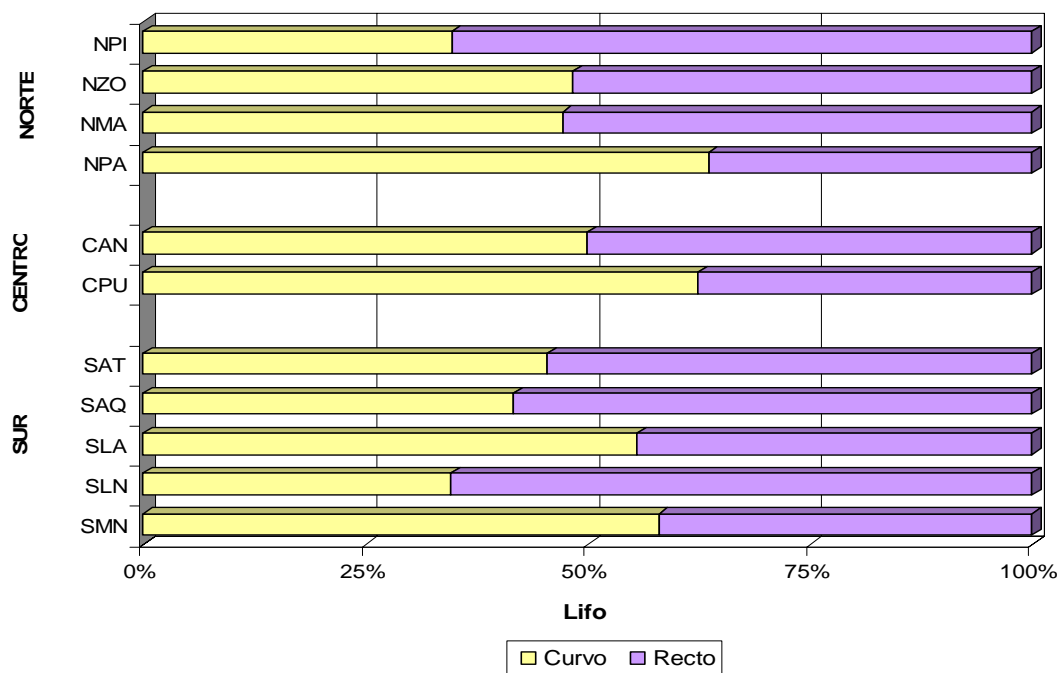


FIGURA 1.1.6. Variación de la forma del labio interno de la concha (%) en *S. haemastoma* por localidad colectada.

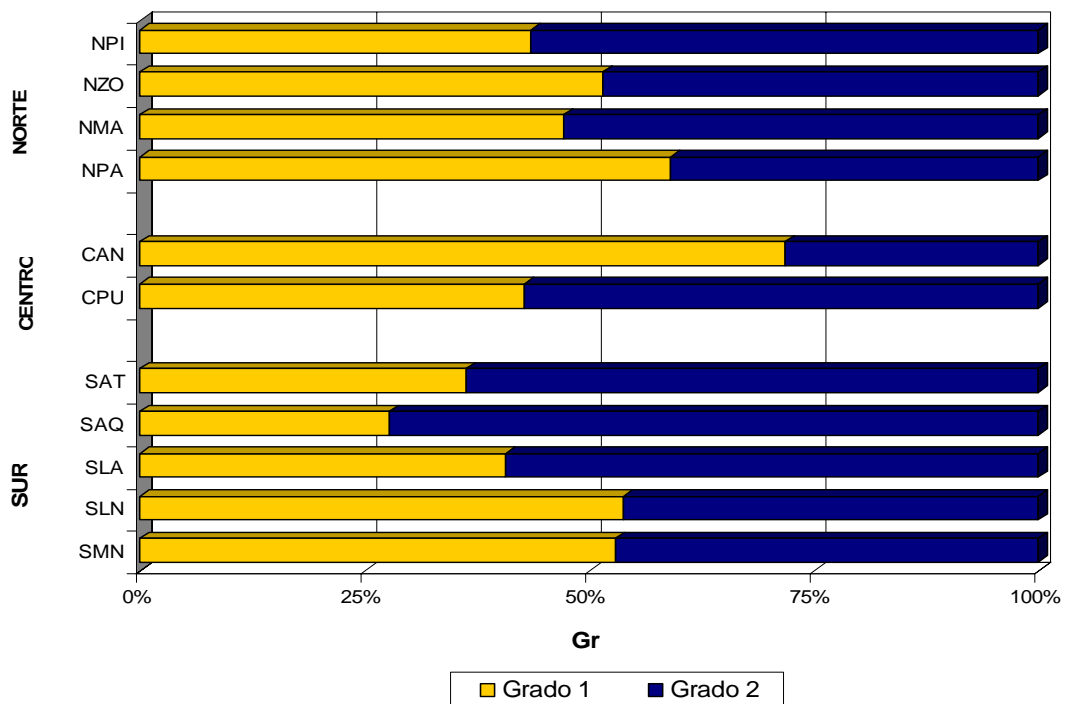


FIGURA 1.1.7. Variaciones en el grosor de la concha (%) de *S. haemastoma* por localidad muestreada.

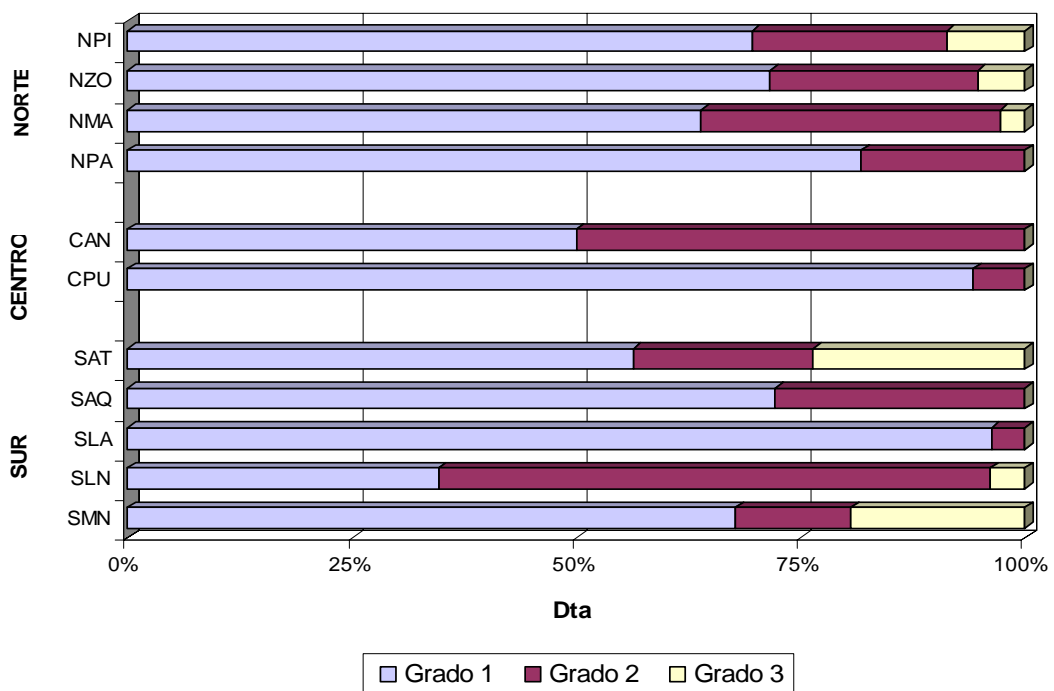


FIGURA 1.1.8. Variaciones en el tamaño de los dientes del labio externo de la concha (%) de *S. haemastoma* por localidad colectada.

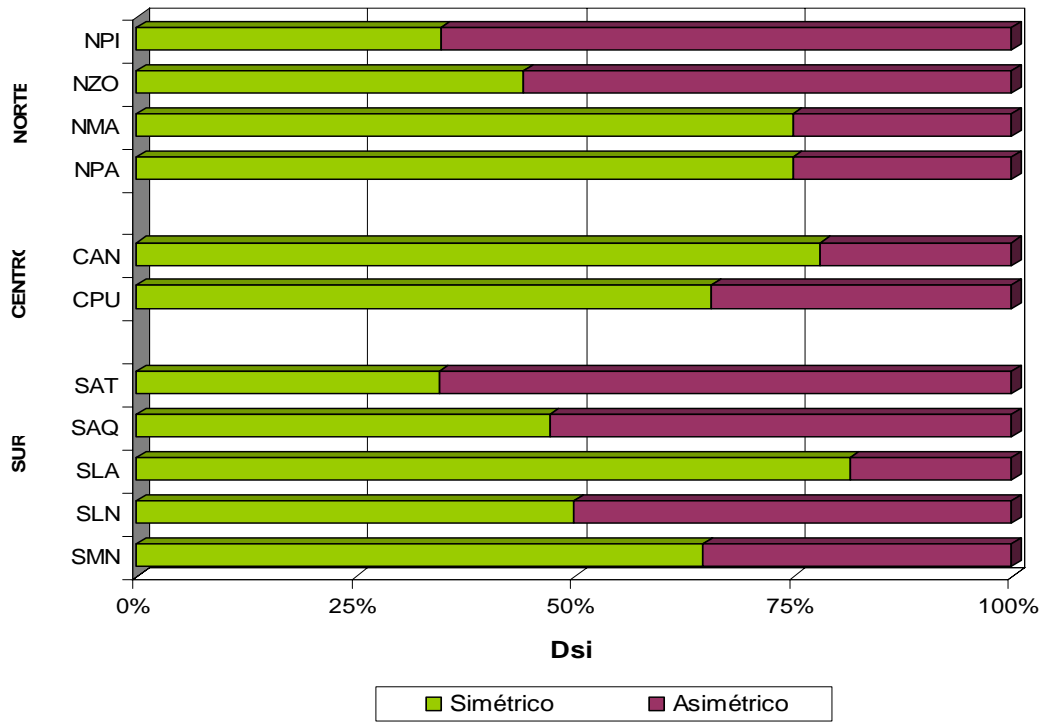


FIGURA 1.1.9. Variaciones en la simetría de los dientes del labio externo de la concha (%) de *S. haemastoma* de cada localidad colectada.

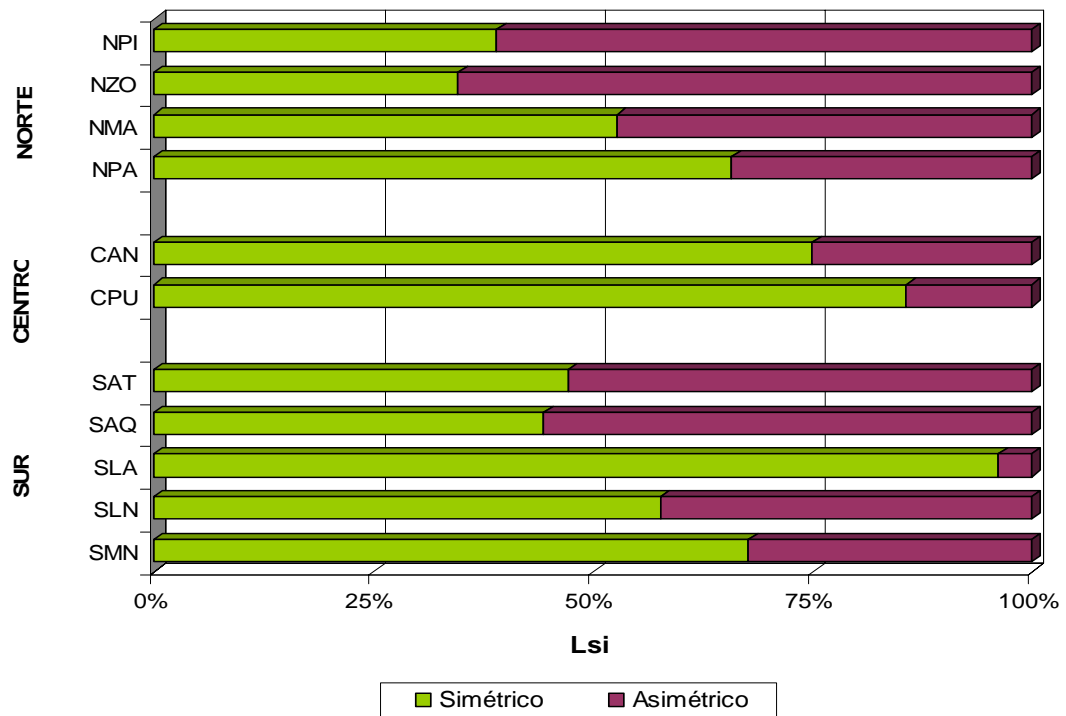


FIGURA 1.1.10. Variaciones en la simetría de las líneas concéntricas de la concha (%) de *S. haemastoma* por localidad muestreada.

TABLA 1.1.2. Presencia de epibiontes y perforadores (%) observada en individuos de *S. haemastoma* procedentes de 11 poblaciones de las costas del Perú.

ZONA	Localidad	% Epibiontes				% Perforadores			
		0	1	2	3	0	1	2	3
NORTE	NPI	65,22	26,09	8,70	-	91,30	4,35	4,35	-
	NZO	61,05	26,32	9,47	3,16	85,26	11,58	2,11	1,05
	NMA	33,33	41,67	11,11	13,89	69,44	25,00	5,56	-
	NPA	72,73	22,73	4,55	-	38,64	43,18	13,64	4,55
CENTRO	CAN	21,88	78,13	-	-	3,13	65,63	9,380	-
	CPU	74,29	20,00	5,71	-	8,57	51,43	25,71	14,29
SUR	SAT	54,55	40,00	5,45	-	78,18	20,00	1,82	-
	SLN	92,31	7,69	-	-	11,54	23,08	26,92	38,46
	SLA	-	51,85	29,63	18,52	3,70	7,41	14,81	74,07
	SAQ	66,67	25,00	2,78	5,56	-	27,78	27,78	44,44
	SMN	47,06	47,06	2,94	2,94	29,41	47,06	2,94	20,59

1.2. Análisis estadístico

De acuerdo al análisis de ANOVA para los caracteres cuantitativos, se encontraron valores significativos entre las variables relacionadas con la longitud mas no así entre los caracteres que involucran el peso total. La comparación de medias entre las zonas muestreadas presentaron diferencias muy significativas ($P = 0,000$) respecto al índice de longitud. Diferencias significativas entre la zona sur respecto al resto estuvo dada por la longitud total, mientras que diferencias significativas entre la zona centro respecto al norte y sur estuvo dada por la abertura de la boca. Ninguna diferencia significativa se encontró cuando se comparó el peso total ($F = 0,441$; $P = 0,644$) o el índice Pt/Ltt ($F = 0,742$; $P = 0,477$) entre las zonas (Tabla 1.2.1).

De acuerdo al análisis de correlación de Pearson entre los caracteres cuantitativos, correlaciones muy significativas fueron observadas entre el peso total y el índice Peso-Longitud (0,979), entre longitud total y diámetro de la boca (0,945), entre peso total y longitud total (0,923), así como entre peso total y diámetro de la boca (0,913). Los menores valores de correlación se obtuvieron entre el índice de longitud y la longitud total (- 0,047). (Tabla 1.2.2).

Para el análisis de correlación entre los caracteres cualitativos, también se consideró a la variable IndLo debido al bajo nivel de correlación observado con las variables cuantitativas y a la alta diferenciación observada entre las zonas colectadas respecto al IndLo. Bajos valores de correlación pero con altos niveles de significancia ($P = 0,0000$) se observaron entre las variables. Así, los mayores valores de correlación ocurren entre el Índice de longitud y la coloración del labio interno (0,646) y la

coloración del labio externo (0,508), así como entre la coloración del labio interno y externo (0,619) (Tabla 1.2.3).

TABLA 1.2.1. Análisis de varianza (ANOVA) y Test de Tukey para la comparación múltiple entre los caracteres cuantitativos de las poblaciones de *S. haemastoma* agrupadas por zonas (P = valores de significancia)

Caracteres Cuantitativos	ANOVA F (P)	Test de Tukey (P)		
		Norte-Centro	Norte-Sur	Centro-Sur
Ltt	9,878 (0,000)	- 0,011 (0.652)	- 0,034 (0.000)	0,280 (0.063)
Lb	9,819 (0,000)	0,055 (0.000)	0,002 (0.978)	- 0,053 (0.000)
IndLo	231,563 (0,000)	0,066 (0.000)	0,041 (0.000)	- 0,025 (0.000)
Pt	0,441 (0,644)	- 0,016 (0.925)	- 0,019 (0.770)	- 0,035 (0.682)
IndPI	0,742 (0,477)	0,029 (0,585)	0,019 (0,578)	- 0,009 (0,947)

TABLA 1.2.2. Valores de correlación de Pearson (diagonal superior) y nivel de significancia (diagonal inferior) entre los caracteres cuantitativos evaluados en 11 poblaciones de *S. haemastoma*

Carácter	Ltt	Lb	IndLo	Pt	IndPI
Ltt		0,945	- 0,047	0,923	0,898
Lb	0,000		0,273	0,913	0,908
IndLo	0,162	0,000		0,069	0,121
Pt	0,000	0,000	0,074		0,979
IndPI	0,000	0,000	0,005	0,000	

TABLA 1.2.3. Correlaciones de Pearson (diagonal superior) y valores de significancia (diagonal inferior) entre los caracteres cualitativos evaluados en 11 poblaciones de *S. haemastoma*.

Carácter	IndLo	TbH	Lsi	Dsi	Dta	Licol	Colext	Gr	Col	Lifo	TbV
IndLo		0,089	0,179	0,041	0,114	0,646	0,508	0,009	0,276	- 0,033	0,067
TbH	0,032		- 0,007	- 0,041	0,128	0,128	0,180	0,008	0,094	0,050	0,245
Lsi	0,000	0,446		0,468	0,160	0,286	0,179	0,177	0,193	- 0,086	0,058
Dsi	0,197	0,198	0,000		0,128	0,192	0,110	0,178	0,133	0,026	0,033
Dta	0,009	0,004	0,000	0,004		0,206	0,176	0,323	0,043	- 0,135	0,045
Licol	0,000	0,004	0,000	0,000	0,000		0,619	0,039	0,407	- 0,069	0,145
Lexcol	0,000	0,000	0,000	0,011	0,000	0,000		0,122	0,256	- 0,145	0,088
Gr	0,424	0,438	0,000	0,000	0,000	0,210	0,006		0,002	- 0,169	- 0,012
Col	0,000	0,026	0,000	0,003	0,184	0,000	0,000	0,435		0,051	0,051
Lifo	0,244	0,149	0,038	0,293	0,002	0,076	0,001	0,000	0,171		0,067
TbV	0,083	0,000	0,115	0,248	0,175	0,001	0,033	0,399	0,145	0,083	

- *Análisis de Componentes Principales (CP):*

De acuerdo al análisis de CP para los datos cuantitativos (Tabla 1.2.4), el 96,74% de la varianza puede explicarse considerando los dos primeros componentes, donde el primer CP acumula el mayor porcentaje de la varianza (75,97%) e integra a todos los caracteres morfométricos incluyendo el índice Peso-Longitud. El segundo CP representa el 20,77% de la varianza y está integrado por el índice de longitud (IndLo) con un alto valor (0,989). A partir del ploteo de los dos primeros CP, las variables se distribuyen en dos grupos, presentando las variables cuantitativas una distribución muy cercana a 1 en el eje CP1; mientras que el índice de longitud se observó estar asociado al eje CP2 (Fig 1.2.1). El ploteo de los otros CP no fue considerado pues no mostraron una agrupación diferencial entre las variables.

Cuando se realiza el ploteo considerando las poblaciones con relación a los dos primeros CP, se observó una diferenciación entre las poblaciones del norte respecto al centro y sur dada por el segundo CP. Además, una mayor semejanza se observó entre las poblaciones del centro (Ancón y Pucusana) con la población de La Mina, mientras que las poblaciones de Atenas, Arquillo y Mendieta presentaron una alta variabilidad a lo largo del CP 1 (Fig 1.2.2)

A partir del análisis de CP para los caracteres cualitativos y el índice de longitud (Tabla 1.2.5), un 61,3% de la varianza puede explicarse considerando los cuatro primeros CP. El primer CP integra, con los mayores valores, al índice de longitud (0,71), coloración del labio interno (0,85), coloración del labio externo (0,75) y la coloración externa de la concha (0,52). El segundo CP incluye el grosor (0,63), la

simetría de los dientes (0,52) y de las líneas concéntricas (0,49). Finalmente, el cuarto CP representa la presencia de nódulos espirales (0,55) y axiales (0,66) con los mayores valores.

Los dos primeros CP explican el 39,12% de la varianza acumulada, mientras que el tercero y cuarto CP representan el 11,28% y 10,91% de varianza, respectivamente. De acuerdo al ploteo de los dos primeros CP se observó una agrupación de las variables diferenciándose en: (1) Caracteres de influencia Genética que estuvieron relacionados con el CP 1, (2) Caracteres relacionados al Crecimiento que estuvieron agrupados según el CP2 e integrados por grosor, tamaño de los dientes, la simetría de las líneas y simetría de los dientes, y (3) un tercer grupo formado por Caracteres con influencia del Ambiente e integrado por el tamaño de tubérculos axiales y verticales (Fig. 1.2.3a). Un segundo ploteo entre los CP 3 y 4, permitió diferenciar a las variables de grosor y tamaño de dientes con la simetría (Fig 1.2.3b).

La mayor diferenciación entre las poblaciones colectadas se obtuvo mediante el ploteo de los dos primeros CP, mientras que los otros CP no mostraron una diferenciación entre poblaciones o zonas muestreadas. Los dos primeros CP mostraron una marcada diferenciación entre las poblaciones de la zona norte (con valores positivos en el eje del CP 1) de las poblaciones de la zona centro y la población de La Mina de la zona sur (con valores negativos en el eje del CP 1). Entre los individuos colectados en la Reserva de Paracas, se observó que poblaciones como Mendieta y Arquillo presentan individuos distribuidos entre ambos grupos (del norte y centro), mientras que la población de Atenas y Lagunilla se ubicó en una zona

intermedia entre las poblaciones del norte y centro, con diferencias en relación al CP2 (Fig 1.2.4).

- *Análisis Discriminante:*

A partir de los tres grupos o zonas de colecta prefijados, se observó que un 100% de la varianza puede ser explicado considerando dos funciones discriminantes (FD) según el análisis de variables cualitativas y el índice de longitud. La primera FD representa el 95% de la varianza y estuvo relacionada con el índice de longitud (0,568), coloración del labio externo (0,564), coloración del labio interno (0,608) y coloración externa de la concha (0,210). La segunda FD mostró una relación con la coloración del labio interno (0,637), presencia de nódulos espirales (-0,545), tamaño de dientes (0,419) y simetría de dientes (0,331). Además, todas estas variables presentaron altas correlaciones con cada función discriminante (Tabla 1.2.6).

Considerando los valores de los grupos centroides obtenidos se observó una diferenciación entre los individuos de la zona norte (1,74) con las zonas centro y sur (-2,24 y -1,29) respecto a la primer FD. Mediante la segunda función, se observó una diferenciación entre los individuos de la zona centro (-0,93) con respecto a las zonas norte (-0,07) y sur (0,28) (Fig. 1.2.5).

De acuerdo al análisis de membresía de grupos, el 76,7% de los individuos estuvieron correctamente agrupados en cada zona. Así, considerando para cada zona, se observaron altos porcentajes de correcta clasificación de los organismos en base a los caracteres cualitativos, donde el 93% de los individuos de la zona norte y el 96% de

los individuos de la zona centro se encontraron correctamente clasificados en los grupos prefijados. Sin embargo, cuando se analizó la zona sur, se observó que los individuos presentaron características morfológicas más relacionadas a los individuos de la zona centro (44%) y a los individuos de la zona sur (46%) predominantemente (Tabla 1.2.7).

TABLA 1.2.4. Resultados del análisis de Componentes Principales basado en la matriz de correlación entre los caracteres cuantitativos de *S. haemastoma*.

Variable	Componentes Principales		Comunalidad
	1	2	
Ltt	0,962	- 0,188	0,960
Lb	0,974	0,135	0,966
IndLo	0,145	0,989	1,000
Pt	0,979	- 0,073	0,964
IndPL	0,973	- 0,021	0,947
<i>Autovalor</i>	3,798	1,038	
<i>Varianza</i>	75,969	20,766	
<i>Var. acumulada</i>	75,969	96,736	

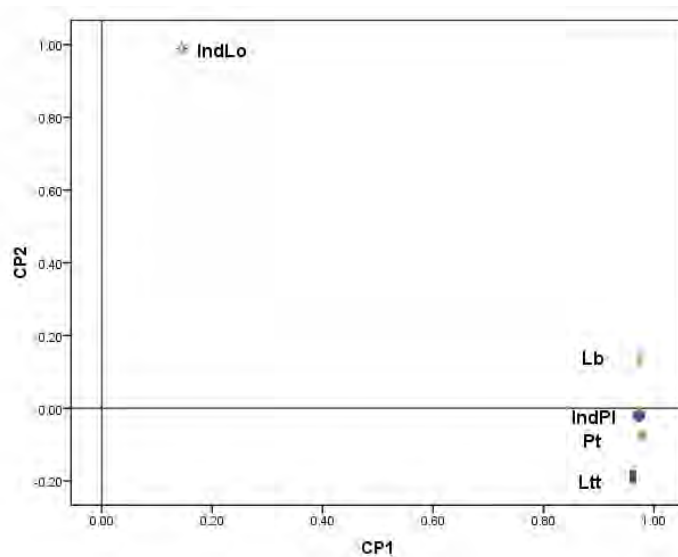


FIGURA 1.2.1. Ploteo bidimensional de las primera y segunda Componentes Principales para las variables cuantitativas.

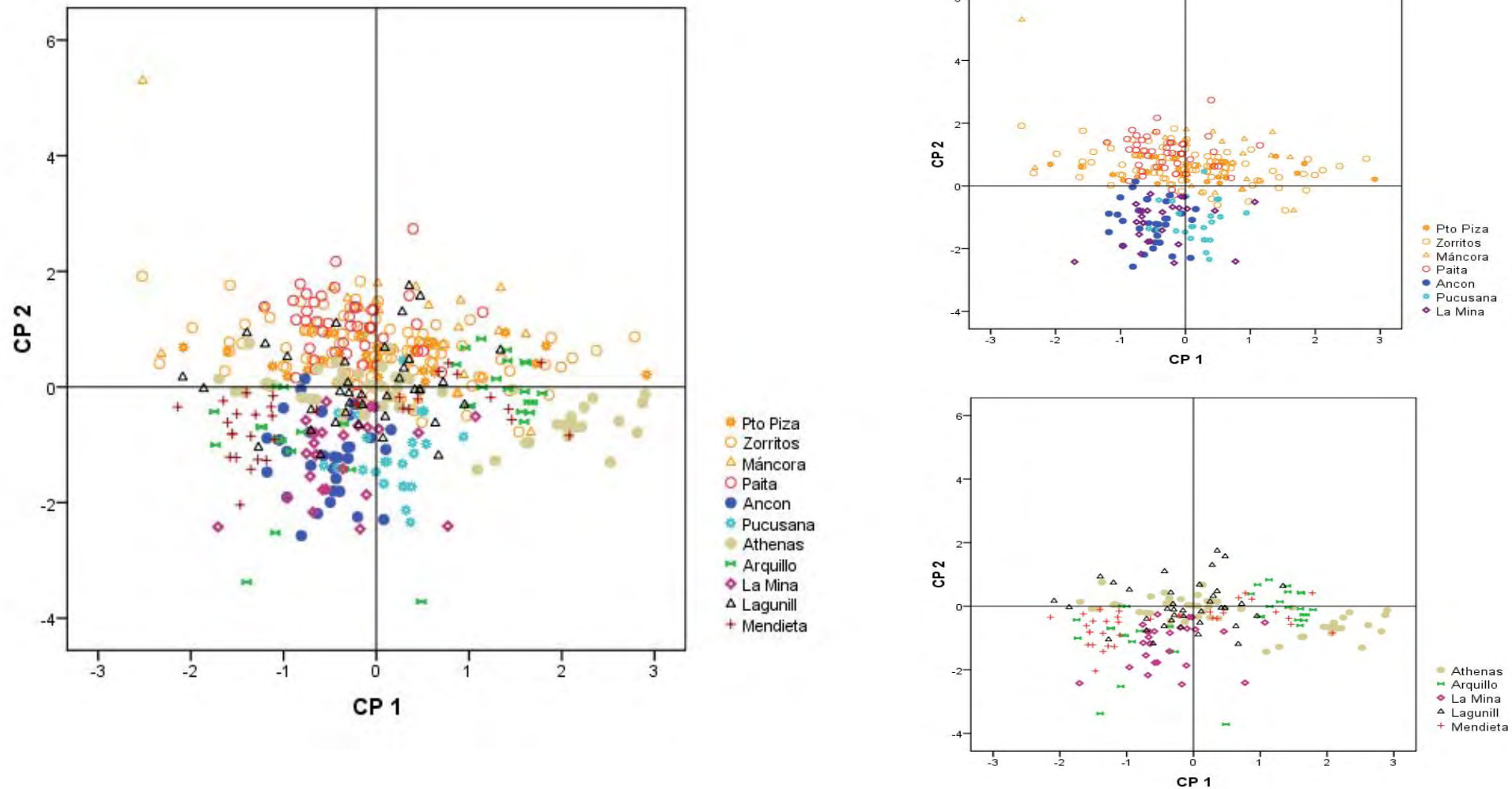


FIGURA 1.2.2. Posición relativa de las poblaciones de *S. haemastoma* basado en el primer y segundo CP a partir de una matriz de correlación de las variables cuantitativas.

TABLA 1.2.5 Resultados del análisis de Componentes Principales basado en la matriz de correlación entre 11 caracteres morfológicos de *S. haemastoma*. La varianza de cada CP se expresa por los Autovalores y la proporción acumulada de varianza expresada.

Variable	Componentes Principales				Comunalidades
	1	2	3	4	
IndLo	0,710	- 0,327	0,009	- 0,271	0,684
TbH	0,242	- 0,288	- 0,426	0,547	0,622
Lsi	0,510	0,458	0,391	0,176	0,653
Dsi	0,374	0,516	0,488	0,288	0,727
Dta	0,381	0,411	- 0,462	0,117	0,542
Licol	0,848	- 0,226	0,052	- 0,140	0,792
Lexcol	0,748	- 0,183	- 0,166	- 0,201	0,661
Gr	0,245	0,628	- 0,345	0,042	0,576
Col	0,519	- 0,209	0,302	0,010	0,405
Lifo	- 0,149	- 0,335	0,423	0,447	0,513
TbV	0,207	- 0,230	- 0,186	0,662	0,569
<i>Autovalor</i>	2,780	1,523	1,240	1,200	
<i>Varianza</i>	25,273	13,842	11,277	10,909	
<i>Var. acumulada</i>	25,273	39,115	50,392	61,301	

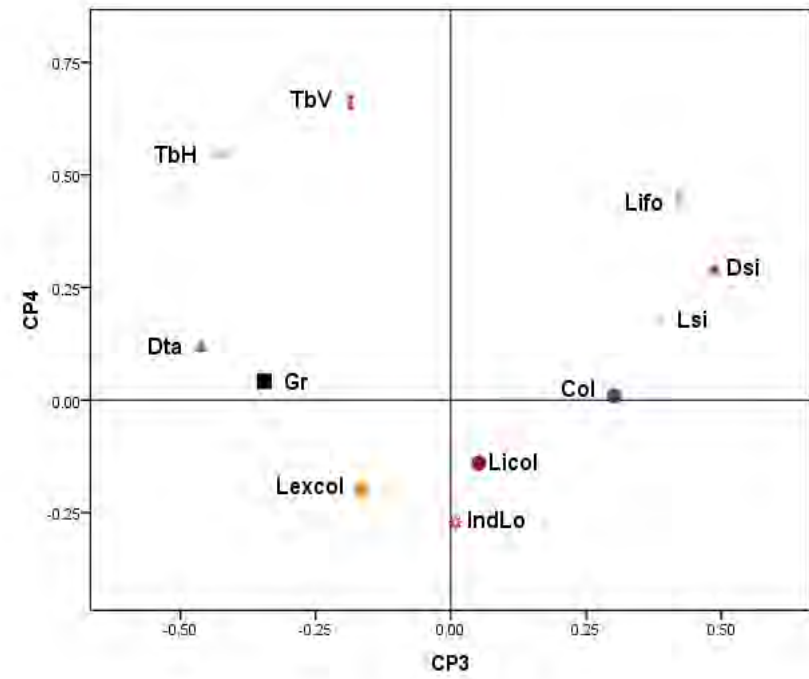
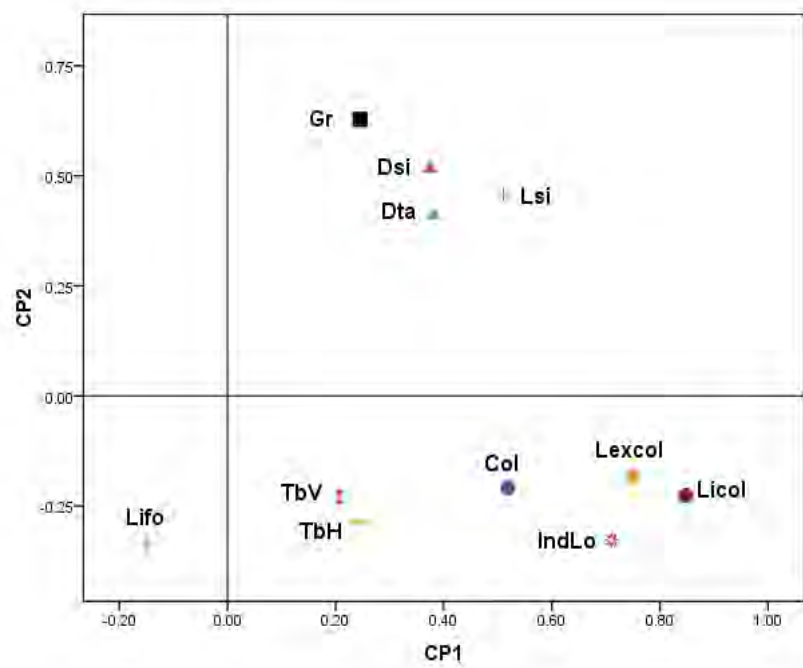


FIGURA 1.2.3. Ploteo bidimensional de las variables cualitativas respecto a los cuatro primeros componentes principales. (a) CP1 vs CP2, (b) CP3 vs CP4

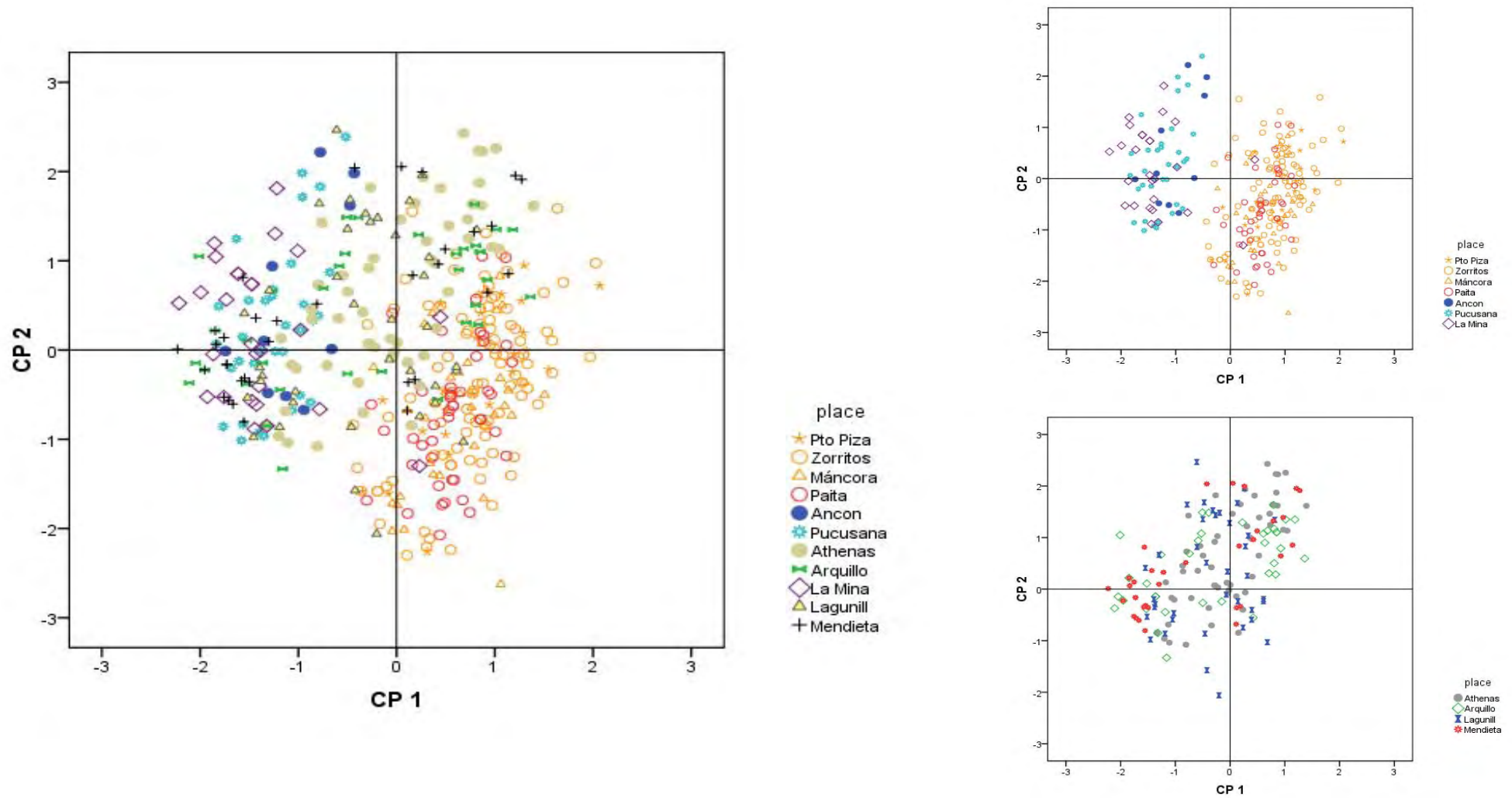


FIGURA 1.2.4. Posición relativa de las poblaciones de *S. haemastoma* de acuerdo a los cuatro primeros CP basado en una matriz de correlación de las variables cualitativas.

TABLA 1.2.6. Funciones discriminantes calculadas para 11 variables morfológicas evaluados en individuos de *S. haemastoma* agrupados en tres zonas (norte, centro y sur)

Caracter	Función Discriminante	
	1	2
IndLo	0,568 *	0,175
Lexcol	0,564 *	- 0,043
Col	0,210 *	0,047
TbV	0,088 *	- 0,019
Licol	0,608	0,637 *
TbH	0,151	- 0,545 *
Dta	- 0,043	0,419 *
Lsi	0,115	0,331 *
Dsi	- 0,001	0,247 *
Gr	- 0,049	0,085 *
Lifo	- 0,016	0,073 *
<i>Grupos Centroides</i>		
NORTE	1,738	- 0,065
CENTRO	- 2,243	- 0,931
SUR	- 1,292	0,283
<i>Autovalor</i>	2,649	0,126
<i>Varianza (%)</i>	95,4	4,6
<i>Correlación canónica</i>	0,852	0,335

(* = altos valores de correlación entre la variable y la función discriminante)

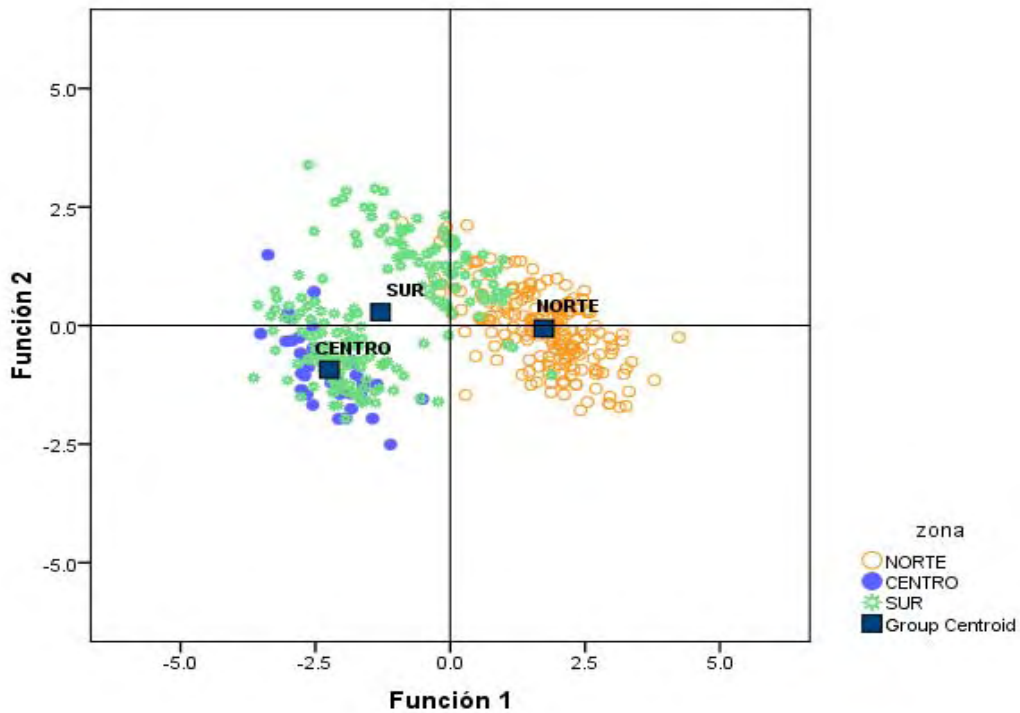


FIGURA 1.2.5. Posición relativa de los individuos de *S. haemastoma* agrupados en tres zonas muestreadas de acuerdo a las dos primeras funciones canónicas discriminantes.

TABLA 1.2.7. Porcentaje de los individuos correctamente clasificados de acuerdo a los tres grupos predefinidos de *S. haemastoma*. Obtenido según el análisis discriminante.

Zona	Membresía de grupos (%)		
	Norte	Centro	Sur
Norte	93,42	0	6,6
Centro	0	95,5	4,5
Sur	10,5	45,7	45,8

2. Análisis aloenzimático

2.1 Estandarización de la técnica electroforética

La extracción de proteínas se realizó utilizando un buffer de homogenización en presencia de 1% Tritón y con una concentración final de 5 mM EDTA pH 7,0 así como DMSO en concentraciones finales entre 0,5 – 1%. La presencia de NAD dio por resultado la presencia de falsas bandas, mientras que la adición de PMSF no mejoró las condiciones de extracción. Finalmente se utilizó para todas las muestras una proporción de 1:1 del volumen del buffer respecto al volumen del tejido, debido a la alta concentración de la enzima *Mdh* observado, sobretodo entre los individuos de la zona sur.

Se analizaron dos loci de la *Mdh*, denominadas de acuerdo a su migración electroforética como *Mdh-1* (correspondiente a la forma mitocondrial de la enzima) y *Mdh-2* (correspondiente a la forma citosólica de la enzima). Las corridas electroforéticas utilizando el buffer de corrida Tris Maleato-EDTA pH 7,6 permitió revelar ambos loci, obteniendo una mejor definición de la forma *Mdh-2*, mientras que el uso de buffers más alcalinos como Tris – Glicina pH 8,9 sólo permitió revelar la forma *Mdh-1*, también reportado por Herbert & Beaton (1993).

2.2. Estadística descriptiva de la variabilidad aloenzimática

- Frecuencias alélicas y heterocigosidad

Las frecuencias alélicas para ambos loci polimórficos y los valores de heterocigosidad se muestran en la Tabla 2.2.1.

Se identificaron tres alelos (“a”, “b” y “c”) para el locus *Mdh-1*, predominando el alelo *Mdh-1^c* en todas las poblaciones. Las poblaciones NZO y CPU presentaron dos alelos *Mdh-1^a* y *Mdh-1^c*; la población SLA presentó dos alelos *Mdh-1^a* y *Mdh-1^c*; mientras que sólo la población SAT presentó los tres alelos. El alelo *Mdh-1^c* estuvo presente en todas las poblaciones mostrando un valor promedio de 0,866. El alelo *Mdh-1^a* presentó un frecuencia promedio de 0,081, con una mayor frecuencia en la población SAT (0,205); mientras que el alelo *Mdh-1^b* presentó una frecuencia promedio de todas las poblaciones de 0,052 presentando población SLA la frecuencia más alta (0,152).

Para el locus *Mdh-2*, se diferenciaron dos alelos denominados como *Mdh-2^a* y *Mdh-2^b*. Todas las poblaciones presentaron el alelo *Mdh-2^b* presentando una frecuencia promedio total de 0,936. La población CPU es monomórfica para este locus, presentando el alelo *Mdh-2^b*. El alelo *Mdh-2^a* estuvo presente en una frecuencia promedio de 0,064 en el total de las poblaciones, observando una mayor frecuencia en la población de NZO (0,167).

La heterocigosidad observada promedio para todas las poblaciones de H_o ’ 0,14 fue menor que la esperada (H_e ’ = 0,181). Las poblaciones procedentes de zonas más

cálidas como NZO y SAT presentaron los valores de heterocigosis más altos (0,233 y 0,296 respectivamente), mientras que las poblaciones procedentes de orillas protegidas como CPU y SLA presentaron los valores más bajos de heterocigosidad (0,019 y 0,065 respectivamente).

De acuerdo a las frecuencias alélicas observadas respecto al equilibrio esperado de Hardy-Weinberg (HWE), se obtuvo una deficiencia de heterocigotos ($D = - 0,227$) en promedio para el total de las poblaciones, dado principalmente por las deficiencias observadas en las poblaciones NZO y SLA. La población NZO mostró una deficiencia de heterocigotos en el locus *Mdh-2*, obteniendo un D final de - 0,114. Por otro lado, la población SLA mostró una deficiencia significativa en el locus *Mdh-1*, obteniendo un D promedio final de - 0,626 (Tabla 2.2.2).

TABLA 2.2.1. Frecuencias alélicas, heterocigocidad observada (H_o), heterocigocidad esperada (H_e) y heterocigocidad promedio para cada locus en cuatro poblaciones de *S. haemastoma*.

Locus	Alelo	Población				Promedio
		NZO	CPU	SAT	SLA	
	(n)	(18)	(26)	(22)	(24)	
<i>Mdh-1</i>	a	0,133	0,019	0,205	-	0,081
	b	-	-	0,046	0,152	0,052
	c	0,867	0,981	0,750	0,848	0,866
	H_o	0,267	0,039	0,409	0,044	0,174
	H_e	0,239	0,039	0,403	0,264	0,242
<i>Mdh-2</i>	a	0,167	-	0,091	0,044	0,064
	b	0,833	1,000	0,909	0,957	0,936
	H_o	0,200	-	0,182	0,087	0,105
	H_e	0,287	-	0,169	0,085	0,120
<i>Promedio</i>	H_o'	0,233	0,019	0,296	0,065	0,140
	H_e'	0,263	0,019	0,286	0,174	0,181

n = tamaño de muestra

TABLA 2.2.2. Valores de deficiencia de heterocigotos (D), Chi-cuadrado (χ^2) para cada locus en las cuatro poblaciones de *S. haemastoma*.

Población		Locus		Promedio
		<i>Mdh-1</i>	<i>Mdh-2</i>	
NZO	D	0,117	- 0,303	- 0,114
	χ^2	0,258	1,685	
	(P)	(0,611)	(0,194)	
CPU	D	0,000	*	0,000
	χ^2	0,000	*	
	(P)	(1,000)	*	
SAT	D	0,015	0,077	0,014
	χ^2	0,622	0,162	
	(P)	(0,891)	(0,688)	
SLA	D	- 0,833	0,024	- 0,626
	χ^2	18,374	0,023	
	(P)	(0,000)	(0,879)	
Promedio	D	- 0,281	- 0,125	- 0,227
	χ^2	41,200	1,615	
	(P)	(0,000)	(0,204)	

(*) = locus monomórfico; P = valores de significancia

- Estructura genética poblacional

El análisis de estructura genética de las poblaciones se muestra de acuerdo a la estadística F. Considerando ambos loci, se observó una mayor diferenciación genética entre los individuos de todas las poblaciones ($F_{IT} = 0,210$) y una menor diferenciación genética existe entre las poblaciones respecto al total de las poblaciones muestreadas ($F_{ST} = 0,066$). Además, los mayores valores de F_{IS} , F_{IT} y F_{ST} se observaron para el alelo *Mdh-1* (Tabla 2.2.3).

De acuerdo al análisis de distancias genéticas de Nei (*Nei's unbiased distance*), se observó una mayor identidad genética entre las poblaciones NZO y SAT (0,994) así como entre las poblaciones CPU y SLA (0,992); mientras que una mayor distancia genética (0,018) se observó entre las poblaciones de NZO y SLA, y entre CPU y SAT (Tabla 2.2.4). Así, de acuerdo al análisis de agrupamiento por UPGMA basado en las distancias genéticas, se observó la formación de dos grupos. El grupo conformado por NZO y SAT corresponden a poblaciones procedentes de zonas de mayores TSM, mientras que el segundo grupo formado por CPU y SLA, presentando una mayor distancia génica respecto al anterior grupo, corresponde a poblaciones distribuidas en ambientes más protegidos y de menores TSM (Fig. 2.2.1).

TABLA 2.2.3. Índice F (Nei, 1987) para cada locus de cuatro poblaciones de *S. haemastoma*

Índice F	Locus		Promedio
	<i>Mdh-1</i>	<i>Mdh -2</i>	
F_{IS}	0,177	0,109	0,154
F_{IT}	0,235	0,158	0,210
F_{ST}	0,071	0,055	0,066

TABLA 2.2.4. Identidad genética (diagonal superior) y distancia genética de Nei (1978) (diagonal inferior) basado en dos loci para cuatro poblaciones de *S. haemastoma*.

Población	NZO	CPU	SAT	SLA
NZO	****	0,989	0,994	0,983
CPU	0,012	****	0,983	0,992
SAT	0,006	0,018	****	0,984
SLA	0,018	0,008	0,016	****

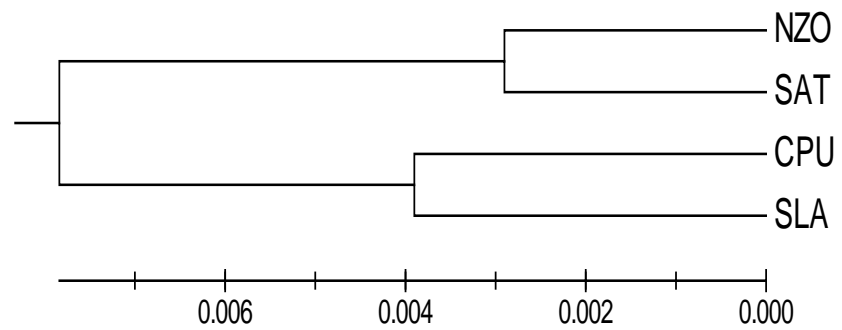


FIGURA 2.2.1. Dendrograma UPGMA mostrando las relaciones entre poblaciones basado en la distancia genética de Nei (*NZO* = *Zorritos*; *CPU* = *Pucusana*; *SAT* = *Atenas*; *SLA* = *Lagunilla*).

- *Análisis de correlación y CP de la variación alélica*

De acuerdo al análisis de la variabilidad de las frecuencias alélicas, una correlación negativa muy significativa (- 0,540) se observó entre los alelos de un sólo locus *Mdh-1^b* y *Mdh-1^c*; mientras que una baja correlación positiva (0,377) aunque significativa se observó entre los alelos de dos loci, *Mdh-1^a* y *Mdh-2^a* (Tabla 2.2.5).

El análisis de CP para los loci *Mdh-1* y *Mdh-2* generaron 2 CP que explican el 63,59% de la varianza acumulada. El primer CP explica el 32,68% del total de la varianza de los alelos, y comprende a los alelos *Mdh-1^a*, *Mdh-2^a* y *Mdh-2^b*. Los alelos *Mdh-1^a* y *Mdh-2^a* presentaron los mayores coeficientes positivos (0,750 y 0,765 respectivamente), mientras que el alelo *Mdh-2^b* presentó el mayor coeficiente negativo (- 0,687). Por otro lado, el segundo CP explica el 30,92% de la varianza genética y presentó el mayor coeficiente positivo para el alelo *Mdh-1^b* (0,886) y el mayor coeficiente negativo para el alelo *Mdh-1^c* (0,857) (Tabla 2.2.6)

A partir de la proyección de los dos CP, se observó una diferenciación entre las poblaciones, donde el primer CP describe diferencias entre la población del norte NZO respecto al resto de poblaciones (Fig. 2.2.2), asociado con la variabilidad de los alelos *Mdh-1^a* y *Mdh-2^a*; mientras que el segundo CP describe la diferenciación de la población CPU respecto al resto de poblaciones, y está asociado con la variabilidad del alelo *Mdh-1^c* (Fig. 2.2.3).

TABLA 2.2.5. Correlaciones de Pearson (diagonal superior) y valores de significancia (diagonal inferior) entre alelos de los loci evaluados en cuatro poblaciones de *S. haemastoma*.

Locus	Alelos	<i>Mdh -1</i>			<i>Mdh -2</i>	
		a	b	c	a	b
<i>Mdh -1</i>	a	***	- 0,120	- 0,70	0,377	- 0,269
	b	0,136	***	- 0,540	0,157	0,032
	c	0,260	0,000	***	0,080	- 0,024
<i>Mdh-2</i>	a	0,000	0,074	0,232	***	- 0,299
	b	0,006	0,384	0,413	0,003	***

TABLA 2.2.6. Análisis de Componentes Principales de los loci *Mdh-1* y *Mdh-2* evaluado en cuatro poblaciones de *S. haemastoma*.

Locus	Alelo	Componentes Principales		Comunalidad
		1	2	
<i>Mdh -1</i>	a	0,750	0,032	0,563
	b	- 0,075	0,886	0,791
	c	0,103	- 0,857	0,745
<i>Mdh -2</i>	a	0,765	0,159	0,610
	b	- 0,687	- 0,013	0,472
<i>Autovalor</i>		1,634	1,546	
<i>Varianza</i>		32,679	30,915	
<i>Var. Acumulada</i>		32,679	63,594	

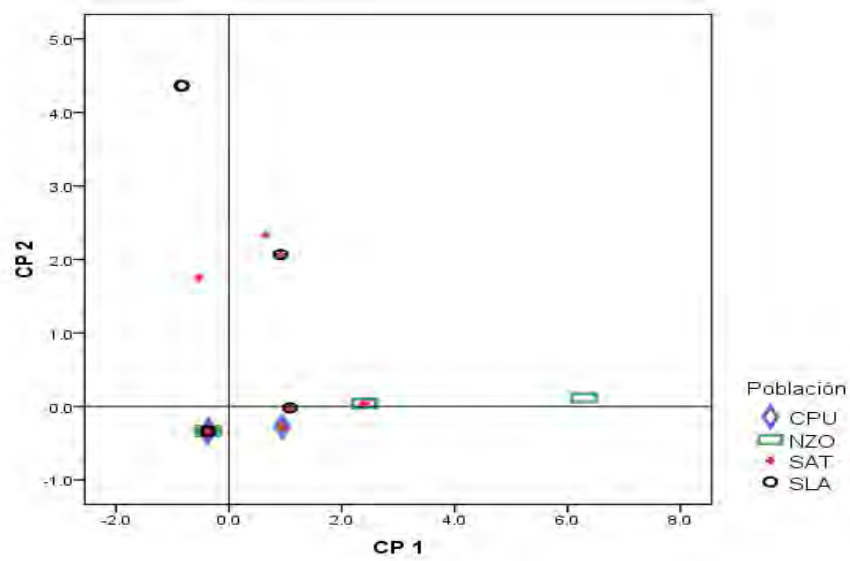


FIGURA 2.2.2. Posición relativa de los individuos de cuatro poblaciones de *S. haemastoma* de acuerdo al ploteo del primer y segundo componente principal de los loci *Mdh* 1 y 2

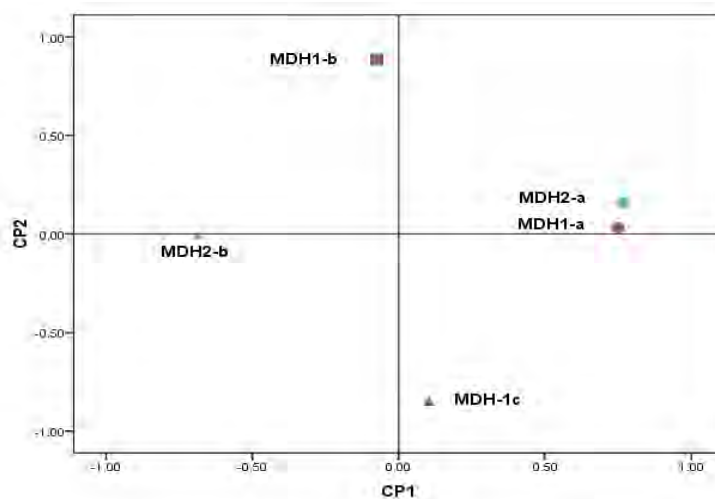


FIGURA 2.2.3. Primer y segundo componentes principales de los alelos de los loci *Mdh* 1 y 2 para las poblaciones de NZO, CPU, SAT y SLA de *S. haemastoma*.

DISCUSIÓN

1. Variabilidad morfológica

Caracteres cuantitativos de la concha

Entre los gasterópodos existe una alta variabilidad a nivel de la morfología de la concha, lo que frecuentemente ha sido fuente de confusión para una correcta clasificación taxonómica. Su gran diversidad morfológica generalmente ha sido relacionada con las variaciones que ocurren en el hábitat, ejerciendo presiones selectivas diferenciales, además de ser influido en la distribución vertical y latitudinal de los organismos (Rilov *et al.*, 2005). Así, diferentes condiciones oceanográficas son responsables de las variaciones morfológicas, sea por ejemplo en adaptaciones en la coloración externa debido a influencia de diferencias en el sustrato, o a nivel del crecimiento como una respuesta ante la intensidad del oleaje o como una reducción a la vulnerabilidad a predación, etc. (Palmer, 1985b; Kirby *et al.*, 1994; Ekendahl & Johannesson, 1997; Chiu *et al.*, 2002).

En este estudio, variaciones significativas entre los individuos de la zona norte y sur ($P = 0.000$) fueron observadas a nivel de las longitudes totales de la concha. La presencia de organismos con menores longitudes totales puede estar relacionada con su distribución en zonas más expuestas en la zona de Mendieta (longitud total promedio 32,69 mm) en comparación con otros organismos presentes en zonas más protegidas y cerradas de la zona sur como Atenas (41,28 mm). Ramírez *et al.* (2005) reportaron para los gasterópodos *Osilinus atrata* procedentes de la zona intermareal

rocosa de las Islas Canarias, una relación entre organismos de tallas menores con una mayor oportunidad de éstos para encontrar zonas refugio en grietas y huecos, reduciendo así la vulnerabilidad al desalojo de los organismos por impacto del oleaje y además permitiendo una mayor protección ante los predadores. Mientras que por el contrario, para *O. sauciatus* los organismos de mayores tallas parecen encontrarse más afectados por el oleaje. Por otro lado, Rugh (1997) también reporta la presencia de variaciones intraespecíficas en el tamaño de la concha de los gasterópodos del género *Littorina* relacionadas con diferencias en el tipo de orilla.

Las variaciones observadas en *S. haemastoma* entre longitud y peso se encontraron estar altamente correlacionadas explicando, según el análisis de CP, el 75,97% de la variabilidad existente entre las poblaciones analizadas, posiblemente relacionado con el tipo de hábitat y de alimento. De igual forma, Toro (1996) reportó para *Ostrea chilensis* la presencia de variaciones en la longitud de los organismos relacionados con la disponibilidad del alimento, considerando variaciones dentro de los rangos de tolerancia. Sin embargo, para estas relaciones entre parámetros cuantitativos con la variabilidad de hábitat sólo se pudo observar para algunas poblaciones *S. haemastoma*. Al parecer, otros factores ambientales también estarían ejerciendo influencia en la variabilidad entre pesos y longitudes en estas poblaciones.

Por otro lado, diferencias en las tallas de los organismos marinos parecen presentar una mayor relación con las variaciones en la TSM. Entre los lugares muestreados de la zona norte, una menor TSM se registra en Paita, según reportes de IMARPE para los años 2006 y 2007 (Anexo Va,c y VIa,c), donde los individuos presentaron las menores longitudes totales (30,76 mm) entre las poblaciones del norte. Por otro lado,

entre las poblaciones de la zona sur de la Reserva Nacional de Paracas (RNP), Atenas ha sido reportado como una zona de mayor temperatura superficial del mar (TSM) comparado con el resto de lugares de la RNP (Anexo Vb,d y VIb,d), donde los individuos presentaron las mayores longitudes totales promedio (41,28 mm) respecto a las otras poblaciones de la zona como Lagunilla (32,38 mm) o Arquillo (36,76 mm) que presentan menores temperaturas a lo largo del año comparado con Atenas. Además, mayores longitudes de la concha en la población de Atenas también estarían relacionadas con una mayor variabilidad a nivel genético, proporcionándoles a los organismos un mayor *fitness* frente a altas temperaturas, como se discute más adelante. Por otro lado, reportes en la especie *Acanthina punctulata* atribuyen los aumentos de la longitud por incrementos en la longevidad de los organismos ante bajas temperaturas (Gianniny & Geary, 1992).

Una mayor diferenciación poblacional se observó estar muy relacionada por la variabilidad en el índice de longitud (IndLo 0,989) en relación a diferencias en la TSM. De acuerdo a la proyección del segundo componente principal, existe una marcada diferenciación en IndLo entre los organismos de la zona norte (con mayores valores) respecto al resto de poblaciones, sobretodo con las poblaciones de la zona centro (con menores valores). Mayores IndLo se observaron en las poblaciones presentes en ambientes con las mayores TSM de la zona norte, mientras que menores valores del índice corresponden a menores longitudes de la apertura de la boca respecto a la longitud total presentes en ambientes de menor TSM.

Boulding (1990) menciona para gasterópodos de orillas expuestas, incrementos en la abertura de la boca en organismos que presentan un aumento en el área del pie. Así,

mayores áreas del pie de los gasterópodos podrían estar relacionados con el incremento de la actividad de los organismos frente a altas temperaturas, a su vez que mejoran su capacidad de fijación a la roca. Por otro lado, también se ha reportado para *Littorina scutulata* incrementos de la abertura de la boca en organismos que presentan una mayor exposición al oleaje (Rugh, 1997), o la predominancia de formas elongadas y boca estrecha en ejemplares de *Nucella lapillus* presentes en zonas protegidas al oleaje (Kirby *et al.*, 1994). Ramírez *et al.* (2005) menciona que menores longitudes de la abertura de la boca se relacionan con un incremento en la resistencia a la desecación típico de orillas protegidas, permitiéndole una mayor retención de agua y soportado mejor la desecación durante largos periodos de emersión, así como una reducción al ataque por predadores.

Caracteres cualitativos de la concha de influencia ambiental

A diferencia del análisis de caracteres cuantitativos, sólo el 61% de la varianza de los caracteres cualitativos de *S. haemastoma* puede ser explicado considerando los cuatro primeros CP, relacionado con la alta diversidad y plasticidad morfológica que se observa entre las diferentes poblaciones.

Las poblaciones del centro (Lima) presentan una alta correlación entre las variaciones de las esculturas axiales y verticales. La presencia de tubérculos o esculturas en la concha son referidos como caracteres de influencia ambiental. Boulding (1990) reportó para gasterópodos intermareales la predominancia de individuos con conchas lisas y de amplias aberturas de la boca en zonas expuestas al oleaje. Sin embargo, contrario a lo mencionado, la ausencia de tubérculos entre las poblaciones estudiadas

se encontró predominantemente en zonas protegidas (La Mina, Lagunilla); mientras que organismos con tubérculos desarrollados se encontró en zonas más expuestas (norte del Perú). Al parecer, la presencia de formas redondeadas estarían relacionadas con una mayor resistencia a la predación, también reportado por Gianniny & Geary (1992) en poblaciones de *Acanthina spirata*, y por Rugh (1997) en *Littorina plena* y *L. scutulata* habitando además zonas con mayor exposición al oleaje.

Por otro lado, las variaciones de un segundo grupo de caracteres denominados como caracteres del crecimiento, como el grosor de la concha, el tamaño y simetría de los dientes de la abertura de la boca presentaron un patrón similar. El engrosamiento de la boca parece estar influenciado por el grosor de los dientes y la presencia de esculturas axiales, proporcionándole al individuo una mayor resistencia al ataque de predadores. Palmer (1985) también reportó esta relación para la especie *Thais lamellosa*. A pesar que el engrosamiento proporciona ventajas a los organismos reduciendo su vulnerabilidad, sin embargo también requiere un mayor costo energético que es dependiente de las condiciones ambientales, de tal manera que pueden estar limitando o no su crecimiento, aún frente a disponibilidad de alimento en el ambiente.

Las fluctuaciones temporales de la abundancia de predadores y epibiontes influyen en la diferenciación fenotípica en un lugar determinado. Así, una similaridad encontrada en el tamaño de los dientes, y en la simetría de dientes y de líneas concéntricas de las conchas se registró en organismos con una mayor incidencia de perforadores y epibiontes, sobretudo entre las poblaciones de la zona centro y de La Mina (sur). Si bien, el engrosamiento puede ser considerado como un carácter ecofenotípico, por otro lado la presencia de predadores actúa como un factor selectivo en las

poblaciones, con efectos a nivel del flujo génico y en consecuencia en su variabilidad a nivel genético entre poblaciones expuestas a las diferentes intensidades de predación. Pero además, las diferencias en el hábitat también pueden constituir barreras para la dispersión de los organismos, limitando el flujo génico.

Las diferencias en corrientes, temperaturas, o tipos de orilla como expuestas o bahías protegidas constituyen condiciones importantes que permiten una diferenciación morfológica entre las poblaciones del norte y centro. Más aún, las poblaciones RNP correspondiente a la denominada zona sur, presentaron de acuerdo al análisis discriminante, una variabilidad morfológica similar entre las poblaciones de la zona norte y centro. Esta gran variabilidad está relacionada con la alta variación de microhábitas de tipos de orilla, zonas más cerradas y diferencias en temperaturas por diferencias en la plataforma continental que existe en el Reserva. Áreas pequeñas o bahías protegidas, también constituye barreras en el flujo génico, tal como se demuestra en el análisis aloenzimático. Gosselin & Chia (1995) reportaron para *Nucella emarginata* una limitada capacidad de dispersión a causa de la variabilidad de microhábitats, siendo de importancia para la determinación del tamaño y distribución de sus poblaciones.

Caracteres cualitativos de influencia genética: Coloración de la concha.

La coloración es uno de los pocos caracteres fenotípicos que varía en forma discreta como un carácter heredable. Rugh (1997) reportó diferencias a lo largo de varias generaciones de *Littorina* indicando un polimorfismo en el bandeo influenciado por un factor genético. Palmer (1985b) reportó para poblaciones de *Stramonita*

emarginata de las costas del Pacífico norte, la relación entre el carácter de coloración con la presencia de un locus autosómico que, interactuando con otros genes, varía la intensidad de la coloración externa.

Una diferencia poblacional de *S. haemastoma* se explica en gran parte gracias a los patrones diferenciales observados en la coloración, tanto de la concha, del labio interno como del labio externo. La variabilidad de estos caracteres se encontró estar correlacionada de forma positiva con los cambios en el índice de longitud, siendo considerados como un grupo de caracteres de influencia genética, responsables de la mayor diferenciación de los organismos de la zona norte. De acuerdo al análisis de discriminante, la variabilidad en la coloración determina una diferenciación principalmente entre las zonas norte y centro, y no a nivel de tipos de orilla. Además, la alta diversidad de ambientes de la RNP está relacionado con la presencia de una mayor variabilidad de los organismos de la zona sur, presentando una similitud con los organismos del norte y centro, al igual que ocurrió con el análisis de los otros caracteres morfológicos.

En general, se han propuesto una serie de agentes selectivos que estarían influenciando en la variabilidad de la coloración de las conchas tanto en caracoles marinos como terrestres, como por efectos de estrés ante predación, temperatura, o desecación (Tucker, 1991), diferencias en los tipos de sustrato, exposición al oleaje (Burla & Gosteli, 1993), rara vez variando con la edad. Ekendahl & Johannesson (1997) reportaron un alto polimorfismo en el bandeo de las conchas de *Littorina saxatilis* de acuerdo a diferencias en escalas geográficas.

La presencia de un factor genético en la determinación de la coloración de la concha explicaría la ausencia de una correlación entre la coloración y los tipos de orilla, y además permitiría explicar la mayor diferenciación entre la zona norte y centro debido a la presencia de diferentes corrientes marinas que limitan la dispersión de los organismos. Mientras que una mayor similitud entre la población de Atenas con las poblaciones del norte, estaría relacionado con una mayor dispersión de los organismos por cambios en la corriente de aguas (como durante eventos El Niño), y su mantenimiento en esta zona debido a condiciones ambientales.

De acuerdo a las variaciones de temperatura tanto la zona norte como Atenas (RNP) presentan altas TSM. Por lo tanto, el mantenimiento de las diferencias en el polimorfismo de la coloración entre las poblaciones puede estar relacionado con una interacción entre los efectos selectivos por parte de variaciones abióticas. En tal sentido, las variaciones oceanográficas eventuales que ocurren en la costa peruana por ejemplo durante eventos El Niño, involucra desplazamientos de masas de aguas cálidas del norte hacia el sur, con cambios en la temperatura, oxígeno, salinidad, entre otros, ocasionando procesos de dispersión de los organismos (larvas). Estos procesos migratorios junto con las altas TSM de las zonas, estarían interactuando como una fuerza selectiva permitiendo su adaptación y el mantenimiento del carácter, pudiendo afectar además en su variabilidad genética.

2. Variabilidad genética poblacional

Diferencias estructurales y funcionales a nivel de las isoenzimas, así como en sus patrones de regulación y distribución han sido ampliamente estudiados para el entendimiento de las relaciones filogenéticas entre los organismos acuáticos (Buth, 1983; Whitt, 1987).

En general, diferencias en la distribución de los organismos marinos a lo largo de grandes distancias geográficas han sido generalmente relacionadas con una escasa diferenciación genética estimada en base a la variabilidad alélicas de isoenzimas que presentan los individuos de una población. En particular las isoenzimas lactato deshidrogenasa (*Ldh*) y malato deshidrogenasa (*Mdh*) han sido muy utilizadas para el entendimiento de características metabólicas, genéticas, ecológicas así como evolutivas en muchos estudios de sistemática (Coppes, ZL., 1990).

Los resultados obtenidos en este estudio basados en el análisis de los loci *Mdh-1* y *Mdh-2*, de las isoformas de la enzima mitocondrial y citosólica respectivamente, determinan la presencia de una alta heterocigosidad promedio (0,14) o variabilidad genética en las poblaciones de *S. haemastoma* del Perú, comparado con los valores de heterocigosidad reportados para otros gasterópodos marinos. Algunos autores reportan valores cercanos a 0,08, y un polimorfismo de 17,5%. Foltz *et al.* (1993) reportaron para *Littorina littorea* una heterocigosidad observada de 0,073. Si bien, los altos valores de heterocigosidad encontrados podrían incrementarse ligeramente con el número de muestra analizada, sin embargo estudios realizados por Liu *et al.* (1993) en la especie *S. haemastoma* del Atlántico también mencionan valores de

heterocigosidad desde 0,04 para la colección *S. haemastoma canaliculata* hasta 0,149 para la población *S. h. floridana*. Por lo tanto, los resultados obtenidos en poblaciones peruanas indicaría la influencia de factores ambientales que determinan la diferenciación genética poblacional, aún entre poblaciones que se encuentren en sistemas marinos abiertos.

Comparando la variabilidad genética entre poblaciones distribuidas en diferentes provincias biogeográficas, una baja heterocigosidad fue observada en las poblaciones de la provincia Peruana de aguas frías como Pucusana (0,019) y Lagunilla (0,065), excepto en la población de Atenas (0,296). Como se mencionó anteriormente, Atenas presenta una extensa plataforma lo que reduce la capacidad de intercambio de aguas y aumenta la TSM en relación a otras zonas de la RNP (Anexo V y VI). Además, alta heterocigosidad también fue encontrada en la población de Zorritos (0,233) que también habita en aguas cálidas de la provincia Peruana-Panameña. Así, diferencias en parámetros abióticos como la temperatura, pleamares o presencia de predadores han sido relacionados con un efecto de presiones selectivas lo que se relaciona una diferenciación genética poblacional en los organismos marinos.

La baja heterocigosidad promedio observada (0,14) respecto a la heterocigosidad esperada (0,18) encontrada se traduce como una deficiencia de heterocigotos ($D = -0,227$). La deficiencia de heterocigotos generalmente ha sido relacionada con incrementos en el entrecruzamiento o aislamiento reproductivo, con efectos selectivos en el intercambio poblacional, entre otros (Parker *et al.*, 2003). Una deficiencia significativa de H_o en la población de Lagunilla (χ^2 , $P = 0,000$) para el locus mitocondrial *Mdh-1* indicaría una restricción en la dispersión de lavas de los

organismos dado por la disminución en la circulación de aguas de sur a norte originado por la formación geográfica de la Bahía Lagunilla., y observándose en consecuencia una disminución en el flujo génico con otras poblaciones. Esto explicaría además la ausencia del alelo *Mdh-1^a* y la baja frecuencia del alelo *Mdh-2^a* en esta población.

Reportes en bivalvos *Mytilus edulis* también sugieren la ocurrencia de una reducción de heterocigotos por efectos de selección que ocurren durante el estadio larval, pero además mencionan estar relacionados con sus requerimientos nutricionales (Fairbrother & Beaumont, 1993). En ocasiones la presencia de mutaciones nulas podría conducir a una aparente deficiencia en la heterocigosidad poblacional. Estas mutaciones nulas se relacionan con la pérdida de la actividad enzimática en un locus determinado ocurrido por adaptaciones del organismo a cambios ambientales. De esta manera, las deficiencias en la heterocigosidad observadas han sido relacionadas con un mayor *fitness* de los organismos (David *et al.*, 1997).

Flujo génico y dispersión larval

En general, de acuerdo a los valores F se encuentra que existe un alto flujo génico entre las poblaciones de *S. haemastoma*, aunque diferencias en la variación genética fueron observadas en diferentes niveles jerárquicos. Así, entre poblaciones se observa una baja heterogeneidad genética (F_{ST} 0,06), comparado con el mayor desequilibrio genético encontrado en individuos dentro de una población y en el total de las poblaciones muestreadas (F_{IT} 0,210).

Similares valores F han sido reportados para otros gasterópodos marinos cuyas variaciones han sido relacionadas al tipo de reproducción. Los organismos que poseen un estadio larval planctónico presentan un amplio flujo génico, reportado en el gasterópodo *Littorina scutulata*. Liu *et al.* (1991) reportó para poblaciones de *Stramonita floridana* del Atlántico norte, un F_{ST} de 0,025, presentando valores de hasta F_{ST} 0,106 para la aloenzima glutamato-piruvato transaminasa (*Gpt*).

La variación genética intraespecífica se encuentra parcialmente relacionada con la cantidad de material genético que se intercambia mediante el flujo génico entre poblaciones. Largas distancias de dispersión larval o de organismos que ocurren en los océanos representan un potencial extenso para el flujo génico, sin embargo la presencia de diferencias entre las corrientes son un factor importante que determinan la subdivisión entre poblaciones. Así, la presencia de dos provincias biogeográficas en las costas del Perú, de aguas cálidas procedentes del norte y de aguas frías procedentes del sur, delimita la distribución de especies diferentes entre ambas provincias. Sin embargo, la presencia de eventos como El Niño (EN) en la que ocurre el desplazamiento de las aguas cálidas del norte hacia el sur, conllevan a su vez al desplazamiento de especies de la Provincia Panameña hacia la zona sur y en consecuencia cambios en la dispersión de los organismos. Paredes *et al.* (1998) reportaron para la costa centro y sur del Perú la presencia de especies de la zona tropical del norte, atribuyéndolo a un proceso dinámico entre las provincias de ambas zoogeográficas.

Las migraciones latitudinales ocurridas durante eventos El Niño podrían explicar el flujo poblacional de la zona norte hacia el sur del Perú, donde los organismos pueden

lograr establecerse en ciertas zonas de la zona sur que presenten de ambientes de altas temperaturas. Tal como se mencionó anteriormente, la zona de Atenas presenta TSM mayores a las reportadas para otras zonas de la RNP, lo que explicaría la existencia de una similitud a nivel genético con la población de Zorritos de la zona norte. Así, por ejemplo una alta frecuencia del alelo *Mdh-1^a* y *Mdh-2^a* fue observada en las poblaciones de Atenas y Zorritos, en comparación con las otras poblaciones analizadas. Mientras que presencia de sistemas de circulación cerrados de agua en Lagunilla estaría ejerciendo una restricción de la dispersión larval, ocasionando en consecuencia restricciones en el flujo génico y por lo tanto un déficit de heterocigotos observado.

A pesar de haber encontrado un alto flujo génico de acuerdo al análisis de estructura poblacional de *S. haemastoma*, sin embargo existe una desviación del HWE entre las poblaciones para el locus *Mdh-1* (F_{ST} 0,071) respecto al promedio de los loci analizados (F_{ST} 0,066). Esta desviación estuvo relacionada al gran déficit de heterocigotos observado en Lagunilla para el locus *Mdh-1*. Estas diferencias en la variabilidad genética entre las poblaciones indicarían diferencias adaptativas de los individuos ante diferencias ambientales. Aparentemente, las altas frecuencias del alelo *Mdh-2^a* del locus citosólico en la población del norte y en Atenas permitiría un mayor *fitness* a los organismos frente a altas temperaturas, como se verá más adelante.

Estudios a nivel aloenzimático entre poblaciones del molusco *Crassostrea virginica*, determinaron la presencia de frecuencias genéticas relativamente uniformes a lo largo de amplios rangos geográficos, pero una marcada diferencia genética poblacional de acuerdo al análisis del DNA mitocondrial. Es decir, existiría una restricción del flujo

génico evidenciada a nivel del DNA, pero que a nivel enzimático existe la presencia de efectos selectivos que favorecen a individuos heterocigotos determinando entonces una similitud entre las poblaciones distribuidas bajo patrones abióticos similares.

La diferenciación poblacional de *S. haemastoma* observada de acuerdo a las distancias genéticas de Nei determinaron valores dentro del rango de diferenciación de poblaciones cercanamente relacionadas ($D < 0,1$), y menor al valor para poblaciones alejadas o especies separadas ($D > 0,2$). De acuerdo a las frecuencias alélicas de los loci *Mdh*, se puede determinar que existe una mayor similitud genética entre las poblaciones de Zorritos y Atenas, con una distancia genética de 0,006 unidades, mientras que la mayor distancia genética ($D = 0,018$) se encontró entre Zorritos y Lagunilla, y entre Atenas y Pucusana. Estudios en gasterópodos del género *Thais* también reportaron bajas distancias genéticas entre poblaciones utilizando datos aloenzimáticos. Tan & Liu (2001) reportaron para poblaciones de *Thais clavigera* procedentes de Taiwán y Hong Kong una distancia genética de 0,006 unidades, mientras que entre poblaciones de Taiwán de la especie *T. rufotincta* reportaron distancias menores a 0,0007 unidades.

Más aún, de acuerdo a las distancias genéticas calculadas, se observan dos grupos de poblaciones asociadas por una mayor similaridad genética (según método UPGMA), uno formado por las poblaciones (Atenas y Zorritos) distribuidas en zonas de mayores TSM, y otro formado por poblaciones (Pucusana y Lagunilla) distribuidas en zonas de menor TSM. Este patrón del agrupamiento parece estar relacionado con el patrón de variación del locus citosólico *Mdh-2*, donde las poblaciones CPU y SLA tienen una presencia nula o casi ausente del alelo *Mdh-2^a*, tal como se observó mediante el

análisis de componentes principales. Así, de acuerdo al análisis de componentes principales, un 33% de la variabilidad genética poblacional está dada por el locus *Mdh-2* (con los mayores valores encontrados según el CP1). Si bien, mediante el ploteo de los dos CP no se observa una similitud en la agrupación geográfica obtenida según la distancia genética, sin embargo sí se pudo observar que existe una mayor diferenciación de la población de Zorritos dada por la variabilidad del alelo “a” de ambos loci, encontrándose correlacionados positivamente. Por otro lado, para el locus *Mdh-1*, se observó que las poblaciones de Lagunilla y Atenas están diferenciadas por variabilidad del alelo *Mdh-1^b* que además se encuentra correlacionado de forma negativa con la variabilidad del alelo *Mdh-1^c*.

Variabilidad genética e influencia de factores ambientales

Si bien las variaciones en las frecuencias alélicas aloenzimáticas pueden reflejar patrones de ocurrencia o no de flujo génico entre poblaciones, pero además estas diferencias también pueden indicar un efecto selectivo del ambiente sobre la actividad de las enzimas funcionales. Mitton & Koehn (1975) mencionan que un alto polimorfismo aloenzimático refleja una mayor heterogeneidad de ambientes, siendo esto relevante en la medida en que representa un potencial adaptativo intra e interespecífico.

En este estudio, se observó el locus citosólico *Mdh-2* ser monomórfico en la población de la costa central del Perú (Pucusana), y poca variabilidad alélica para el locus de la isoforma mitocondrial *Mdh-1*, encontrándose casi fijado el alelo *Mdh-1^c* (0.98) en esta población. Por el contrario, la alta variabilidad de los loci analizados

entre poblaciones de la RNP estaría relacionado con la alta diversidad de ambientes característico de la Reserva, observado sobretodo en la isoforma *Mdhm* en la población de Atenas.

No solo las diferencias entre los tipos de orilla serían factores causantes de las variaciones en las frecuencias alélicas aloenzimáticas, sino que además reportes de variaciones en particular de la enzima *Mdh* han sido relacionadas con adaptaciones a cambios de temperatura y de presión. Lin *et al.* (2002) reportó para peces teleósteos una mayor estabilidad térmica de la isoforma citosólica de la *Mdh* comparado con la isoforma mitocondrial. Por lo tanto, las diferencias en la TSM entre las zonas muestreadas también serían causantes de las variaciones alélicas observadas, lo que explicaría el mayor número de alelos encontrado para el locus citosólico *Mdh-1* en comparación con el locus *Mdh-2*. Más aún, la presencia del mayor número de alelos en la población de Atenas (alelos *Mdh-1*^a, ^b, ^c), y las mayores frecuencias alélicas (*Mdh-1*^a y *Mdh-2*^b) parecen estar relacionadas con poblaciones distribuidas en zonas de mayores TSM (Zorritos y Atenas).

La temperatura del hábitat es probablemente uno de los factores físicos más importantes que afecta la distribución y abundancia de los organismos marinos. Mitton & Koehn (1975) mencionan que los alelos que signifiquen un mejor *fitness* en los organismos para altas temperaturas frecuentemente se presentan con mayores frecuencias en ambientes cálidos. De esta manera, una mayor variabilidad a nivel genético incrementaría la capacidad de sobrevivir en los organismos, que a su vez se traduce en cambios a nivel morfológico, otorgándole así una mayor capacidad adaptativa frente a los cambios ambientales.

Estudios de la isoforma de la *Mdh* para el género *Haliotis* mencionan diferencias interespecíficas de acuerdo a la estabilidad térmica y la sensibilidad de las propiedades cinéticas de la enzima a altas temperaturas (Dahlhoff & Somero, 1993). Es así que, los organismos de la zona intermareal presentan la forma citosólica (*Mdh-2*) de la enzima de mayor resistencia al estrés térmico comparado con especies distribuidas en la zona subtidal o de altas latitudes que presentan mayores frecuencias de la forma *Mdh-2*. Esto sugiere que existe una evolución entre las proteínas resistentes a la denaturación térmica, otorgándole una mayor ventaja selectiva a los organismos. Además, diferencias en la sensibilidad de la enzima *Mdh-2* frente a cambios en presiones también han sido relacionadas con diferencias adaptativas entre los invertebrados a lo largo de la columna de agua del mar (Dahlhoff & Somero, 1991).

Cambios en las frecuencias alélicas de otras aloenzimas también han sido vinculados con mecanismos adaptativos de los organismos ante hábitats diferentes. Freeth & Sin (1986) reportó para el poliplacóforo *Sypharochiton pellispentis* variaciones en las frecuencias alélicas del locus *Mdh-1* asociado a ambientes protegidos y a la edad del organismo, y diferencias en la actividad enzimática del locus *Idh-2* asociado con diferencias entre ambientes protegidos y expuestos. Altas frecuencias alélicas de las aloenzimas *Ldh*, *Est* y *Mdh* han sido reportados en poblaciones del pez *Fundulus heteroclitus* distribuidos en ambientes de altas temperaturas (Mitton & Koehn, 1975). Variaciones en la actividad enzimática de la aloenzima *Ldh-B* también han sido reportadas por Crawford & Powers (1989) para poblaciones de *F. heteroclitus* en relación con variaciones térmicas de su hábitat. Además, diferencias en los alelos

codominantes fijados del locus *Ldh* han sido asociadas a diferencias en las tasas de desarrollo, flujo metabólico y sobrevivencia ante altas temperaturas.

Schulte *et al.* (2000) menciona una mayor expresión genética entre poblaciones de *F. heteroclitus* de aguas frías frente a incrementos de temperatura, respecto a poblaciones de aguas cálidas, con importantes consecuencias evolutivas en la variación de la regulación génica. Variaciones en la transcripción parecen ser un mecanismo compensatorio de las diferencias en temperaturas (Crawford & Powers, 1992a), como respuesta de una evolución adaptativa en diferencias heredables, sea dentro como entre especies.

Diversos autores han relacionado la ocurrencia de variaciones a nivel aloenzimático con una respuesta adaptativa a los cambios ambientales tanto en vertebrados como en invertebrados marinos (Crawford & Powers, 1989; Fevolden & Garner, 1987; Dahlhoff & Somero, 1993; Correa *et al.*, 1998). Es entonces que, las variaciones en el número y frecuencias alélicas observadas entre las poblaciones de *S. haemastoma*, estarían relacionadas con un patrón de distribución latitudinal de acuerdo a una variedad de microhábitats térmicos. Estas adaptaciones a los cambios ambientales involucran un desarrollo de mecanismos que actúan en el proceso de aclimatación fisiológica. Dahlhoff *et al.* (1990) reportaron diferencias intraespecíficas en la cinética de las enzimas relacionadas con un patrón vertical en la distribución de peces en la columna de agua.

Estas variaciones en la estructura de proteínas permiten a los organismos incrementar la capacidad de colonización diferentes hábitats. Por lo tanto, los patrones

biogeográficos de los invertebrados estarían influenciados por diferencias adaptativas en la estructura y función de proteínas, quizás por sustituciones de aminoácidos que pueden caracterizar cambios entre especies filogenéticamente distantes. Más aún, en ocasiones una mayor adaptación de los organismos por variaciones genéticas se refleja a nivel de cambios morfológicos entre poblaciones.

Heterocigosidad y variabilidad morfológica

Tal como se mencionó anteriormente, incrementos en la heterocigosidad proporcionan a la población mayor capacidad de sobrevivir y reproducirse, o también llamado *fitness*, en un ambiente determinado (David *et al.*, 1997). Esta característica le proporciona a los organismos una mayor viabilidad que puede reflejarse a nivel morfológico, en la medida en que está relacionado con el nivel fisiológico, una mayor tasa de alimentación, condiciones ambientales, o producto de una interacción entre varios factores.

Algunos autores mencionan una dependencia entre cambios en las frecuencias alélicas con el tamaño o la edad, observándose incrementos de heterocigosidad en animales más largos, de mayor edad, o de mayor tasa de crecimiento (Foltz *et al.*, 1993). Esta relación H_o - tamaño también se observó en este estudio, donde los individuos de la población de Atenas presentaron la mayor longitud total de la concha (41,28 mm) así como una mayor heterocigosidad observada que esperada ($D = 0,014$; $P = 0,7$). Esta relación sugeriría entonces una mayor ventaja en la viabilidad de los individuos que presentan mayor heterocigosis ya que estaría relacionado con un nivel fisiológico que demande menores costos en la ruta metabólica. Sin embargo, algunos autores reportan

una mayor correlación entre el *fitness* y la deficiencia de heterocigotos (Foltz *et al.*, 1993; Gaffney *et al.*, 1990) en poblaciones naturales de moluscos marinos (Zouros & Foltz, 1987; David *et al.*, 1997), así como una influencia de la estructura genética poblacional y la correlación H_o - *fitness*.

En este estudio, entre las poblaciones del sur, la mayor heterocigosidad observada (0,9) se presentó en individuos de Atenas de mayores promedios de longitud total de la concha (41,28 mm), mientras que la población de Lagunilla mostró el menor valor de heterocigosidad observada promedio (0,26) con individuos de menores longitud total promedio (32,38 mm). Muchas hipótesis existen respecto la heterocigosidad y el *fitness*, sugiriendo además estar influenciado por la estructura genética poblacional. Gaffney *et al.* (1990) reportaron una correlación entre la cantidad de deficiencia de heterocigotos y su efecto en la longitud de la concha de la almeja *Mulinia laterales*, sugiriendo una aparente ventaja en la viabilidad de los más heterocigotos.

Por el contrario, cuando las poblaciones de *S. haemastoma* presentaron valores de heterocigosidad cercanos a lo esperado, no se observó ninguna correlación con la longitud de la concha. Además, la heterocigosidad observada en las poblaciones de Zorritos (0,7) y Pucusana (0,4) fueron mayores a lo esperado (0,63 y 0,39 respectivamente). Algunos autores mencionan que la correlación entre heterocigosidad - *fitness* en poblaciones naturales no se observa cuando las frecuencias genotípicas son cercanas a los valores esperados de Hardy-Weinberg. Esto también ha sido reportado en poblaciones de *Littorina littorea* (Foltz *et al.*, 1993).

Por otro lado, algunos escasos trabajos muestran procesos selectivos que actúan sobre la variabilidad aloenzimática de ciertos loci modulados por la intensidad del oleaje, a nivel de gradientes del flujo génico. Incrementos de la variabilidad genética en *N. lapillus* se han encontrado en organismos habitando zonas protegidas por el oleaje (Goudet *et al.*, 1994). Estudios en el locus *Idh-1* del tunicado *Pyura praeputialis* muestran un patrón similar de diferencia de hábitat específico, mas no así respecto a la variabilidad del locus *Pgm-1* (Astorga *et al.*, 2002), y además mostrando una alta variabilidad morfológica.

De esta forma, el uso de marcadores moleculares permite discriminar si la variabilidad morfológica corresponde a una expresión de diferencias interespecíficas (diferentes especies) o a una expresión de la variación ecotípica intraespecífica ambiental o modulada genéticamente (Johanesson *et al.*, 1993; Astorga *et al.*, 2002) como variaciones en la coloración sujetas a una selección natural.

CONCLUSIONES

- A nivel morfológico, existe una alta variabilidad dentro y entre poblaciones. La variabilidad poblacional de la zona centro y sur está más relacionada con variaciones en la longitud, parámetros de crecimiento (grosor, tamaño y simetría de dientes) y de influencia ambiental (tubérculos); mientras que la variabilidad de poblaciones del norte está relacionada con parámetros de influencia genética (coloración externa de la concha, coloración de la boca e índice de longitud).
- Las diferencias significativas encontradas entre poblaciones respecto a la longitud de la concha están relacionadas con variaciones de la TSM. *Las mayores longitudes totales y de abertura de la boca ocurren en poblaciones distribuidas en zonas de mayores TSM.*
- Entre los caracteres cualitativos de influencia ambiental, la variabilidad del desarrollo de tubérculos estuvo relacionado con el nivel de exposición al oleaje.
- Existe una significativa diferenciación entre las poblaciones del norte respecto al centro y sur a nivel de los caracteres cualitativos de influencia genética y de la variabilidad genética de la aloenzima *Mdh*.
- A nivel aloenzimático, existe una alta heterocigosidad promedio y un mayor flujo génico entre las poblaciones de *S. haemastoma*.

- Existen variaciones en el número y frecuencias alélicas de las isoformas de la aloenzima *Mdh* entre las poblaciones de *S. haemastoma* de acuerdo a su distribución latitudinal en una variedad de microhábitats térmicos.

- Una mayor similitud genética y una alta variabilidad se observa entre las poblaciones distribuidas en ambientes de alta TSM de la zona norte (Zorritos) y sur (Atenas).

- La población de Pucusana (menor TSM) es monomórfica para la *Mdh-2*, mientras que las poblaciones de Zorritos y Atenas (de alta TSM) presentaron una mayor variabilidad de la *Mdh-2*. *Estas diferencias poblacionales en la isoforma citosólica estarían relacionadas con una resistencia a altas temperaturas, otorgándole quizás una ventaja selectiva a los organismos.*

- Existe una relación entre el nivel de heterocigosidad y la talla de los organismos. La población de Atenas mostró altas *Ho* y mayores longitudes, mientras que organismos de Lagunilla mostraron un déficit de *Ho* y menores tallas. Además, no se observa esta correlación cuando las heterocigosidades están cercanos al HWE.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott, R.T. 1974. American seashells – the marine Mollusca of the Atlantic and Pacific coasts of North America. Van Nostrand Reinhold Co., New York.
- Apte, S. & Gardner, J.P.A. 2001. Absence of population genetic differentiation in the New Zealand greenshell mussel *Perna canaliculus* (Gmelin 1791) as assessed by allozyme variation. *J Exp Mar Biol Ecol* 258: 173-194.
- Andrews, J. 1971. Sea shells of the Texas coast. University of Texas Press. Austin.
- Astorga, M., Guíñez, R., Ortiz, J.C. & Castilla, J.C. 2002. Variación fenotípica y genética en el tunicado *Pyura praeputialis* (Heller, 1878) en el área norte de la Bahía de Antofagasta, Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 75: 515-526.
- Bandel, K. 1984. The radulae of Caribbean and other Mesogastropoda and Neogastropoda. *Zoologische Verhandelingen* 214: 176 pp.
- Boulding, E.G. 1990. Are the opposing selection pressures on exposed and protected shores sufficient to maintain genetic differentiation between gastropod populations with high intermigration rates? *Hidrobiologia* 193: 41-52.
- Burla, H. & Gosteli, M. 1993. Thermal advantage of pale coloured morphs of the snail *Arianta arbustorum* (Helicidae, Pulmonata) in alpine habitats. *Ecography* 16: 345–350.
- Burton, R. 1994. Inferring the genetic structure of marine populations: a case study comparing allozyme and DNA sequence data. *CalCOFI Rep.*, Vol 35: 52-60.
- Buth, D. (1983) Duplicate isozyme loci in fishes: Origins, distribution, phyletic consequences and locus nomenclature. In: Rattazzi, M., Scadaliòs, J., Whitt, G. (Eds) *Isozymes: Current Topics in Biological and Medical Research*, Bk. 10. Alan R. Liss, New York., pp 381-400.

- Byers, B.A. 1990. Shell colour polymorphism associated with substrate colour in the intertidal snail *Littorina saxatilis* Olivi (Prosobranchia: Littorinidae). *Biol J Linn Soc* 40: 3–10.
- Carvalho, G.R., Shaw, P.W., Hauser, L., Seghers, B.H. & Magurran, A.F. 1996. Artificial introductions, evolutionary change and population differentiation in Trinidadian guppies (*Poecilia reticulata*, Pocciliidae). *Biol J Linn Soc* 57: 219-234.
- Chiu, Y.W., Chen, H.Ch., Lee, S.Ch. & Chen, Ch. 2002. Morphometric analysis of shell and operculum variations in the viviparid snail, *Cipangopaludina chinensis* (Mollusca: Gastropoda), in Taiwan. *Zoological Studies* 41(3): 321-331.
- Clench, W.J. 1947. The genera *Purpura* and *Thais* in the western Atlantic. *Johnsonia* 2(23): 61-91.
- Coppes, Z. (1990) Divergence of duplicate genes in three Scianid species (Perciformes) from the South coast of Uruguay. *Comp Biochem Physiol* B96: 33-39
- Coppes, Z. & Somero, G. 1990. Temperature - adaptive differences between the M₄-lactate dehydrogenases of stenothermal and eurythermal Sciaenid fishes. *J exp Zool* 254: 127-131.
- Correa, F., Díaz, F., Sierra, E., Bückle, L., Barón, B. & Rodríguez, D. 1998. Variación alélica y genotípica de Leucin-aminopeptidasa (Lap-2) y Fosfoglucomutasa (PGM) en *Procambarus clarkii* (Decapada: Cambaridae), aclimatado a diferentes temperaturas y expuesto al endurecimiento térmico. *Ciencias Marinas* 24(3):283-294.

- Crawford, D. & Powers, D. 1989. Molecular basis of evolutionary adaptation at the lactate dehydrogenase – B locus in the fish *Fundulus heteroclitus*. *Proc Natl Acad Sci* 86: 9365 – 9369.
- Crawford, D. & Powers, D. 1992a. Evolutionary adaptation to different thermal environments via transcriptional regulation. *Mol. Biol. Evol.* 9(5): 806-813.
- Dahlhoff, E., Schneidemann, S. & Somero, G. 1990. Pressure – temperature interactions on M₄-lactate dehydrogenases from hydrothermal vent fishes: Evidence for adaptation to elevated temperatures by the zoarcid *Thermarces andersoni*, but not the bythitid *Bythites hollisi*. *Biol Bull mar biol Lab, Woods Hole* 179, 134-139.
- Dahlhoff, E. & Somero, G. 1991. Pressure and temperature adaptation of cytosolic malate dehydrogenases of shallow and deep living marine invertebrates: Evidence for high body temperatures in hydrothermal vent animals. *J exp Biol* 159: 473-487.
- Dahlhoff, E. & Somero, G. 1993. Kinetic and structural adaptations of cytoplasmic malate dehydrogenases of Eastern Pacific abalone (Genus *Haliotis*) from different thermal habitats: biochemical correlates of biogeographical patterning. *J exp Biol* 185: 137-150.
- Dahlhoff, E., Stillman, J. & Menge, B. 2002. Physiological community ecology: Variation in metabolic activity of ecologically important rocky intertidal invertebrates along environmental gradients. *Integ And Comp Biol* 42: 862-871.
- David, P., Delay, B. & Jarne, Ph. 1997. Heterozygosity and growth in the marine bivalve *Spisula ovalis*: testing alternative hypotheses. *Genet Res Camb* 70: 215-223.

- David, P. 1998. Heterozygosity-fitness correlations: new perspectives on old problems. *Heredity* 80: 531-537
- Day, A.J., Hawkins, A.J.S. & Visootiviset, P. 2000. The use of allozymes and shell morphology to distinguish among sympatric species of the rock oyster *Saccostrea* in Thailand. *Aquaculture* 187: 51-72.
- De Wolf, H., Backeljau, T., Medeiros, R. & Verhagen, R. 1997. Microgeographical shell variation in *Littorina striata*, a planktonic developing periwinkle. *Mar Biol* 129: 331-342.
- Ekdahl, A. & Johannesson, K. 1997. Shell colour variation in *Littorina saxatilis* Olivi (Prosobranchia: Littorinidae): a multi-factor approach. *Biol J Linn Soc* 62: 401-419.
- Endler, J A. 1995. Multiple-trait coevolution and environmental gradients in guppies. *Trends Ecol Evol* 10: 22-29.
- Excoffier, L.G. Laval, and S. Schneider. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.
- Fairbrother, J.E. & Beaumont, A.R. 1993. Heterozygote deficiencies in a cohort of newly settled *Mytilus edulis* spat. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 73: 647-653.
- Fevolden, S. & Garner, S. 1987. Environmental stress and allozyme variation in *Littorina littorea* (Prosobranchia). *Mar Ecol Prog Ser* 39: 129-136.
- Foltz, D.W., Shumway, S.E. & Crisp, D. 1993. Genetic structure and heterozygosity-related fitness effects in the marine snail *Littorina littorea*. *Amer Malac Bull* 10(1): 55-60

- Freeth, A. & Sin, F. 1986. Enzyme variation in marine and estuarine populations of the chiton *Sypharochiton pellispentis*. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 20: 561-568.
- Gaffney, P.M.; Scott, T.M.; Koehn, R.K. & Diehl, W.J. 1990. Interrelationships of heterozygosity, growth rate and heterozygote deficiencies in the coot clam, *Mulinia lateralis*. *Genetics* 124: 687-699.
- Gillespie, J.H. 1991. The causes of molecular evolution. Oxford Univ, Press, New York.
- Gianniny, G. & Geary, D. 1992. Geographical and temporal variation in shell morphology of *Acanthina* species from California and northern Baja California. *The Veliger* 35(3): 195-204.
- Gosselin, L & Chia, F. 1995. Distribution and dispersal of early juvenile snails: effectiveness of intertidal microhabitats as refuges and food sources. *Mar Ecol Prog Ser* 128: 213-223.
- Goudet, J., De Meeús, T., Day, A.J. & Gliddon, C.J. 1994. The different levels of population structuring of the dogwhelk, *Nucella lapillus*, along the south devon coast. En: Beaumont AR (ed) Genetics and evolution of aquatic organisms: 81-95. Chapman & Hall, London, United Kingdom.
- Herbert, P.D.N. & Beaton, M.J. 1993. Methodologies for allozymes analysis using cellulose acetate electrophoresis. A Practical Handbook. Helena Laboratories, 32 pp.
- Hilbish, T. 1996. Population genetics of marine species: the interaction of natural selection and historically differentiated populations. *J Exp Mar Biol Ecol* 200: 67-83.

- Hillis, D.M. & Moritz, C (eds). 1990. *Molecular Systematics*. Sinauer Associates, Sunderland, Mass
- Hughes, R.N. & Taylor, M.J. 1997. Genotype – environment interaction expressed in the foraging behavior of dogwhelks, *Nucella lapillus* (L.), under simulated environmental hazard. *Proc R Soc Lond B* 264: 417-422.
- Janson, K. & Sundberg, P. 1983. Multivariate morphometric analysis of two varieties of *Littorina saxatilis* from the Swedish west coast. *Mar Biol* 74: 49-53.
- Johannesson, K., Johannesson, B. & Rolan-Alvarez, E. 1993. Morphological differentiation and genetic cohesiveness over a microenvironmental gradient in the marine snail *Littorina saxatilis*. *Evolution* 47: 1770-1787.
- Johannesson, K., Johannesson, B. & Lundgren, U. 1995. Strong natural selection causes microscale allozymes variation in a marine snail. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 2602-2606.
- Kapper, M.A., Stickle, W., Blakeney, E. 1985. Volume regulation and nitrogen metabolism in the Muricid gastropod *Thais haemastoma*. *Biol Bull* 169: 458-475.
- Katoh, M., Foltz, D.W. 1994. Genetic subdivision and morphological variation in a freshwater snail species complex formerly referred to as *Viviparus georgianus* (Lea). *Biol J Linn Soc* 53: 73-95.
- Keen, A.M. 1971. *Sea shells of Tropical West America. Marine Mollusks from Baja California to Peru*. Second edition. Stanford Univ. Press, Stanford, 1064 pp.
- Knowlton, N., Weigt, L.A., Solorzano, L.A., Mills, D.K. & Bermingham, E. 1993. Divergence in protein, nutochondrial DNA and reproductive compatibility across the Isthmus of Panama. *Science* 260:1629-1632.

- Kool, S. 1993. Phylogenetic analysis of the Rapaninae (Neogastropoda: Muricidae). *Malacologia* 35(2): 155-259.
- Kong, L., Li, Q. & Qiu, Z. 2007. Genetic and morphological differentiation in the clam *Coelomactra antiquate* (Bivalvia: Veneroidea) along the coast of China. *J Exp Mar Biol Ecol* 343: 110-117.
- Kirby, R., Bayne, B. & Berry, R. 1994. Physiological variation in the dogwhelk *Nucella lapillus*, L. either side of a cline in allozyme and karyotype frequencies. *Biol J Linn Soc* 53: 277-290.
- Kool, S. 1993. Phylogenetic analysis of the Rapaninae (Neogastropoda: Muricidae). *Malacologia* 35(2): 155-259.
- Langston, A., Hoare, R., Stefansson, M., Fitzgerald, R., Wergeland, H., Mulcahy, M. 2002. The effect of temperature on non-specific defence parameters of three strains of juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Fish Shellfish Immunol* 12:61-76
- Laudien, J., Flint, N.S., van der Bank, F.H. & Brey, T. 2003. Genetic and morphological variation in four populations of the surf clam *Donax serra* (Röding) from southern African sandy beaches. *Biochemical Systematics and Ecology* 31: 751-772.
- Lazou, A., Gaitanaki, C., Michaelidis, B., Papadopoulos, A. & Beis, I. 1987. Purification, catalytic and regulatory properties of malate dehydrogenase from the foot of *Patella caerulea*. *Comp Biochem Physiol* 88B, 1033-1040.
- Leonard, G.H., Bertness, M.D. & Yund, P.O. 1999. Crab predation, waterborne cues, and inducible defenses in the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Ecology* 80: 1-14.
- Levins, R. 1968. Evolution in changing environments (Princeton Univ, Press, Princeton, New Jersey).

- Levinton, J.S. & Suchanek, T.H. 1978. Geographic variation, niche breadth and genetic differentiation at different geographic scales in the mussels *Mytilus californianus* and *M. edulis*. *Mar Biol* 49: 363-375.
- Levy, J. 1993. Manual de Técnicas em electroforese de enzimas. Departamento de Química. Laboratorio de Bioquímica Marinha. Brasil, 72 pp.
- Lin, J-J., Yang, T-H., Wahlstrand, B., Fields, P., Somero, G. 2002. Phylogenetic relationships and biochemical properties of the duplicated cytosolic and mitochondrial isoforms of malate dehydrogenase from a teleost fish, *Sphyræna idiaestes*. *Journal of molecular evolution*,. 54(1): 107-227.
- Liu, L., Foltz, D. & Stickle, W. 1991. Genetic population structure of the southern oyster drills *Stramonita (Thais) haemastoma*. *Mar Biol* 111: 71-79.
- Lively, C.M. 1986. Predator-induced shell dimorphism in the acorn barnacle *Chthamalus anisopoma*. *Evolution* 40: 232-242.
- Maly, I.P., Toranelli, M. & Sasse, D. 1994. Intra-acinar profiles of Cytosolic and Mitochondrial Malate Dehydrogenase isoenzymes in rat liver. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 42(7): 855-859.
- Mitton, J. & Koehn, R. 1975. Genetic organization and adaptive response of allozymes to ecological variables in *Fundulus heteroclitus*. *Genetics* 79: 97 – 111.
- Palmer, AR. 1985a. Genetic basis of shell variation in *Thais emarginata* (Prosobranchia, Muricacea). I. Banding in populations from Vancouver Island. *The Biological Bulletin* 169: 638–651.
- Palmer, A.R. 1985b. Adaptive value of shell variation in *Thais lamellose*: effect of thick shells on vulnerability to and preference by crabs. *The Veliger* 27(4): 349-356.

- Palmer, A.R. 1990. Predator size, prey size and the scaling of vulnerability: hatching gastropods vs barnacles. *Ecology* 71: 759-775.
- Paredes, C., Tarazona, J., Canahuire, E., Romero, L., Cornejo, O. & Cardoso, F. 1998. Presencia de moluscos tropicales de la Provincia Panameña en la costa central del Perú y su relación con los eventos “El Niño”. *Rev peru biol* 5(2): 123-128.
- Paredes, C., Cardoso, F. & Tarazona, J. 2004. Distribución temporal de moluscos y crustáceos tropicales en la Provincia Peruana y su relación con los eventos El Niño. *Rev. per. biol.* 11(2): 213-218.
- Parker, M.S., Jumars, P.A., Leclair, L.L. 2003. Population genetics of two bivalve species (*Protothaca staminea* and *Macoma balthica*) in Puget Sound, Washington. *Journal of Shellfish Research* 22(3): 681-688.
- Parsons, K.E. 1997. The Role of dispersal ability in the phenotypic differentiation and plasticity of two marine gastropods. I. Shape. *Oecologia* 110, 461–471
- Parsons, K.E. 1998. The Role of dispersal ability in the phenotypic differentiation and plasticity of two marine gastropods II. Growth. *J Exp Mar Biol Ecol* 221: 1-25.
- Pigliucci, M. 1996. How organisms respond to environmental changes: from phenotypes to molecules (and vice versa). *Trends Ecol Evol* 11,168-173.
- Przeslawski, R. 2004. A review of the effects of environmental stress on embryonic development within intertidal gastropod egg masses. *Mollus Res* 24:43–63.
- Ramírez, R., Paredes, C., Arenas, J. Moluscos del Perú. *Rev. Biol. Trop.* 51 (Suppl 3): 225-284.
- Ramírez, R., Tuya, F., Sánchez-Jerez, P., Fernández-Gil, C., Bergasa, O., Haroun, R.J. & Hernández-Brito, J.J. 2005. Population structure and spatial distribution of the gastropod mollusks *Osilinus atrata* and *Osilinus sauciatus* in the rocky

- intertidal zone of the Canary Islands (Central East Atlantic). *Ciencias Marinas* 31(4): 697-706.
- Rank, N. & Dalhoff, E. 2002. Allele frequency shifts in response to climate change and physiological consequences of allozymes variation in a montane insect. *Evolution* 56(1): 2278-2289.
- Rilov, G., Gasith, A. and Benayahu, Y. 2005. Effect of disturbance on foraging: Whelk activity in wave-exposed rocky shores with minimal tidal range. *Mar.Biol* 147: 421–428.
- Rugh, N.S. 1997. Differences in shell morphology between the sibling species *Littorina scutulata* and *Littorina plena* (Gastropoda: Prosobranchia). *The Veliger* 40(4): 350-357.
- Sarda, F., Bas, C., Roldan, M.I., Pla, C. & Lleonart, J. 1998. Enzymatic and morphometric analyses in Mediterranean populations of the rose shrimp, *Aristeus antennatus* (Risso, 1816). *J Exp Mar Biol Ecol* 221: 131-144.
- Schneider, S., Roessli, D. & Excoffier, L. 2000. Arlequin ver. 2000. A software for population genetics data analysis.
- Schulte, P.M., Glémet, H.C., Fiebig, A.A. & Powers, D.A. 2000. Adaptive variation in lactate dehydrogenase-B gene expression: Role of a stress – responsive regulatory element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 6597-6602.
- Selander, R K & Kaufman, D W. 1973. Genic variability and strategies of adaptation in animals. *Proc Nat Acad Sci* 70(6): 1875-1877.
- Staton, J., Foltz, D. & Felder, D. 2000. Genetic variation and systematic diversity in the ghost shrimp genus *Lepidohthalmus* (Decapoda: Thalassinidea: Callianassidae). *Journal of Crustacean Biology* 20 (2): 157-169.

- Soares, A., Scapini, F., Brown, A. & McLachlan, A. 1999. Phenotypic plasticity, genetic similarity and evolutionary inertia in changing environments. *J Moll Stud* 65, 136-139.
- SPSS, Inc. 2007. SPSS for Windows. Version 16.0. Chicago: SPSS, Inc.
- Tack, J.F., Berghe, E. & Polk, Ph. 1992. Ecomorphology of *Crassostrea cucullata* (Born, 1778) (Ostreidae) in a mangrove creek (Gazi, Kenya). *Hydrobiologia* 247: 109-117.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.
- Tan, K.-S. & Liu, L.-L. 2001. Description of a new species of *Thais* (Mollusca: Neogastropoda: Muricidae) from Taiwan, based on morphological and allozyme analyses. *Zoological Science* 18: 1275-1289.
- Taylor, D. & Foighil, D. 2000. Transglobal comparisons of nuclear and mitochondrial genetic structure in a marine polyploid clam (*Lasaea*, Lasaeidae). *Heredity* 84: 321-330.
- Toro, J.E. 1996. Phenotypic response of a cohort of *Ostrea chilensis* (Philippi 1845) to differing environmental conditions in three oyster farms in southern Chile. *Aquaculture Research* 27: 1-7.
- Tucker, G.M. 1991. Apostatic selection by song thrushes (*Turdus philomelos*) feeding on the snail *Cepaea hortensis*. *Biological Journal of the Linnean Society* 43: 149-156.
- Vermeij, G.J. & Kool, S. 1994. Evolution of labral spines in Acanthais, New Genus, and other Rapanine muricid gastropods. *The Veliger* 37(4): 414-424.

- Vermeij, G.J. & Carlson, S.J. 2000. The Muricid gastropod subfamily Rapaninae: Phylogeny and ecological history. *Paleobiology* 26(1): 19-46.
- Weir, B.S. & Cockerham, C.C. 1984. Estimating F statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- West, J.M., Harvell, C.D. & Wall, A.M. 1993. Morphological plasticity in a gorgonian coral (*Briareum asbestinum*) over a depth cline. *Mar Ecol Prog Ser* 94: 61-69.
- Whitt, G.S. (1987) Species differences in isozyme tissue patterns: their utility for systematic and evolutionary analyses. In: Rattazzi, M., Scadalis, J., Whitt, G. (Eds) *Isozymes: Current Topics in Biological and Medical Research*, Bk. 10. Alan R. Liss, New York., pp 1-26.
- Yeh, F., Yang, R. & Boyle, T. 1999. POPGENE version 1.32. the User Friendly Software for Population Genetic Analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada.
- Zouros, E. & Foltz, D.W. 1987. The use of allelic isozyme variation for the study of heterosis. *Isozymes* 13:1-59.

ANEXOS

1. SISTEMAS DE BUFFER

a. Buffer de Homogenización

Buffer Tris-HCl pH 7.0

10 mM Trizma

Ajustar el pH = 7,0 utilizando 1M HCl

Luego agregar:

1% Tritón X-100

1% DMSO

5mM EDTA 0.1 M

Soluciones anexas:

0,05% NAD 10 mg/ml

0,5 mM PMSF

b. Buffers de Corrida

Buffer Tris – Glicina pH 8,7

Trizma

Glicina

Diluir 1:9 en agua destilada.

Ajustar a pH = 8,7 con 0,5 M NaOH

Buffer Tris – Maleato – EDTA Ph 7,6

0,1 M Trizma

0,1 M Ácido maleico

0,01 M EDTA

0,01 M Mg₂Cl

Ajustar pH = 7,6 con 2,0 M NaOH

2. SOLUCIONES STOCK PARA REVELADO

a. Buffers para el Revelado

Buffer de revelado “A”

0.09 M Trizma

Ajustar a pH = 8.0 con HCl 1M

Buffer de revelado “B”

0.2 M Trizma

Ajustar a pH = 8,0 con HCl 1M

Buffer de revelado “C”

0.09 M Trizma

Ajustar a pH = 7.0 con HCl 1M

b. Soluciones Stock

Malato

0.16 M Acido Maleico

0.20 M Buffer Tris – HCl 9.0

Ajustar a pH 8,0

Agar

4 g Agar bacterial grade

250 ml Agua bidestilada

Almacenar a 60 °C para su uso

Solución: β - nicotinamida adenine dinucleotido (NAD)

2 mg NAD

1 ml Agua bidestilada

Solución: Metosulfato de N-metilfenazina (PMS)

2 mg PMS

1 ml Agua bidestilada

Solución : Bromato de 3-(4,5-dimetiltiazol – 2 – il) 2,5 difenil tetrazolio

(MTT)

10 mg MTT

1 ml Agua bidestilada

2. VARIACIONES DEL pH EN EL BUFFER DE CORRIDA

En la elección del pH de un buffer a utilizarse en un sistema continuo para proteínas, se debe de considerar que el rango de pH sobre el cual las proteínas de interés son estables, para el mantenimiento de su actividad biológica y prevenir la disociación de la proteína nativa en sus subunidades. Dentro de este rango, la selección del pH del buffer de electroforesis a partir del punto isoeléctrico para ser separado aumenta la carga de las proteínas. Esto conduce a menores tiempos requeridos para la separación electroforética y reduce la dispersión de las bandas debido a su difusión. Por otro lado, el pH más cercano al punto isoeléctrico de la proteínas, conduce a una mejor diferencia de cargas entre las proteínas, incrementando la oportunidad de separación.

3. TINCIÓN ENZIMÁTICA

Existen diferentes métodos que permiten la localización de las proteínas en la matriz del gel separados por la electroforesis, como la tinción de proteínas totales con azul de comassie, tinción histoquímica, el uso de sustratos fluorescentes luego de la actividad enzimática, entre otros. El método utilizado de tinción por reacción enzima – sustrato por transferencia de electrones de colorantes: MMT (methyl thiazolyl tetrazolium) y 3 – amino – 9 ethyl carbozole. Las sales de tetrazolio son amarillas y solubles en un estado oxidado pero azul – morado e insoluble cuando está en estado reducido por una cadena de transferencia de electrones iniciada por la acción enzimática. Este método puede ser utilizado para casi todas las enzimas deshidrogenasas que reducen los cofactores NAD o NADP a NADH o NADPH. El electrón pasa al aceptor de

electrones PMS (Phenazine methosulphate) que espontáneamente reduce MTT a la forma de banda azul – púrpura.



FIGURA i. Lugar de colecta en la Playa Paita, Piura, Perú



FIGURA ii. Lugar de colecta en la Playa Atenas, Reserva Nacional de Paracas, Ica, Perú



FIGURA iii. Lugar de colecta en la Playa Lagunilla, Reserva Nacional de Paracas, Ica, Perú



FIGURA iv. Lugar de colecta en la Playa Mendieta, Reserva Nacional de Paracas, Ica, Perú

FIGURA V. Mapa de temperatura superficial del mar correspondiente a Marzo de las zonas norte (a), centro y sur (b) del año 2006; y de la zona norte (c), centro y sur (d) del año 2007.

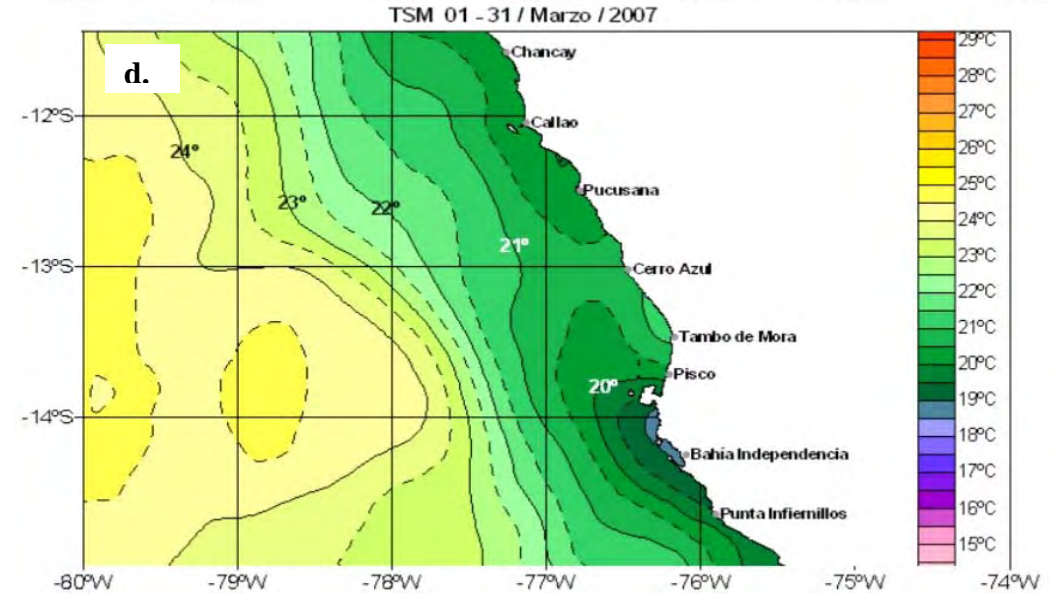
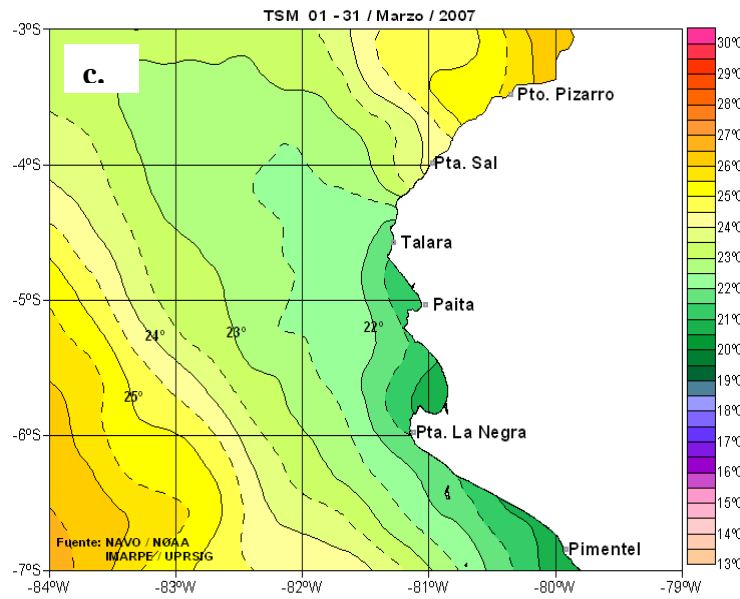
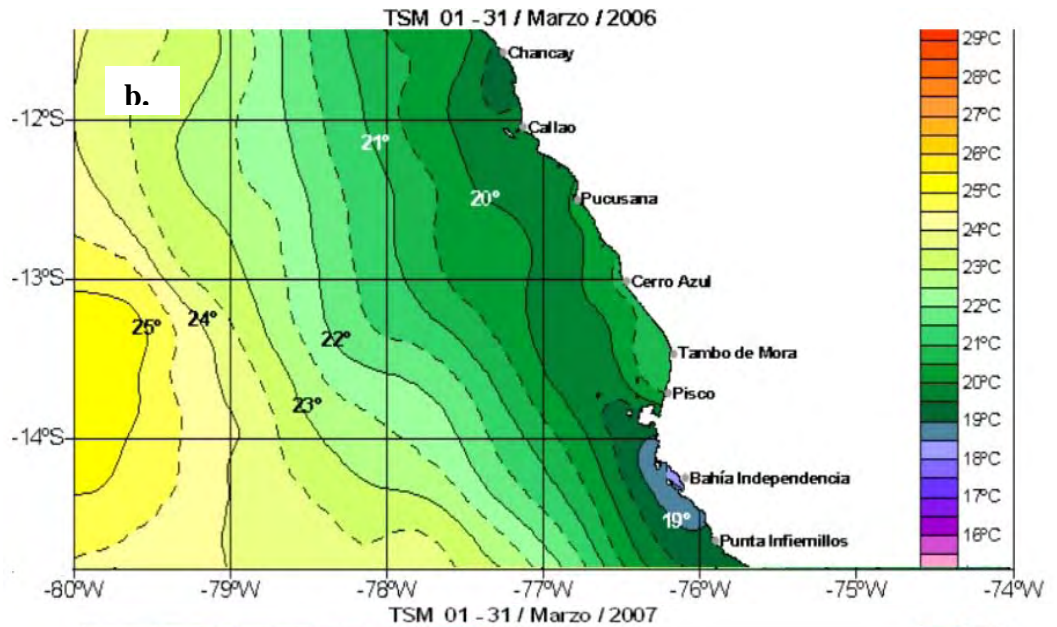
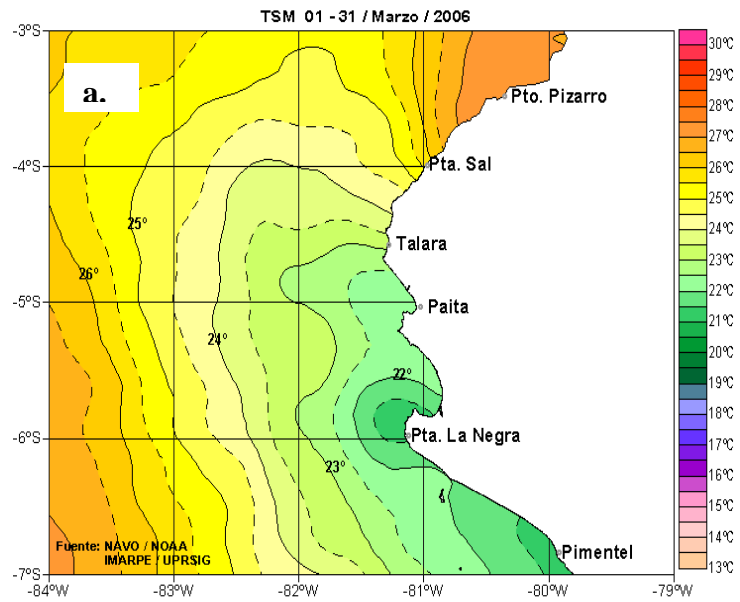


FIGURA VI. Mapa de temperatura superficial del mar correspondiente a setiembre de las zonas norte (a), centro y sur (b) del año 2006; y de la zona norte (c), centro y sur (d) del año 2007.

