

Análisis genético y morfométrico de *Chione californiensis* y *C. subimbricata* (Bivalvia: Veneridae) del Pacífico oriental mexicano y el Golfo de California

Genetic and morphometric analysis of *Chione californiensis* and *C. subimbricata* (Bivalvia: Veneridae) from the Mexican East Pacific and Gulf of California

A Licona-Chávez¹, F Correa-Sandoval^{1*}, J de la Rosa-Vélez², F Camarena-Rosales³

¹ Instituto de Investigaciones Oceanológicas, ² Facultad de Ciencias Marinas, ³ Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Baja California, Apartado postal 453, Ensenada, CP 22800, Baja California, México. * E-mail: correa@uabc.mx

Resumen

Con el objetivo de caracterizar genética y morfométricamente algunas poblaciones de *Chione californiensis* y *C. subimbricata* de las costas del Golfo de California y el Pacífico bajacaliforniano, se realizaron electroforesis de alozimas en 23 sistemas enzimáticos y análisis morfométricos con 14 caracteres de la valva izquierda. Los análisis alozímicos revelaron un grado de heterocigosidad mayor a 40% en todas las poblaciones y debido a que algunos loci se desviaron significativamente de la Ley de Hardy-Weinberg, se plantea que se encuentran en desequilibrio. El índice de fijación para las poblaciones de *C. californiensis* indicó poca estructuración genética ($F_{ST} = 0.045$, $Nm = 0.363$) debido a que el flujo genético está limitado por la ubicación y las condiciones geográficas de las localidades en donde se recolectaron las poblaciones estudiadas. La distancia genética de Nei agrupó a las dos poblaciones más sureñas de *C. californiensis* y corroboró la relación sistemática de esta especie respecto a *C. subimbricata*. El análisis morfométrico logró evidenciar diferencias intra e interpopulacionales, así como también la relación sistemática entre ambas especies. Se identificaron seis variables morfométricas que contribuyeron en mayor medida a esta diferenciación y se obtuvieron distancias morfométricas de Mahalanobis que reflejaron diferencias en la morfometría de las dos poblaciones de *C. californiensis* del Golfo de California y la población del Pacífico. Los resultados generados en ambos tipos de análisis respaldaron la agrupación de estas especies dentro del subgénero *Chione* propuesto por Keen (1971).

Palabras clave: *Chione*, bivalvos, genética, alozimas, morfometría.

Abstract

For the genetic and morphometric characterization of three populations of *Chione californiensis* and one of *C. subimbricata* from the Pacific Baja California and Gulf of California coastlines (Mexico), allozyme electrophoresis was performed in 23 enzymatic systems and 14 morphometric characters were analyzed. The allozymic analysis indicated a heterozygosity of more than 40% in all the populations and since some loci deviated significantly from the Hardy-Weinberg law, disequilibrium is proposed. The fixation index for the populations of *C. californiensis* showed little genetic structure ($F_{ST} = 0.045$, $Nm = 0.363$) because gene flow is limited by the location and geographic conditions of the sites from where they were collected. Nei's genetic distance grouped the two southernmost populations of *C. californiensis* and corroborated the systematic relationship of this species with *C. subimbricata*. The discriminant function analysis revealed intra- and interpopulation differences, as well as the systematic relationship between both species. Six morphometric variables were identified that contributed most to this differentiation and the Mahalanobis morphometric distances indicated differences in the morphometry of the two *C. californiensis* populations from the Gulf of California and the population from the Pacific. The results generated by both analyses support the inclusion of these species within the subgenus *Chione* proposed by Keen (1971).

Key words: *Chione*, bivalves, genetics, allozymes, morphometry.

Introducción

Los moluscos bivalvos del género *Chione* (Megerle von Mühlfeld 1811) pertenecen a la familia Veneridae (Rafinesque 1815). De acuerdo con Keen (1971), este género incluye seis subgéneros (*Chione s.s.*, *Chionista*, *Chionopsis*, *Ilioichione*, *Lirophora* y *Timoclea*) con 40 especies vivientes caracterizadas por tener escultura concéntrica, seno palial pequeño y el diente cardinal denticulado. La distribución actual de este género comprende aguas templadas y subtropicales del Atlántico

Introduction

Bivalve molluscs of the genus *Chione* (Megerle von Mühlfeld 1811) belong to the family Veneridae (Rafinesque 1815). According to Keen (1971), this genus is divided into six subgenera (*Chione s.s.*, *Chionista*, *Chionopsis*, *Ilioichione*, *Lirophora* and *Timoclea*) and includes 40 living species characterized by having a concentric sculpture, small pallial cavity and denticulate cardinal tooth. The current distribution of this genus comprises the temperate and subtropical waters of the

occidental, desde Carolina del Sur hasta Brasil, y del Pacífico oriental, desde el sur de California hasta Perú (Roopnarine 1996). El Pacífico americano cuenta con 25 especies, de las cuales 15 se distribuyen en las costas de la Península de Baja California (Keen 1971, Abbot 1974).

Las especies *Chione californiensis* (Broderip 1835) y *C. subimbricata* (Sowerby 1835) se clasifican dentro del subgénero *Chione* (Keen 1971), el cual agrupa a seis especies. *Chione californiensis* habita en zonas intermareales y se captura localmente para autoconsumo (García-Domínguez *et al.* 1991, Castro-Ortiz y García-Domínguez 1993) y a la fecha no existe regulación o ley ambiental que la proteja (Baqueiro 1989). *Chione subimbricata*, por el contrario, no es aprovechada para autoconsumo y hasta el momento no cuenta con estudios básicos acerca de su biología.

Los análisis genéticos de alozimas así como los biométricos de caracteres morfológicos son útiles para distinguir diferentes niveles taxonómicos como géneros, subgéneros, especies y poblaciones. Al utilizarlos en forma conjunta ofrecen una mejor aproximación a la sistemática de diferentes taxa (Richardson *et al.* 1986), además de que contribuyen a un mayor entendimiento de la diferenciación de las poblaciones y especies (Futuyma 1998, Avise 2005). Los estudios morfométricos además ayudan a identificar los caracteres distintivos de cada taxón (Reimchen *et al.* 1985, Wiens 2000), así como a establecer el grado de variación morfológica en función de la distribución geográfica tanto en peces (Reimchen *et al.* 1985, Camarena-Rosales 1999) como en bivalvos (Roopnarine 1995).

La presente investigación tuvo como objetivos la caracterización genética por medio del análisis electroforético de alozimas y la caracterización morfométrica de la concha por medio del análisis de funciones discriminantes en tres poblaciones de *C. californiensis* y una de *C. subimbricata* de la región sur de la Península de Baja California y el Golfo de California, México.

Material y métodos

Las almejas de las especies analizadas en este estudio fueron recolectadas vivas de acuerdo con la disponibilidad de ejemplares en cada zona de muestreo. La especie *C. californiensis* se recolectó en tres localidades del Golfo de California y la Península de Baja California: (1) Laguna Agiabampo, Sonora (26°21'17" N, 109°09'17" W); (2) Puerto San Carlos, Baja California Sur (24°47'42" N, 112°06'00" W); y (3) la Ensenada de La Paz, Baja California Sur (24°07'48" N, 110°25'12" W); se obtuvieron 24, 51 y 59 organismos, respectivamente, y estas poblaciones fueron designadas como 1, 2 y 3, respectivamente. De la especie *C. subimbricata* únicamente fueron recolectados 26 ejemplares en las playas de Melaque, Jalisco (19°13'20" N, 104°42'18" W), aun cuando se hicieron búsquedas en otras playas a lo largo del Golfo de California, desde las costas de Sonora hasta las de Jalisco en el

western Atlantic, from South Carolina to Brazil, and of the eastern Pacific, from California to Peru (Roopnarine 1996). The American Pacific has 25 species, of which 15 are distributed along the coasts of the Baja California Peninsula (Keen 1971, Abbot 1974).

The species *Chione californiensis* (Broderip 1835) and *C. subimbricata* (Sowerby 1835) are classified within the subgenus *Chione* (Keen 1971), which includes six species. *Chione californiensis* inhabits the intertidal zones and is captured locally for autoconsumption (García-Domínguez *et al.* 1991, Castro-Ortiz and García-Domínguez 1993), but to date there is no environmental law or regulation protecting it (Baqueiro 1989). *Chione subimbricata*, on the contrary, is not exploited for autoconsumption and basic biological studies have not been conducted on this species.

Genetic analyses of allozymes as well as biometric studies of morphological characteristics are useful for distinguishing different taxonomic levels, such as genera, subgenera, species and populations. When used together they offer a better approximation of the systematics of diverse taxa (Richardson *et al.* 1986), besides contributing to a better understanding of the differentiation of populations and species (Futuyma 1998, Avise 2005). Morphometric studies also help to identify the distinctive traits of each taxon (Reimchen *et al.* 1985, Wiens 2000), and to determine the degree of morphological variation in relation to the geographic distribution of fishes (Reimchen *et al.* 1985, Camarena-Rosales 1999) and bivalves (Roopnarine 1995).

The objective of this study was the genetic characterization, by electrophoretic analysis of allozymes, and the morphologic characterization of the shell, by discriminant function analysis, of three populations of *C. californiensis* and one of *C. subimbricata* from the southern region of the Baja California Peninsula and Gulf of California, Mexico.

Material and methods

Clams of the species analyzed herein were collected live according to the availability of specimens in each sampling location. *Chione californiensis* was collected at three sites along the Gulf of California and Baja California Peninsula: 24 organisms were caught at Agiabampo Lagoon, Sonora (26°21'17" N, 109°09'17" W); 51 at Puerto San Carlos, Baja California Sur (24°47'42" N, 112°06'00" W); and 59 at La Paz Bay, Baja California Sur (24°07'48" N, 110°25'12" W); these populations were called 1, 2 and 3, respectively. Despite searching for *C. subimbricata* the length of the Gulf of California, from the state of Sonora to the state of Jalisco in the Mexican Pacific, only 26 organisms were collected from the beaches of Melaque, Jalisco (19°13'20" N, 104°42'18" W); these specimens were designated population 4.

The specimens of both species were placed in ice chests at -5°C and transported by air and land to the Genetics and Molecular Biogeography Laboratory at the Autonomous University of Baja California in Ensenada, where they were frozen

Pacífico mexicano. Estos ejemplares fueron designados como población 4.

Los ejemplares de ambas especies fueron colocados en hieleras herméticas a -5°C y transportados por vía aérea y terrestre hasta el Laboratorio de Genética y Biogeografía Molecular de la Universidad Autónoma de Baja California, en Ensenada, BC; una vez en el laboratorio se congelaron a -80°C hasta su disección y posterior análisis genético y morfométrico.

Análisis electroforéticos

De cada organismo congelado se extrajeron la glándula digestiva y el músculo aductor y una fracción fue macerada con un homogenizador mecánico de tejidos en una solución amortiguadora (Tris-HCl 0.2 M, pH 8.0 y 2 mg mL⁻¹ de PMSF). El tejido homogenizado se centrifugó a 12,587 g durante 20 min a 4°C; se extrajo el sobrenadante y se almacenó en tubos Eppendorf de 2 mL a -80°C hasta la electroforesis. Las valvas de cada organismo fueron rotuladas, fotografiadas y almacenadas para su posterior análisis morfométrico.

Los homogenizados de los individuos se analizaron en electroforesis horizontal en geles de almidón al 10% (Sigma) utilizando la metodología descrita por de la Rosa-Vélez (1986) y Correa *et al.* (2004). Se utilizaron los procedimientos de tinción histoquímica descritos por Abreu-Grobois (1983), de la Rosa-Vélez (1986), May (1992), Licona-Chávez (1999) y Correa *et al.* (2004) para analizar un total de 23 sistemas enzimáticos, de los cuales se obtuvieron resultados reproducibles en 13 sistemas enzimáticos: malato deshidrogenasa (MDH, EC 1.1.1.37), enzima málica (ME, EC 1.1.1.40), isocitrato deshidrogenasa (IDH, EC 1.1.1.42), glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa (G6PDH, EC 1.1.1.49), superóxido-dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1), hexokinasa (HK, EC 2.7.1.1), carboxilesterasas (EST, EC 3.1.1.-), carboxilesterasas-D (EST-D, EC 3.1.1.1), fosfatasa alcalina (ALP, EC 3.1.3.1), leucil-aminopeptidasa (LAP, EC 3.4.11.1), manosa-6-fosfato isomerasa (MPI, EC 5.3.1.8), fosfoglucoisomerasa (PGI, EC 5.3.1.9) y fosfoglucomutasa (PGM, EC 5.4.2.2). Con estos sistemas enzimáticos se obtuvieron un total de 21 loci.

Para determinar con mayor precisión la posición de cada locus y sus alelos respectivos, en cada gel se alternaron homogenizados de cinco organismos de cada una de las poblaciones hasta completar el número total de organismos recolectados de cada población. De esta manera todas las poblaciones estuvieron representadas en un mismo gel y se evitaron posibles sesgos en la interpretación de los zimogramas. Se utilizó la designación alélica A, B, C y así sucesivamente, siendo el alelo A el que alcanzó la distancia mayor desde el origen (Swofford y Selander 1989); para sistemas con más de un locus, éstos se enumeraron en orden ascendente, desde los más anódicos hasta los más catódicos. Los alelos cuya frecuencia fue menor a 0.01 fueron considerados como raros (de la Rosa-Vélez 1986).

Para cada población se calcularon las frecuencias alélicas, el ajuste a la Ley de Hardy-Weinberg por medio de una prueba de χ^2 , deficiencia o exceso de heterocigotos (*D*). La

at -80°C until their dissection and genetic and morphometric analyses.

Electrophoretic analysis

The digestive gland and adductor muscle were removed from each frozen organism and a fraction of the tissue was ground in a mechanical homogenizer in a buffer solution (Tris-HCl 0.2 M, pH 8.0 and 2 mg mL⁻¹ of PMSF). The homogenized tissue was centrifuged at 12,587 g for 20 min at 4°C, and the supernatant was extracted and stored in 2-mL Eppendorf tubes at -80°C until used in electrophoresis. The valves of each organism were labeled, photographed and stored for subsequent morphometric analysis.

The homogenates were analyzed by horizontal starch-gel (10%, Sigma) electrophoresis, following the methodology described by de la Rosa-Vélez (1986) and Correa *et al.* (2004). The histochemical staining procedures described by Abreu-Grobois (1983), de la Rosa-Vélez (1986), May (1992), Licona-Chávez (1999) and Correa *et al.* (2004) were used to analyze a total of 23 enzymatic systems, obtaining reproducible results for 13 of them: malate dehydrogenase (MDH, EC 1.1.1.37); malic enzyme (ME, EC 1.1.1.40); isocitrate dehydrogenase (IDH, EC 1.1.1.42); glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase (G6PDH, EC 1.1.1.49); superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1); hexokinase (HK, EC 2.7.1.1); carboxylesterases (EST, EC 3.1.1.-); carboxylesterases-D (EST-D, EC 3.1.1.1); alkaline phosphatase (ALP, EC 3.1.3.1); leucil aminopeptidase (LAP, EC 3.4.11.1); manose-6-phosphate isomerase (MPI, EC 5.3.1.8); phosphoglucose isomerase (PGI, EC 5.3.1.9); and phosphoglucomutase (PGM, EC 5.4.2.2). A total of 21 loci were obtained with these enzymatic systems.

To determine with greater precision the position of each locus and its respective alleles, homogenates of five organisms of each one of the populations were alternated in each gel until completing the total number of organisms collected from each population. In this way, all the populations were represented in a same gel, thus preventing possible biases in the interpretation of the zymograms. The allelic designation A, B, C, etc. was used; allele A was the one that moved the greatest distance from the origin (Swofford and Selander 1989). When systems had more than one locus, they were numbered in ascending order, from the most anodic to the most cathodic. Alleles whose frequency was less than 0.01 were considered rare (de la Rosa-Vélez 1986).

For each population, the allelic frequencies, goodness-of-fit to the Hardy-Weinberg law using the χ^2 test, and heterozygote deficiency or excess (*D*) were estimated. The expected heterozygosity and genetic distance were calculated for small sample sizes according to Levene (1949) and Nei (1978), respectively. Wright's *F* statistics (F_{IT} , F_{ST} and F_{IS}) were calculated intra- and interspecifically following Weir and Cockerham (1984), and the jackknife and bootstrap procedures were applied to estimate their variance and 95% confidence intervals, respectively. To determine the significance of the *F*

heterocigosidad esperada y la distancia genética se calcularon para tamaños de muestra pequeños de acuerdo con Levene (1949) y Nei (1978), respectivamente. Se calcularon los estadígrafos F de Wright (F_{IT} , F_{ST} y F_{IS}) según el método de Weir y Cockerham (1984) intra e interespecíficamente, así como su varianza utilizando el procedimiento *jackknife* y la estimación de sus intervalos de confianza al 95% mediante *bootstrap*. Para obtener la significancia de los estadígrafos F , se tomaron en cuenta los errores estándar de la media estimada mediante el procedimiento *jackknife* para todos los loci y los límites de confianza al 95% basados en el análisis *bootstrap* para todos los loci (Weir 1996, Ayre y Hughes 2000, Zúñiga *et al.* 2000). Se estimó el número de migrantes (N_m) de acuerdo con Barton y Slatkin (1986).

Para los cálculos anteriormente mencionados se utilizaron diferentes paquetes de cómputo como Biosys-1 (Swofford y Selander 1989), TFGA v1.3 (Miller 1997) y FSTAT v2.8 (Goudet 1999). Cuando se realizaron pruebas múltiples se aplicó la corrección de Bonferroni de acuerdo con el método de Dunn-Šidák: $[\alpha'' = (1 - (1 - 0.05)1/k)]$, donde k es el número de pruebas (Sokal y Rohlf 1995).

Análisis morfométrico

Después de la disección se determinó el peso fresco en gramos del músculo aductor para cada organismo y mediante un vernier digital (± 0.01 mm) se midió el ancho de ambas valvas así como el largo y la altura de la valva izquierda, de acuerdo con lo sugerido por Roopnarine (1995). Además de estas medidas se realizaron 11 mediciones morfométricas más, también expresadas en milímetros, asociadas a cambios en la forma de las valvas así como a la orientación de la charnela y a la cicatriz del músculo aductor (fig. 1).

Se calcularon las medidas de tendencia central y de dispersión con el paquete Statistica v6 (StatSoft 2002) y posteriormente los datos fueron estandarizados con el largo de la concha para reducir el sesgo de la diferencia de tallas de acuerdo con el método utilizado por Reimchen *et al.* (1985). Las mediciones estandarizadas utilizadas en los subsecuentes análisis estadísticos fueron: músculo (M), alto (H), ancho (W), AB, AC, AD, CD, DG, EF, EG, FH, GH, GI y HI (fig. 1).

Se realizó la prueba estándar por pasos del análisis de funciones discriminantes (AFD) con el paquete Statistica v6 (StatSoft 2002) para identificar los caracteres morfométricos de mayor importancia en la discriminación de los taxa. En un primer AFD se incluyeron las tres poblaciones de *C. californiensis*. Posteriormente se realizó un segundo AFD en el que además de estas tres poblaciones se incluyó la población de *C. subimbricata*. Estos AFD se realizaron con la finalidad de determinar la posible variación morfométrica a nivel intra e interpoblacional. Se determinó la separación de los grupos con base en el cálculo de las distancias cuadradas de Mahalanobis (D^2) la cual se graficó y se comparó con la gráfica obtenida de la distancia genética de Nei (1978).

statistics, we considered the standard errors of the mean estimated using the jackknife procedure for all the loci and the 95% confidence limits based on the bootstrap analysis for all the loci (Weir 1996, Ayre and Hughes 2000, Zúñiga *et al.* 2000). The number of migrants (N_m) was estimated according to Barton and Slatkin (1986).

Different computing packages were used for the above calculations, including Biosys-1 (Swofford and Selander 1989), TFGA v1.3 (Miller 1997) and FSTAT v2.8 (Goudet 1999). When multiple tests were conducted, a Bonferroni correction was applied following the Dunn-Šidák method: $[\alpha'' = (1 - (1 - 0.05)1/k)]$, where k is the number of tests (Sokal and Rohlf 1995).

Morphometric analysis

After dissection, the wet weight (in grams) of the adductor muscle was determined for each organism and a digital vernier



Figura 1. Valva izquierda de *Chione* indicando las estructuras consideradas para las medidas morfométricas (tomado de Roopnarine 1995). A = umbo, B = margen terminal ventral de la lúnula, C = extremo anterior del diente cardinal anterior, D = extremo posterior del diente cardinal posterior, E = unión dorsal de la cicatriz del músculo anterior con la cavidad pallial, F = unión ventral de la cicatriz del músculo anterior con la línea pallial, G = unión dorsal de la cicatriz del músculo posterior con la cavidad pallial, H = unión ventral de la cicatriz del músculo posterior con la línea pallial, I = extremo ventral terminal del estuche. Las medidas morfométricas analizadas fueron: AB, AC, AD, CD, DG, EF, EG, FH, GH, GI y HI.

Figure 1. Left valve of *Chione* showing the structures considered for the morphometric distance measurements (taken from Roopnarine 1995). A = umbo, B = ventral terminal of lunule, C = anterior end of anterior cardinal tooth, D = posterior end of posterior cardinal tooth, E = dorsal union of the anterior muscle scar with the pallial cavity, F = ventral union of the anterior muscle scar with the pallial line, G = dorsal union of the posterior muscle scar with the pallial cavity, H = ventral union of the posterior muscle scar with the pallial line, I = ventral terminal of escutcheon. Morphometric distances were: AB, AC, AD, CD, DG, EF, EG, FH, GH, GI and HI.

Resultados

Análisis genético

Las frecuencias alélicas de los 21 loci obtenidos para las cuatro poblaciones de *Chione* sp. se presentan en la tabla 1. En estos resultados se pudo observar un patrón similar en los loci *Alp-1*, *Idh-1*, *Pgm-1*, *Pgm-2*, *Pgm-3* y *6Pgdh*, ya que en algunas poblaciones los zimogramas sí mostraron bandas aunque en un número reducido de organismos, mientras que en el resto de las poblaciones de estos mismos loci no se observó actividad de tinción.

La mayoría de los loci mostraron una composición alélica similar en las tres poblaciones de *C. californiensis* a excepción de *Mdh* ya que en la población 1 solamente se encontraron los alelos *Mdh^B* y *Mdh^C*, mientras que la población 2 presentó los alelos *Mdh^A*, *Mdh^B*, *Mdh^C* y *Mdh^D* y la población 3 mostró los alelos *Mdh^C* y *Mdh^D*. Para *C. subimbricata* en este locus se obtuvieron únicamente los alelos *Mdh^C* y *Mdh^D* (tabla 1).

Entre las poblaciones de *C. californiensis* se observaron diferencias en el alelo más frecuente, por ejemplo en el locus *Alp-1* los alelos más frecuentes en las poblaciones 2 y 3 fueron *Alp-1^B* y *Alp-1^A*, respectivamente. También en el locus *Est-D* el alelo más frecuente fue *Est-D^A* en las poblaciones 1 y 3, mientras que el alelo *Est-D^B* fue más común en la población 2. En los loci *Idh-2*, *Lap-2*, *Mdh*, *Mpi*, *Pgi* y *Sod-1* se obtuvieron resultados similares (tabla 1).

En *C. subimbricata* el alelo más frecuente en el locus *Sod-1* fue superior a 0.9 mientras que en *C. californiensis* su frecuencia no fue mayor a 0.522. También se observó que *Alp*, *Hk*, *Idh-1*, *Lap*, *Mpi* y *Pgm* no revelaron para ningún individuo de *C. subimbricata* mientras que si lo hicieron para la especie *C. californiensis* (tabla 1).

En las cuatro poblaciones de *Chione* sp. los valores de heterocigosidad observados (H_o) fueron similares y no mostraron diferencias mediante una prueba *t* de Student ($P = 0.96$). La menor heterocigosidad (0.435) se registró en la población 4, mientras que la mayor (0.443) ocurrió en la población 2. En todas las poblaciones los valores de heterocigosidad esperada (H_e) fueron mayores a los de la observada y no se encontraron diferencias significativas al aplicar una prueba *t* de Student ($P = 0.745$, $P = 0.577$, $P = 0.7$ y $P = 0.757$ en las poblaciones 1, 2, 3 y 4, respectivamente) (tabla 1).

Los valores de F_{IS} por población mostraron que en la 1 predominó un exceso de heterocigotos, mientras que las tres poblaciones restantes presentaron una deficiencia de heterocigotos (tabla 1).

De 18 loci que revelaron para la población 1, 17 fueron polimórficos y de éstos, 5 se desviaron de la ley de Hardy-Weinberg (H-W) (27.77%); en la población 2 se obtuvieron 21 loci polimórficos de los cuales 3 presentaron desviación de H-W (14.28%); en la población 3, de 18 loci polimórficos 7 mostraron desviación de H-W (38.88%) y en la población 4, de 9 loci polimórficos, 1 presentó desviación de H-W (11.11%) (tablas 1, 2).

caliper (± 0.01 mm) was used to measure the width of both valves, as well as the length and height of the left valve, according to that suggested by Roopnarine (1995). Eleven other morphometric measurements were also made (expressed in millimeters) with regard to changes in the shape of the valves, the orientation of the hinge and the adductor muscle scar (fig. 1).

The measures of central tendency and dispersion were calculated using the Statistica v6 package (StatSoft 2002) and the data were then standardized by the shell length to reduce the bias of the difference in sizes according to the method used by Reimchen *et al.* (1985). The standardized measurements used in the subsequent statistical analyses were: muscle (M), height (H), width (W), AB, AC, AD, CD, DG, EF, EG, FH, GH, GI and HI (fig. 1).

A stepwise discriminant function analysis (DFA) was carried out using Statistica v6 (StatSoft 2002) to identify the most important morphometric characteristics in the discrimination of the taxa. The first DFA included the three populations of *C. californiensis*, whereas the second included these three populations and the population of *C. subimbricata*. These DFA were made in order to determine the possible intra- and inter-population morphometric variation. The separation of the groups was determined by calculating the Mahalanobis square distances (D^2), and the plot was compared with the graph obtained based on Nei's (1978) genetic distance (D).

Results

Genetic analysis

The allelic frequencies of the 21 loci obtained for the four populations of *Chione* sp. are given in table 1. A similar pattern can be observed for *Alp-1*, *Idh-1*, *Pgm-1*, *Pgm-2*, *Pgm-3* and *6Pgdh*, since in some populations the zymograms did show bands, albeit in a small number of organisms, while staining activity was not detected in the rest of the populations of these same loci.

Most of the loci presented a similar allelic composition in the three populations of *C. californiensis*. The exception was *Mdh*, since only the *Mdh^B* and *Mdh^C* alleles were found in population 1, while *Mdh^A*, *Mdh^B*, *Mdh^C* and *Mdh^D* were found in population 2, and *Mdh^C* and *Mdh^D* in population 3. In the population of *C. subimbricata*, only the *Mdh^C* and *Mdh^D* alleles were obtained (table 1).

Among the populations of *C. californiensis*, differences were observed in relation to the most frequent allele. For example, in the case of locus *Alp-1*, the most frequent alleles in populations 2 and 3 were *Alp-1^B* and *Alp-1^A*, respectively. In the case of locus *Est-D*, the most frequent allele was *Est-D^A* in populations 1 and 3, while allele *Est-D^B* was the most common in population 2. Similar results were obtained for loci *Idh-2*, *Lap-2*, *Mdh*, *Mpi*, *Pgi* and *Sod-1* (table 1).

For *C. subimbricata*, the most frequent allele of locus *Sod-1* was greater than 0.9, whereas for *C. californiensis* its

Tabla 1. Frecuencias alélicas para *Chione californiensis* y *C. subimbricata*. Población 1 = Laguna Agiabampo, 2 = Puerto San Carlos, 3 = La Paz y 4 = Melaque; *n* = número total de organismos analizados. No. = número de individuos con tinción positiva para el locus, *D* = deficiencia (-) o exceso (+) de heterocigotos, * = coeficientes *D* significativos, ** = F_{IS} significativo.

Table 1. Allelic frequencies for *Chione californiensis* and *C. subimbricata*. Population 1 = Laguna Agiabampo, 2 = Puerto San Carlos, 3 = La Paz and 4 = Melaque; *n* = total number of organisms analyzed. No. = number of individuals with positive staining for the locus, *D* = deficiency (-) or excess (+) of heterozygotes, * = significant *D* coefficients, ** = significant F_{IS} .

Locus	Allele	<i>Chione californiensis</i>			<i>Chione subimbricata</i>
		Population 1 <i>n</i> = 24	Population 2 <i>n</i> = 51	Population 3 <i>n</i> = 59	Population 4 <i>n</i> = 26
<i>Alp-1</i>	No.		6	6	
	A		0.417	0.583	
	B		0.583	0.417	
	<i>D</i>		-0.057	-0.057	
<i>Alp-2</i>	No.	4	17	11	
	A	0.250	0.412	0.273	
	B	0.750	0.588	0.727	
	<i>D</i>	0.167	-0.057	0.312	
<i>Alp-3</i>	No.	24	38	26	
	A	0.500	0.487	0.519	
	B	0.500	0.513	0.481	
	<i>D</i>	0.142	0.299	0.436	
<i>Est-2</i>	No.	22	45	50	24
	A	0.545	0.644	0.510	0.438
	B	0.455	0.356	0.490	0.563
	<i>D</i>	-0.104	-0.041	-0.327	-0.254
<i>Est-3</i>	No.	22	49	58	26
	A	0.477	0.480	0.431	0.346
	B	0.523	0.520	0.569	0.654
	<i>D</i>	0.870*	0.821*	0.742*	0.333
<i>Est-D</i>	No.	13	19	20	7
	A	0.615	0.447	0.725	0.357
	B	0.385	0.553	0.275	0.643
	<i>D</i>	-0.063	-0.482	-0.633	-0.133
<i>Hk</i>	No.	17	21	37	
	A	0.059	0.048	0.284	
	B	0.618	0.857	0.554	
	<i>D</i>	-0.441	0.098	-0.409*	
<i>Idh-1</i>	No.		7	4	
	A		0.286	0.375	
	B		0.714	0.625	
	<i>D</i>		0.4274	0.2301	
<i>Idh-2</i>	No.	17	25	47	26
	A	0.559	0.180	0.383	0.654
	B	0.441	0.820	0.617	0.346
	<i>D</i>	-0.653	-0.070	-0.555*	0.167

(Cont.)

Locus	Allele	<i>Chione californiensis</i>			<i>Chione subimbricata</i>
		Population 1 <i>n</i> = 24	Population 2 <i>n</i> = 51	Population 3 <i>n</i> = 59	Population 4 <i>n</i> = 26
<i>Lap-1</i>	No.	24	49	54	
	A	0.458	0.347	0.500	
	B	0.542	0.653	0.500	
	D	0.643*	-0.108	0.394	
<i>Lap-2</i>	No.	24	49	58	
	A	0.542	0.449	0.612	
	B	0.458	0.551	0.388	
	D	0.808*	-0.184	-0.676*	
<i>Mdh</i>	No.	23	31	35	4
	A		0.016		
	B	0.435	0.226		
	C	0.565	0.484	0.414	0.500
	D		0.274	0.586	0.500
	D	0.038	0.042	0.219	0.750
<i>Me</i>	No.	16	40	48	17
	A		0.250		0.412
	B		0.400	0.833	0.294
	C	0.563	0.325	0.083	0.235
	D	0.438	0.025	0.083	0.059
	D	-1.000*	-1.000*	-1.000*	-1.000*
<i>Mpi</i>	No.	11	21	25	
	A	0.409	0.500	0.660	
	B	0.591	0.500	0.340	
	D	0.256	-0.349	-0.563	
<i>Pgi</i>	No.	20	47	53	10
	A	0.550	0.383	0.283	0.200
	B	0.450	0.617	0.717	0.800
	D	0.379	0.247	-0.171	0.187
<i>Pgm-1</i>	No.		2		
	A		0.250		
	B		0.750		
	D		0.000		
<i>Pgm-2</i>	No.	16	5		
	A	0.344	0.200		
	B	0.656	0.800		
	D	0.208	-1.000		
<i>Pgm-3</i>	No.	14	9		
	A	0.893	0.889		
	B	0.107	0.111		
	D	0.080	0.062		
<i>Sod-1</i>	No.	24	35	59	17
	A	0.521	0.414	0.517	0.088
	B	0.479	0.586	0.483	0.912
	D	-0.755*	-0.478	-0.428*	0.065

(Cont.)

Locus	Allele	<i>Chione californiensis</i>			<i>Chione subimbricata</i>
		Population 1 <i>n</i> = 24	Population 2 <i>n</i> = 51	Population 3 <i>n</i> = 59	Population 4 <i>n</i> = 26
<i>Sod-2</i>	No.	6	24	52	13
	A	1.000	0.792	0.962	0.731
	B		0.208	0.038	0.269
	<i>D</i>		-0.753*	-1.000*	-0.060
<i>6Pgdh</i>	No.	22	5	5	
	C	0.455	0.400	0.400	
	D	0.545	0.600	0.600	
	<i>D</i>	-0.283	0.500	-0.250	
<i>n</i> per locus	17.7	25.9	36.0	16.0	
Standard error	1.5	3.6	4.7	2.7	
Observed heterozygosity (Ho)	0.441	0.443	0.442	0.435	
Standard error	0.031	0.025	0.026	0.047	
Expected heterozygosity (He)	0.456	0.463	0.457	0.457	
Standard error	0.032	0.025	0.027	0.050	
F_{IS}	-0.012	0.141**	0.132	0.035	
Jackknife F_{IS}	-0.012	0.136	0.131	0.049	
Standard deviation	0.139	0.111	0.116	0.251	

En todas las poblaciones de *C. californiensis* el locus *Est-3* se desvió de la ley de H-W debido a un exceso de heterocigotos (*D*+), y, por el contrario, el locus *Me* se desvió de dicha ley al registrar una deficiencia de heterocigotos (*D*-) en ambas especies de *Chione* (tabla 1).

La prueba de comparación de genotipos mostró diferencias en los loci *Mdh* y *Me* entre todas las poblaciones de *C. californiensis*. Estas diferencias consistieron en que en el locus *Mdh* la población 1 mostró los genotipos BB, BC y CC, mientras que en la población 3 se observaron los genotipos CC, CD y DD. En este mismo locus la población 2 tuvo la mayor diversidad genotípica (AB, BB, BC, CC, CD y DD). En el locus *Me* la población 1 presentó el menor número de genotipos (CC y DD), la población 3 mostró tres genotipos (BB, CC y DD). Finalmente, la población 2 mostró cuatro genotipos (AA, BB, CC y DD) con la presencia de un genotipo (AA) exclusivo de esta población (tabla 2).

La prueba de diferenciación alélica determinada mediante las pruebas exactas (Raymond y Rousset 1995) entre las tres poblaciones de *C. californiensis*, reveló diferencias en la composición alélica de los loci *Mdh* y *Me*. En los loci *Hk* y *Sod-2* la diferenciación ocurrió entre las poblaciones 2 y 3, en *Idh-2* entre las poblaciones 1 y 2, y en *Pgi-1* entre las poblaciones 1 y 3 (tabla 3).

En relación con la distancia *D* de Nei, las poblaciones 2 y 3 formaron una agrupación cuya distancia fue de 0.040 (fig. 2a) y entre éstas y la población 1, *D* fue de 0.075. La distancia genética entre las dos especies fue 0.65.

frequency was not greater than 0.522. Moreover, *Alp*, *Hk*, *Idh-1*, *Lap*, *Mpi* and *Pgm* did not stain for any individual of *C. subimbricata*, but they did do so for *C. californiensis* (table 1).

The observed heterozygosity (Ho) values were similar for the four populations of *Chione* sp. and differences were not detected when Student's *t*-test was applied ($P = 0.96$). The lowest heterozygosity (0.435) was recorded for population 4 and the highest (0.443) for population 2. The expected heterozygosity (He) values for all the populations were higher than those of observed heterozygosity and Student's *t*-test did not show significant differences ($P = 0.745$, $P = 0.577$, $P = 0.7$ and $P = 0.757$ for populations 1, 2, 3 and 4, respectively) (table 1).

The F_{IS} values obtained revealed that population 1 had an excess of heterozygotes, while the other three populations showed a deficiency of heterozygotes (table 1).

Of the 18 loci that were obtained for population 1, 17 were polymorphic and of these, 5 (27.77%) deviated from the Hardy-Weinberg (H-W) law. In population 2, 21 (14.28%) polymorphic loci were obtained, of which 3 showed H-W deviation. In population 3, 18 loci were polymorphic, 7 (38.88%) of which showed H-W deviation, and in population 4, only 1 (11.11%) of the 9 polymorphic loci showed H-W deviation (tables 1, 2).

In all the populations of *C. californiensis* the locus *Est-3* deviated from the H-W law due to an excess of heterozygotes (*D*+). Conversely, the locus *Me* showed H-W deviation because of heterozygote deficiency (*D*-) in both species of *Chione* (table 1).

Tabla 2. Genotipos observados y esperados de acuerdo con la Ley de Hardy-Weinberg y valores de probabilidad obtenidos mediante la prueba de chi-cuadrada para las poblaciones de *Chione*; d.f.= grados de libertad, * = significativo después de la corrección de Bonferroni.
Table 2. Observed and expected genotype frequencies according to the Hardy-Weinberg law and probability values obtained using the chi-square test for *Chione* populations; d.f. = degrees of freedom, * = significant after Bonferroni correction.

Locus	Genotype	Observed frequency	Expected frequency	χ^2	d.f.	<i>P</i>
(a) Population 1						
<i>Alp-2</i>	A-A	0	0.143	0.444	1	0.505
	A-B	2	1.714			
	B-B	2	2.143			
<i>Alp-3</i>	A-A	5	5.872	0.667	1	0.414
	A-B	14	12.255			
	B-B	5	5.872			
<i>Est-2</i>	A-A	7	6.419	0.153	1	0.696
	A-B	10	11.163			
	B-B	5	4.419			
<i>Est-3</i>	A-A	0	4.884	18.340	1	<0.001*
	A-B	21	11.233			
	B-B	1	5.884			
<i>Est-D</i>	A-A	5	4.800	0.008	1	0.928
	A-B	6	6.400			
	B-B	2	1.800			
<i>Hk</i>	A-A	0	0.030	6.423	3	0.093
	A-B	2	1.273			
	A-C	0	0.667			
	B-B	8	6.364			
	B-C	3	7.000			
	C-C	4	1.667			
<i>Idh-2</i>	A-A	8	5.182	7.009	1	0.008
	A-B	3	8.636			
	B-B	6	3.182			
<i>Lap-1</i>	A-A	1	4.915	11.043	1	<0.001*
	A-B	20	12.170			
	B-B	3	6.915			
<i>Lap-2</i>	A-A	2	6.915	17.183	1	<0.001*
	A-B	22	12.170			
	B-B	0	4.915			
<i>Mdh</i>	B-B	4	4.222	0.087	1	0.768
	B-C	12	11.556			
	C-C	7	7.222			
<i>Me</i>	C-C	9	4.935	16.000	1	<0.001*
	C-D	0	8.129			
	D-D	7	2.935			

(Cont.)

Locus	Genotype	Observed frequency	Expected frequency	χ^2	d.f.	<i>P</i>
<i>Mpi</i>	A-A	1	1.714	1.100	1	0.294
	A-B	7	5.571			
	B-B	3	3.714			
<i>Pgi-1</i>	A-A	4	5.923	3.430	1	0.064
	A-B	14	10.154			
	B-B	2	3.923			
<i>Pgm-2</i>	A-A	1	1.774	0.974	1	0.324
	A-B	9	7.452			
	B-B	6	6.774			
<i>Pgm-3</i>	A-A	11	11.111	0.202	1	0.653
	A-B	3	2.778			
	B-B	0	0.111			
<i>Sod-1</i>	A-A	11	6.383	13.484	1	<0.001*
	A-B	3	12.234			
	B-B	10	5.383			
<i>6Pgdh</i>	C-C	6	4.419	1.564	1	0.211
	C-D	8	11.163			
	D-D	8	6.419			
(b) Population 2						
<i>Alp-1</i>	A-A	1	0.909	0.005	1	0.944
	A-B	3	3.182			
	B-B	2	1.909			
<i>Alp-2</i>	A-A	3	2.758	0.014	1	0.906
	A-B	8	8.485			
	B-B	6	5.758			
<i>Alp-3</i>	A-A	6	8.880	3.81	1	0.051
	A-B	25	19.240			
	B-B	7	9.880			
<i>Est-2</i>	A-A	19	18.573	0.041	1	0.840
	A-B	20	20.854			
	B-B	6	5.573			
<i>Est-3</i>	A-A	1	11.144	34.558	1	<0.001*
	A-B	45	24.711			
	B-B	3	13.144			
<i>Est-D</i>	A-A	6	3.676	4.158	1	0.041
	A-B	5	9.649			
	B-B	8	5.676			

(Cont.)

Locus	Genotype	Observed frequency	Expected frequency	χ^2	d.f.	<i>P</i>
<i>Hk</i>	A-A	0	0.024	0.583	3	0.900
	A-B	2	1.756			
	A-C	0	0.195			
	B-B	15	15.366			
	B-C	4	3.512			
	C-C	0	0.146			
<i>Idh-1</i>	A-A	1	0.462	0.630	1	0.427
	A-B	2	3.077			
	B-B	4	3.462			
<i>Idh-2</i>	A-A	1	0.735	0.066	1	0.797
	A-B	7	7.531			
	B-B	17	16.735			
<i>Lap-1</i>	A-A	7	5.784	0.483	1	0.487
	A-B	20	22.433			
	B-B	22	20.784			
<i>Lap-2</i>	A-A	12	9.753	1.502	1	0.220
	A-B	20	24.495			
	B-B	17	14.753			
<i>Mdh</i>	A-A	0	0.000	18.468	6	0.005
	A-B	1	0.230			
	A-C	0	0.492			
	A-D	0	0.279			
	B-B	4	1.492			
	B-C	5	6.885			
	B-D	0	3.902			
	C-C	5	7.131			
	C-D	15	8.361			
	D-D	1	2.230			
<i>Me</i>	A-A	10	2.405	120.000	6	<0.001*
	A-B	0	8.101			
	A-C	0	6.582			
	A-D	0	0.506			
	B-B	16	6.278			
	B-C	0	10.532			
	B-D	0	0.810			
	C-C	13	4.114			
	C-D	0	0.658			
	D-D	1	0.013			
<i>Mpi</i>	A-A	7	5.122	2.333	1	0.127
	A-B	7	10.756			
	B-B	7	5.122			
<i>Pgi-1</i>	A-A	4	6.774	3.190	1	0.074
	A-B	28	22.452			
	B-B	15	17.774			

(Cont.)

Locus	Genotype	Observed frequency	Expected frequency	χ^2	d.f.	<i>P</i>
<i>Pgm-1</i>	A-A	0	0.000	0.222	1	0.637
	A-B	1	1.000			
	B-B	1	1.000			
<i>Pgm-2</i>	A-A	1	0.111	5.000	1	0.025
	A-B	0	1.778			
	B-B	4	3.111			
<i>Pgm-3</i>	A-A	7	7.059	0.141	1	0.708
	A-B	2	1.882			
	B-B	0	0.059			
<i>Sod-1</i>	A-A	10	5.884	7.736	1	0.005
	A-B	9	17.232			
	B-B	16	11.884			
<i>Sod-2</i>	A-A	18	14.957	13.405	1	<0.001*
	A-B	2	8.085			
	B-B	4	0.957			
<i>6Pgdh</i>	C-C	0	0.667	2.222	1	0.136
	C-D	4	2.667			
	D-D	1	1.667			
(c) Population 3						
<i>Alp-1</i>	A-A	2	1.909	0.005	1	0.944
	A-B	3	3.182			
	B-B	1	0.909			
<i>Alp-2</i>	A-A	0	0.714	1.547	1	0.214
	A-B	6	4.571			
	B-B	5	5.714			
<i>Alp-3</i>	A-A	4	6.882	5.5905	1	0.018
	A-B	19	13.235			
	B-B	3	5.882			
<i>Est-2</i>	A-A	17	12.879	5.111	1	0.024
	A-B	17	25.242			
	B-B	16	11.879			
<i>Est-3</i>	A-A	0	10.652	33.287	1	<0.001*
	A-B	50	28.696			
	B-B	8	18.652			
<i>Est-D</i>	A-A	13	10.410	7.783	1	0.005
	A-B	3	8.179			
	B-B	4	1.410			

(Cont.)

Locus	Genotype	Observed frequency	Expected frequency	χ^2	d.f.	<i>P</i>
<i>Hk</i>	A-A	8	2.877	17.621	3	<0.001*
	A-B	5	11.795			
	A-C	0	3.452			
	B-B	14	11.233			
	B-C	8	6.740			
	C-C	2	0.904			
<i>Idh-1</i>	A-A	0	0.429	1.440	1	0.230
	A-B	3	2.143			
	B-B	1	1.429			
<i>Idh-2</i>	A-A	13	6.774	14.208	1	<0.001*
	A-B	10	22.452			
	B-B	24	17.774			
<i>Lap-1</i>	A-A	8	13.374	8.963	1	0.0028
	A-B	38	27.252			
	B-B	8	13.374			
<i>Lap-2</i>	A-A	31	21.609	26.289	1	<0.001*
	A-B	9	27.783			
	B-B	18	8.609			
<i>Mdh</i>	C-C	4	5.884	1.955	1	0.162
	C-D	21	17.232			
	D-D	10	11.884			
<i>Me</i>	B-B	40	33.263	96.000	3	<0.001*
	B-C	0	6.737			
	B-D	0	6.737			
	C-C	4	0.295			
	C-D	0	0.674			
	D-D	4	0.295			
<i>Mpi</i>	A-A	14	10.776	7.683	1	0.006
	A-B	5	11.449			
	B-B	6	2.776			
<i>Pgi-1</i>	A-A	6	4.143	1.411	1	0.235
	A-B	18	21.714			
	B-B	29	27.143			
<i>Sod-1</i>	A-A	22	15.641	10.560	1	0.0012*
	A-B	17	29.718			
	B-B	20	13.641			
<i>Sod-2</i>	A-A	50	48.058	52.000	1	<0.001*
	A-B	0	3.883			
	B-B	2	0.058			

(Cont.)

Locus	Genotype	Observed frequency	Expected frequency	χ^2	d.f.	<i>P</i>
6Pgdh	C-C	1	0.667	0.139	1	0.709
	C-D	2	2.667			
	D-D	2	1.667			
(d) Population 4						
Est-2	A-A	6	4.468	1.361	1	0.243
	A-B	9	12.064			
	B-B	9	7.468			
Est-3	A-A	1	3.000	3.360	1	0.067
	A-B	16	12.000			
	B-B	9	11.000			
Est-D	A-A	1	0.769	0.031	1	0.860
	A-B	3	3.462			
	B-B	3	2.769			
Idh-2	A-A	10	11.000	0.934	1	0.334
	A-B	14	12.000			
	B-B	2	3.000			
Mdh	C-C	0	0.857	4.000	1	0.046
	C-D	4	2.286			
	D-D	0	0.857			
Me	A-A	7	2.758	51.000	6	<0.001*
	A-B	0	4.242			
	A-C	0	3.394			
	A-D	0	0.848			
	B-B	5	1.364			
	B-C	0	2.424			
	B-D	0	0.606			
	C-C	4	0.848			
	C-D	0	0.485			
	D-D	1	0.030			
Sod-1	A-A	0	0.091	0.159	1	0.690
	A-B	3	2.818			
	B-B	14	14.091			
Sod-2	A-A	7	6.840	0.007	1	0.935
	A-B	5	5.320			
	B-B	1	0.840			
Pgi-1	A-A	0	0.316	0.625	1	0.429
	A-B	4	3.368			
	B-B	6	6.316			

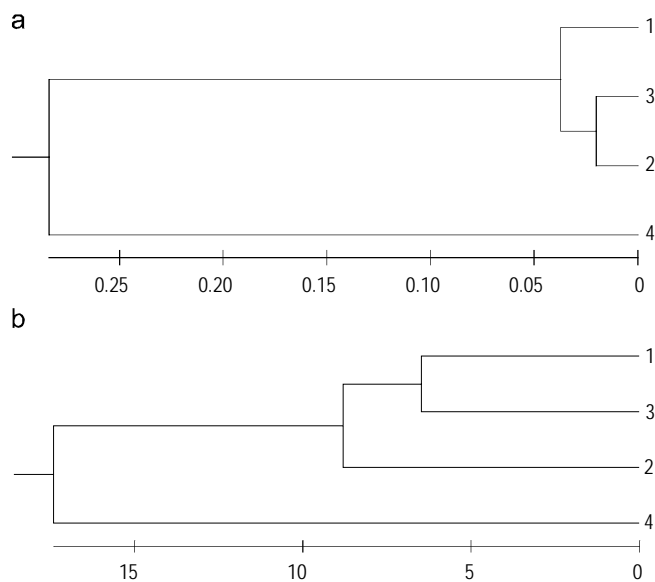


Figura 2. Representación de (a) la distancia genética de Nei (1978) y (b) la distancia cuadrada de Mahalanobis entre las poblaciones 1, 2 y 3 de *Chione californiensis* y 4 de *C. subimbricata*.

Figure 2. Representation of (a) Nei's (1978) genetic distance and (b) the Mahalanobis square distance between populations 1, 2 and 3 of *Chione californiensis* and 4 of *C. subimbricata*.

En la tabla 4 se presentan los estadígrafos F de Wright (F_{IT} , F_{ST} y F_{IS}) para las poblaciones de *C. californiensis*. El coeficiente de endogamia individual F_{IS} fue significativamente diferente de cero en nueve loci, de los cuales en seis y en el F_{IS} total los valores indicaron una deficiencia de heterocigotos significativa. El coeficiente de endogamia global (F_{IT}) proporcionó nueve loci significativamente diferentes de cero y seis de estos casos y el F_{IT} global tuvieron una deficiencia de heterocigotos significativa de la misma manera que en el coeficiente F_{IS} . Los valores del índice de fijación F_{ST} para los loci *Hk*, *Idh-2*, *Mdh* y *Me*, así como el F_{ST} total, fueron significativamente diferentes de cero (tabla 4).

El F_{ST} calculado entre pares de poblaciones mostró valores menores entre las poblaciones 1 y 2 (0.045) y entre las poblaciones 2 y 3 (0.041), ocurriendo el valor mayor entre las poblaciones 1 y 3 (0.101).

En todos los casos, los promedios de los estadígrafos F_{IT} , F_{ST} y F_{IS} (método de Weir y Cockerham 1984) fueron cercanos a los estimados por medio del método de *jackknife* (tabla 4).

Análisis morfométrico

Los valores medios de los caracteres morfométricos para las poblaciones de *C. californiensis* y *C. subimbricata* se presentan en la tabla 5. De los 26 organismos recolectados de *C. subimbricata*, sólo fue posible analizar 24 debido a la fractura de las valvas de dos ejemplares. En las tres poblaciones de *C. californiensis* los promedios del largo de la valva izquierda variaron de 34 a 53 mm y, según el análisis de varianza de una vía por rangos de Kruskal-Wallis ($P = 0.182$), no se

Tabla 3. Diferenciación génica obtenida mediante pruebas exactas (Raymond y Rousset 1995) entre las poblaciones de *Chione californiensis*: 1 = Laguna Agiabampo, 2 = Puerto San Carlos y 3 = La Paz; * = diferencias significativas ($P \leq 0.001$).

Table 3. Genic differentiation obtained by exact tests (Raymond and Rousset 1995) among the populations of *Chione californiensis*: 1 = Laguna Agiabampo, 2 = Puerto San Carlos and 3 = La Paz; * = significant differences ($P \leq 0.001$).

Population	<i>Hk</i>	<i>Idh-2</i>	<i>Mdh</i>	<i>Me</i>	<i>Pgi-1</i>	<i>Sod-2</i>
1 vs 2		*	*	*		
1 vs 3			*	*	*	
2 vs 3	*		*	*		*

Tabla 4. Estadígrafos F para las tres poblaciones de *Chione californiensis* (* = significativos).

Table 4. Wright's F statistics for three populations of *Chione californiensis* (* = significant).

Locus	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}
<i>Alp-1</i>	0.063	0.027	-0.038
<i>Alp-2</i>	-0.086	-0.097	-0.010
<i>Alp-3</i>	-0.304*	-0.318*	-0.011
<i>Est-2</i>	0.181	0.188	0.008
<i>Est-3</i>	-0.811*	-0.809*	0.001
<i>Est-D</i>	0.430*	0.458*	0.050
<i>Hk</i>	0.346*	0.401*	0.084*
<i>Idh-2</i>	0.487*	0.533*	0.091*
<i>Lap-1</i>	-0.265*	-0.237*	0.022
<i>Lap-2</i>	0.210	0.226	0.020
<i>Mdh</i>	-0.105	0.102	0.187*
<i>Me</i>	1.000*	1.000*	0.332*
<i>Mpi</i>	0.322	0.340	0.027
<i>Pgi-1</i>	-0.106	-0.053	0.048
<i>Pgi-2</i>	0.044	-0.046	-0.094
<i>Pgm-2</i>	0.030	0.009	-0.021
<i>Pgm-3</i>	-0.077	-0.124	-0.044
<i>Sod-1</i>	0.513*	0.510*	-0.006
<i>Sod-2</i>	0.836*	0.854*	0.111
<i>6Pgdh</i>	0.157	0.093	-0.076
Total	0.121*	0.161*	0.045*
Jackknife mean value	0.120	0.162	0.046
Standard error	0.090	0.101	0.028
Bootstrap interval 95%	0.300-0.046	0.364-0.034	0.101-0.001

The genotype comparison test revealed differences in the *Mdh* and *Me* loci among the three populations of *C. californiensis*. Locus *Me* in population 1 showed genotypes BB, BC and CC, whereas in population 3 it showed genotypes

Tabla 5. Promedios de las medidas morfométricas de las poblaciones de *Chione californiensis* y *C. subimbricata*: 1 = Laguna Agiabampo, 2 = Puerto San Carlos, 3 = La Paz y 4 = Melaque; *n* = número de valvas medidas. Músculo = peso húmedo del músculo expresado en gramos; el resto de los valores expresados en milímetros. Desviaciones estándar entre paréntesis.

Table 5. Mean values for the morphometric measurements of the *Chione californiensis* and *C. subimbricata* populations: 1 = Laguna Agiabampo, 2 = Puerto San Carlos, 3 = La Paz and 4 = Melaque; *n* = number of valves measured. Muscle = wet weight of the muscle in grams; the rest of the values are given in millimeters. Standard deviations in parentheses.

Morphometric measure	<i>Chione californiensis</i>			<i>Chione subimbricata</i>
	Population 1 <i>n</i> = 24	Population 2 <i>n</i> = 51	Population 3 <i>n</i> = 58	Population 4 <i>n</i> = 24
Length	46.842 (0.456)	44.916 (4.510)	45.336 (3.305)	25.940 (2.604)
Muscle (M)	0.857 (0.296)	0.573 (0.216)	0.625 (0.130)	0.203 (0.163)
Height (H)	43.240 (0.264)	40.587 (4.735)	43.121 (3.237)	21.995 (2.505)
Width (W)	30.200 (0.675)	25.244 (2.866)	27.068 (2.059)	16.274 (1.674)
AB	12.022 (0.720)	10.993 (1.257)	10.890 (1.023)	5.722 (0.647)
AC	8.123 (0.676)	7.447 (1.140)	7.577 (0.743)	4.372 (0.544)
AD	13.963 (1.348)	11.293 (2.113)	14.214 (1.456)	5.633 (0.640)
CD	14.759 (1.254)	12.103 (1.981)	14.664 (1.367)	6.994 (0.884)
DG	12.638 (1.166)	13.576 (1.748)	13.192 (1.383)	7.045 (0.884)
EF	11.275 (0.966)	9.883 (1.228)	10.497 (0.958)	5.676 (0.716)
EG	28.398 (1.432)	27.006 (3.101)	27.948 (1.979)	15.122 (1.496)
FH	25.501 (1.831)	23.967 (3.614)	24.692 (1.988)	13.981 (1.459)
GH	12.086 (1.161)	10.549 (1.776)	10.724 (0.975)	5.564 (0.576)
GI	10.673 (1.412)	8.882 (1.501)	9.188 (1.022)	4.258 (0.770)
HI	10.738 (0.854)	10.236 (1.373)	10.223 (0.985)	5.883 (0.758)

encontraron diferencias significativas. En *C. subimbricata* este mismo carácter varió entre 20 y 32 mm.

El primer AFD para las tres poblaciones de *C. californiensis* indicó que las variables que aportaron la mayor diferenciación entre poblaciones fueron AD, CD y H, definidas en la raíz canónica 1 y W, M y GI en la raíz canónica 2. En el segundo AFD las tres poblaciones de *C. californiensis* y la población de *C. subimbricata* se encontró que las variables que discriminan entre las dos especies fueron AD y H en la raíz canónica 1 y W, AD y CD en la raíz canónica 2. Es importante destacar que las 14 variables utilizadas en el AFD que ayudaron a diferenciar a nivel intraespecífico en *C. californiensis* fueron también útiles para discriminar entre *C. californiensis* y *C. subimbricata*, dos especies del mismo género.

La clasificación de las poblaciones por medio del AFD identificó correctamente a 92% de los individuos a nivel intra (*C. californiensis*) e interespecífico (*C. californiensis* y *C. subimbricata*). Las distancias cuadradas de Mahalanobis (D^2) mostraron valores similares entre las tres poblaciones de *C. californiensis*, mientras que entre las dos especies estuvieron entre 34 y 52. El fenograma (fig. 2b) reveló que la morfometría de las poblaciones 1 y 3 fue similar pero difirió ligeramente de la morfometría de la población 2, mientras que *C. subimbricata* se mantiene morfológicamente distante de las tres poblaciones de *C. californiensis*.

CC, CD and DD. Population 2 had the greatest genotypic diversity of locus *Me* (AB, BB, BC, CC, CD and DD). Locus *Me* showed the lowest number of genotypes (CC and DD) in population 1 and three genotypes (BB, CC and DD) in population 3. Population 2 showed four genotypes (AA, BB, CC and DD), one of which (AA) is exclusive to this population (table 2).

The allelic differentiation test, determined by exact tests (Raymond and Rousset 1995), among the three populations of *C. californiensis* revealed differences in the allelic composition of the *Mdh* and *Me* loci. Differences were also found in the *Hk* and *Sod-2* loci between populations 2 and 3, in *Idh-2* between populations 1 and 2, and in *Pgi-1* between populations 1 and 3 (table 3).

Regarding Nei's genetic distance, populations 2 and 3 formed one group, whose distance was 0.040 (fig. 2a), and between these and population 1, the distance was 0.075. The genetic distance between the two species was 0.65.

Wright's *F* statistics (F_{IT} , F_{ST} and F_{IS}) for the populations of *C. californiensis* are shown in table 4. The individual inbreeding coefficient (F_{IS}) was significantly different from zero in nine loci, of which six and the total F_{IS} had values that indicated significant heterozygote deficiency. The global inbreeding coefficient (F_{IT}) was significantly different from zero in nine loci, six of which and whose total F_{IT} had

La gráfica de la raíz 1 con la raíz 2 del primer AFD de las poblaciones de *C. californiensis* mostró una distribución de los datos morfométricos y una diferenciación de las poblaciones similares a las obtenidas en el segundo AFD, en el cual se incluyó a las cuatro poblaciones. Este segundo AFD mostró tanto la diferenciación morfométrica intraespecífica (poblaciones 1, 2 y 3) como la interespecífica (poblaciones 1, 2 y 3 en relación con la 4) (fig. 3).

Discusión

Análisis genético

Los resultados obtenidos en esta investigación son de gran valor al ser los primeros registros genéticos para estas especies y, por lo tanto, una referencia científica inicial para el conocimiento de su genética.

De acuerdo con los resultados de las frecuencias alélicas, es posible considerar el alelo *Sod-1^B* como uno cuya frecuencia es útil para diferenciar entre *C. californiensis* y *C. subimbricata*. De la misma manera el genotipo *Mdh^{AB}* observado únicamente en la población 2 puede ser útil para identificar la población de origen dentro de la especie *C. californiensis*.

Es importante señalar que, aunque no estaba entre los objetivos de esta investigación, no fue posible precisar la causa de la ausencia de tinción histoquímica de individuos en algunos loci para las poblaciones de *Chione*; sin embargo, descartamos cualquier error de tipo técnico.

Para las cuatro poblaciones de *Chione* los niveles de heterocigosis observada (0.44) fueron elevados en comparación a los reportados en la literatura para invertebrados marinos

significante heterocigote deficiency, similar to F_{IS} . The fixation index (F_{ST}) values for the *Hk*, *Idh-2*, *Mdh* and *Me* loci were significantly different from zero, as in the case of total F_{ST} (table 4).

The F_{ST} calculated for pairs of populations showed lower values between populations 1 and 2 (0.045) and between populations 2 and 3 (0.041), and the highest value between populations 1 and 3 (0.101).

In all cases, the mean values of F_{IT} , F_{ST} and F_{IS} (based on Weir and Cockerham 1984) were similar to those estimated by the jackknife method (table 4).

Morphometric analysis

The mean values of the morphometric measurements for the populations of *C. californiensis* and *C. subimbricata* are given in table 5. Of the 26 organisms of *C. subimbricata* collected, it was only possible to analyze 24 because 2 of them had fractured valves. In the populations of *C. californiensis*, the mean lengths of the left valve ranged from 34 to 53 mm and the Kruskal-Wallis one-way analysis of variance by ranks showed no significant differences ($P = 0.182$). In the population of *C. subimbricata*, the mean lengths of the left valve ranged from 20 to 32 mm.

The first DFA for the three populations of *C. californiensis* indicated that the variables contributing most to the differentiation among populations were AD, CD and H, defined in canonical root 1, and W, M and GI in canonical root 2. The second DFA of the three populations of *C. californiensis* and one of *C. subimbricata* revealed that the variables discriminating these two species were AD and H in canonical root 1 and W, AD and CD in canonical root 2. It is important to note that the 14 variables used in the DFA for the intraspecific differentiation of *C. californiensis* were also useful to discriminate between *C. californiensis* and *C. subimbricata*, two species of the same genus.

The classification of the populations by the DFA resulted in the correct identification of 92% of the individuals at the intraspecific (*C. californiensis*) and interspecific (*C. californiensis* and *C. subimbricata*) levels. The Mahalanobis square distances showed similar values among the three *C. californiensis* populations, while the values between both species were between 34 and 52. The phenogram (fig. 2b) indicated that the morphometry of populations 1 and 3 was similar, whereas that of population 2 was less so; however, the morphometry of *C. subimbricata* is morphologically distant from the three populations of *C. californiensis*.

The graph of roots 1 and 2 of the first DFA for the populations of *C. californiensis* showed a similar distribution of the morphometric data and differentiation of the populations than those obtained with the second DFA, which included the four populations. The second DFA showed both the intraspecific (populations 1, 2 and 3) and interspecific morphometric differentiation (populations 1, 2 and 3 relative to population 4) (fig. 3).

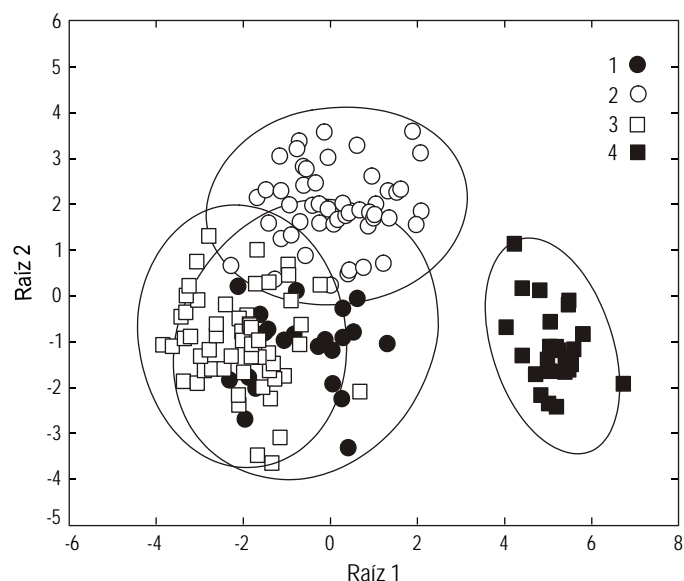


Figura 3. Análisis de funciones discriminantes de la raíz 1 contra la raíz 2 para las poblaciones de *Chione californiensis* (1, 2 y 3) y *C. subimbricata* (4).

Figure 3. Discriminant function analysis of root 1 vs root 2 for the populations of *Chione californiensis* (1, 2 and 3) and *C. subimbricata* (4).

1 = Laguna Agiabampo (Sonora), 2 = Puerto San Carlos (BCS), 3 = La Paz (BCS), 4 = Melaque (Jalisco).

(0.061–0.216, Fujino *et al.* 1983), moluscos como caracol (0.22, Tello-Cetina *et al.* 2005), abulón (0.03–0.24, Brown 1993) y ostión (0.27–0.29, English *et al.* 2000), o bien para crustáceos como el camarón blanco (0.171–0.319, Rivera-García y Grijalva-Chon 2006). De la misma forma, estos valores de heterocigosis fueron superiores a los encontrados específicamente para algunos bivalvos veneridos como *Tridacna maxima* (0.220), *Ruditapes philippinarum* (0.248) y *Phacosoma japonicum* (0.15) (Sato 1996). Ante este elevado nivel de heterocigosidad, descartamos la posibilidad de haber incurrido en una sobreestimación de los individuos heterocigotos, ya que la interpretación electroforética se basó en la estructura cuaternaria de las enzimas (Harris y Hopkinson 1976). Cabe señalar además que las enzimas analizadas se eligieron al azar y sin conocer previamente que serían polimórficas.

Para explicar la deficiencia de heterocigotos en poblaciones naturales se han propuesto diversas hipótesis que comprenden: autofecundación, presencia de alelos nulos, fenómenos a nivel cromosómico (aneuploidias), sesgo en el muestreo, efecto Wahlund y selección en contra de un alelo o genotipo particular (Zouros y Foltz 1984, Raymond *et al.* 1997). Los resultados encontrados para las poblaciones 2, 3 y 4 en esta investigación sugieren como posibles causas de la deficiencia de heterocigotos el efecto Wahlund, debido a que es posible la incorporación de individuos de diferentes cohortes en una misma muestra, así como selección en contra de los heterocigotos.

Los resultados de la distancia genética de Nei (1978) entre *C. californiensis* y *C. subimbricata* son producto de su divergencia, ya que desde el Plioceno temprano (5.2–2.5Ma) el subgénero *Chione* al cual pertenecen, habitaba en la región estudiada en esta investigación (Roopnarine 1996). Por su parte, los registros más antiguos de la especie *C. californiensis* datan del Plioceno tardío hace 2.4 Ma (Roopnarine 1996), época en la cual el Golfo de California ya tenía la configuración actual (Gastil *et al.* 1979). Sin embargo es factible que la población 1 haya divergido antes que las poblaciones 2 y 3, ya que su distancia genética (D) en relación a las otras dos fue mayor.

El resultado significativo del índice de fijación ($F_{ST} = 0.045$) y el número de migrantes ($Nm = 0.363$) indicaron que las tres poblaciones de *C. californiensis* se encuentran poco estructuradas de acuerdo con el criterio establecido por Wright (1978). Al calcular el índice de fijación F_{ST} por pares de poblaciones se obtuvo poca diferenciación genética entre las poblaciones 1 y 2 y entre la 2 y la 3, así como una diferenciación genética moderada entre las poblaciones 1 y 3. La existencia de poca o moderada diferenciación genética en las poblaciones estudiadas podría estar determinada por las condiciones ambientales de la región, las cuales tienen una influencia directa sobre los patrones de variación clinal de alozimas, tal y como se ha demostrado en varias especies animales (Burton 1983), particularmente en las especies *Phacosoma japonicum* (Sato 1996), *Cepaea nemoralis* (Wilson 1996) y *Varicorhinus barbatulus* (Wang *et al.* 2004).

Discussion

Genetic analysis

The results obtained in this study provide valuable information since they are the first genetic records for these species and, therefore, an initial scientific reference for understanding their genetics.

The allelic frequency results indicate that it is possible to consider *Sod-1^B* an allele whose frequency value is useful to differentiate between *C. californiensis* and *C. subimbricata*. Likewise, the genotype *Mdh^{AB}* observed exclusively in population 2 may be useful in identifying the population of origin within the species *C. californiensis*.

It is important to indicate that it was not possible to pinpoint the cause for the absence of histochemical staining of individuals in some loci for the *Chione* populations, neither was it one of the objectives of this work; however, we discard any type of technical error.

The levels of observed heterozygosity (0.44) for the four populations of *Chione* were high in comparison with those reported in the literature for marine invertebrate molluscs (0.061–0.216, Fujino *et al.* 1983), snails (0.22, Tello-Cetina *et al.* 2005), abalone (0.03–0.24, Brown 1993) and oysters (0.27–0.29, English *et al.* 2000), or for crustaceans such as white shrimp (0.171–0.319, Rivera-García and Grijalva-Chon 2006). The heterozygosity values were also higher than those found specifically for some venerid bivalves like *Tridacna maxima* (0.220), *Ruditapes philippinarum* (0.248) and *Phacosoma japonicum* (0.15) (Sato 1996). We nevertheless discard the possibility of having incurred in an overestimation of the heterozygous individuals since the electrophoretic interpretation was based on the quaternary structure of the enzymes (Harris and Hopkinson 1976). Note that the analyzed enzymes were chosen at random and without previously knowing that they would be polymorphic.

Several hypotheses have been proposed to explain heterozygote deficiency in natural populations: self-fecundation, presence of null alleles, phenomena at the chromosome level (aneuploidy), bias in the sampling method, Wahlund effect and selection against a particular allele or genotype (Zouros and Foltz 1984, Raymond *et al.* 1997). The results obtained in this study in populations 2, 3 and 4 suggest that the possible causes of heterozygote deficiency are the Wahlund effect, because it is possible to incorporate individuals of different cohorts into the same sample, and the selection against heterozygotes.

The results of Nei's (1978) genetic distance between *C. californiensis* and *C. subimbricata* are due to their divergence, since the subgenus *Chione*, to which they belong, has inhabited the region under study since the Early Pliocene (5.2–2.5 Ma; Roopnarine 1996). The oldest records of *C. californiensis* date to the Late Pliocene (2.4 Ma; Roopnarine 1996), when the Gulf of California had the current configuration (Gastil *et al.* 1979). It is possible, however, that population 1 may have diverged before populations 2 and 3, since its genetic distance relative to the other two was greater.

El flujo genético entre las poblaciones 1 y 3 pudiera estar restringido debido a que el flujo de agua del Golfo de California hacia la Laguna Agiabampo (población 1) está parcialmente limitado por la presencia de dos barreras litorales (Ayala-Castañares *et al.* 1990), aunado al hecho de que el ingreso de la marea está restringido por la escasa profundidad de la laguna y por los depósitos sedimentarios formados en las proximidades de la boca lo cual también podría disminuir el eventual flujo de larvas de esta localidad hacia otras cercanas. Ayala-Castañares *et al.* (1990) reportaron que esta localidad es un sistema lagunar ecológicamente inestable debido al impacto generado por la apertura artificial de una boca en la década de los ochenta y a la fecha se desconoce si ha logrado recuperar su estabilidad.

Entre las poblaciones 2 y 3 el flujo genético podría estar restringido debido a la convergencia de masas de aguas provenientes de la Corriente de Costa Rica (aguas templado-cálidas de origen ecuatorial) y de la Corriente de California (aguas templadas) que ocasionan que el flujo hacia el interior del Golfo de California ocurra cerca de Sinaloa y el flujo hacia afuera sea más bien a lo largo de Baja California (Castro *et al.* 2000).

Los estadígrafos F_{IS} y F_{IT} para *C. californiensis* mostraron una tendencia general a la deficiencia de heterocigotos, la cual es una condición común en bivalvos marinos (Zouros y Foltz 1984), además de que indicaron un porcentaje de endogamia individual de 12% y global de 16% en las poblaciones estudiadas. Considerando estos resultados se propone que las poblaciones estudiadas de *C. californiensis* están estructuradas y presentan endogamia.

Análisis morfométrico

Los análisis morfológicos son una herramienta útil en los estudios poblacionales ya que se pueden aplicar a una gran variedad de grupos de moluscos como *Littorina sitkana* (Boulding *et al.* 1993), *Mytilus californiensis* (Cáceres-Martínez *et al.* 2003) y *Saccostrea* (Day *et al.* 2000), así como en crustáceos (Creasey *et al.* 2000) y otros grupos taxonómicos superiores como peces (Elliot *et al.* 1995, Waters *et al.* 2001) y mamíferos (Taylor *et al.* 2004, Guidetti *et al.* 2005). Este tipo de análisis ha logrado contribuir tanto al conocimiento básico de la morfología de estos grupos como a su sistemática.

El análisis morfométrico presentado aquí para *C. californiensis* y *C. subimbricata* es el primero del que se tiene conocimiento realizado para especies de este género en el Pacífico mexicano. Los únicos reportes sobre la morfometría de *Chione* son los de Stanley y Yang (1987), Roopnarine (1995, 1996) y Roopnarine y Beussink (1999) quienes trabajaron con especies actuales y fósiles.

Dentro del análisis morfométrico se verificó que el tipo de estandarización utilizada es una herramienta útil y práctica ya que logró eliminar el sesgo producido por el efecto de las tallas. De la misma manera, el análisis morfométrico de funciones discriminantes mostró ser una herramienta de gran valor

The significant result of the fixation index ($F_{ST} = 0.045$) and number of migrants ($N_m = 0.363$) indicated that the three populations of *C. californiensis* have small genetic structure according to the criterion established by Wright (1978). The calculation of F_{ST} by pairs of populations showed little genetic differentiation between populations 1 and 2 and between populations 2 and 3, as well as a moderate genetic differentiation between populations 1 and 3. The existence of little or moderate genetic differentiation among the populations studied could be determined by the environmental conditions of the region, which have a direct influence on the patterns of clinal variation of allozymes, as has been shown for several animal species (Burton 1983), in particular *Phacosoma japonicum* (Sato 1996), *Cepaea nemoralis* (Wilson 1996) and *Varicorhinus barbatulus* (Wang *et al.* 2004).

The genetic flow between populations 1 and 3 may be restricted because the flow of water from the Gulf of California into Agiabampo Lagoon (population 1) is partially limited by two coastal barriers (Ayala-Castañares *et al.* 1990); moreover, tidal inflow is restricted by the shallow depth of the lagoon and by the sedimentary deposits formed near the mouth, which could also reduce larval flow between this site and other nearby locations. Ayala-Castañares *et al.* (1990) also reported that this lagoon is an ecologically unstable system owing to the impact generated by the opening of an artificial mouth in the 1980s and it is still not known whether it has been able to regain its stability.

The genetic flow between populations 2 and 3 may be restricted due to the convergence of water masses from the Costa Rica Current (warm-temperate water of equatorial origin) and the California Current (temperate water), causing the flow into and out of the Gulf of California to occur near Sinaloa and along Baja California, respectively (Castro *et al.* 2000).

The F_{IS} and F_{IT} statistics for *C. californiensis* showed a general trend towards heterozygote deficiency, a common condition in marine bivalves (Zouros and Foltz 1984). They also showed individual and global inbreeding values of 12% and 16%, respectively. Considering these results we propose that the *C. californiensis* populations studied are structured and present inbreeding.

Morphometric analysis

Morphological analyses are a useful tool in population studies because they can be applied to a wide variety of molluscs such as *Littorina sitkana* (Boulding *et al.* 1993), *Mytilus californiensis* (Cáceres-Martínez *et al.* 2003) and *Saccostrea* (Day *et al.* 2000), as well as crustaceans (Creasey *et al.* 2000) and other higher taxonomic groups like fishes (Elliot *et al.* 1995, Waters *et al.* 2001) and mammals (Taylor *et al.* 2004, Guidetti *et al.* 2005). This type of analysis has contributed to both the systematics and basic knowledge of the morphology of these groups.

sistemático, como lo ha sido para otros grupos taxonómicos en donde ha evidenciado diferencias morfométricas intraespecíficas (Elliot *et al.* 1995, Boulding *et al.* 1993, Cáceres-Martínez *et al.* 2003) e interespecíficas cuando existen fenotipos similares (Day *et al.* 2000).

Los dos AFD realizados evidenciaron diferencias morfométricas tanto a nivel intraespecífico (*C. californiensis*) como a nivel interespecífico (*C. californiensis* y *C. subimbricata*), obteniendo en ambos casos un porcentaje de clasificación correcta de alrededor de 92%, similar a los porcentajes obtenidos por Boulding *et al.* (1993) para *Littorina* (89–94%) y por Day *et al.* (2000) para *Saccostrea* (85–100%). Estos porcentajes indicaron una acertada clasificación de los organismos, misma que se basó en las claves taxonómicas de Keen (1971).

Con los AFD se detectaron seis variables que discriminaron intraespecíficamente y cinco que discriminan interespecíficamente; sin embargo el resto de las variables fueron también importantes ya que hicieron más evidente esta diferenciación y más robusto el análisis estadístico. Estas variables podrán ser utilizadas para inferir acerca de la procedencia de las muestras en futuros estudios, siempre y cuando se tome en cuenta la posible influencia de otros factores biológicos o ambientales sobre la morfología (Day *et al.* 2000) como lo señaló Seed (1968). Este último autor observó que las diferencias en edad, hábitat, tasa de crecimiento y densidad influyen en la forma de la concha de *Mytilus edulis*. Otros factores que también deberán ser considerados ya que pueden influir sobre la morfología de moluscos bivalvos son la presencia de depredadores (Reimer y Tedengren 1996) y el nivel de mareas que influyeron en la morfología y fisiología de *M. galloprovincialis* (Dalla Via *et al.* 1987).

Los resultados de las distancias cuadradas de Mahalanobis en *C. californiensis* indicaron que sus poblaciones son morfológicamente similares, pero se observó mayor similitud entre dos poblaciones del Golfo de California (1 y 3). Este resultado contrasta con la distancia genética de Nei, el cual indicó mayor similitud genética entre las poblaciones 2 y 3. No obstante los resultados nos llevan a proponer que la especie *C. californiensis* mantiene una identidad morfológica a lo largo de la distribución geográfica de las poblaciones analizadas; sin embargo, es posible detectar ligeras diferencias morfométricas entre localidades, mismas que pudieran deberse a las características particulares de cada hábitat (tipo de sustrato, patrón de circulación oceánica, alteración o impacto ambiental, etc.) o bien a la variabilidad de esta especie.

Aunque *C. californiensis* es una especie con amplia distribución que habita desde el intermareal hasta profundidades de 69 m (Keen 1971), sus bancos se encuentran localizados principalmente en las zonas intermareales (García-Domínguez *et al.* 1991, Castro-Ortiz y García-Domínguez 1993). El tipo de sustrato sobre el que habita esta especie es variable, desde estuarios con fondo limo arcilloso y arcillas limosas como en la localidad 1 (Ayala-Castañares *et al.* 1990) hasta complejos lagunares altamente productivos como en la localidad 2 con

The morphometric analysis of *C. californiensis* and *C. subimbricata* presented here is, as far as we know, the first one for species of this genus from the Mexican Pacific. The only reports on the morphometry of *Chione* are those of Stanley and Yang (1987), Roopnarine (1995, 1996) and Roopnarine and Beussink (1999), who worked with living and fossil species.

The morphometric analysis allowed us to verify that the type of standardization used is a useful and practical tool since it eliminated the bias produced by the size effect. The morphometric analysis of discriminant functions also proved to be a valuable tool, denoting, as it has done for other taxonomic groups, intraspecific morphometric differences (Elliot *et al.* 1995, Boulding *et al.* 1993, Cáceres-Martínez *et al.* 2003) as well as interspecific differences when similar phenotypes exist (Day *et al.* 2000).

The two DFA applied indicated morphometric differences at both the intraspecific (*C. californiensis*) and interspecific (*C. californiensis* and *C. subimbricata*) levels. In both cases, a correct classification rate of 92% was obtained, similar to the results obtained by Boulding *et al.* (1993) for *Littorina* (89–94%) and by Day *et al.* (2000) for *Saccostrea* (85–100%). These percentages indicated a correct identification of the organisms, based on the taxonomic keys of Keen (1971).

The DFA revealed six variables that discriminated intraspecifically and five that discriminated interspecifically. The rest of the variables, however, were also important since they made this differentiation more evident and the statistical analysis more robust. These variables can be used to determine the origin of the samples in future studies, provided that the possible influence of other biological or environmental factors on the morphology are considered (Day *et al.* 2000), as indicated by Seed (1968). This latter author observed that differences in age, habitat, growth rate and density affect the shell shape of *Mytilus edulis*. Other factors that should also be considered since they can impact the morphology of bivalve molluscs are the presence of predators (Reimer and Tedengren 1996) and the level of the tides that influence the morphology and physiology of *M. galloprovincialis* (Dalla Via *et al.* 1987).

The results of the Mahalanobis square distances in *C. californiensis* indicated that the populations are morphologically similar, though greater similarity was observed between the two populations (1 and 3) from the Gulf of California. This finding contrasts with that obtained regarding Nei's genetic distance, which showed greater similarity between populations 2 and 3. We nevertheless propose that *C. californiensis* maintains a morphological identity throughout the geographic distribution of the populations surveyed; however, slight morphometric differences can be detected among sites, which could be attributed to the particular characteristics of each habitat (type of substrate, oceanic circulation pattern, environmental alteration or impact, etc.) or to the variability of this species.

Chione californiensis is a widely distributed species found from the intertidal zones to depths of 69 m (Keen 1971), though its banks mainly occur in the intertidal zones (García-

sustrato predominantemente arenoso-rocoso (Saad y Palacios 2004), o bien ecosistemas altamente productivos (Lechuga 1977) con fondo de arena (90%) y limo (10%) como en la localidad 3, en donde la presencia de arcilla limita en forma determinante su distribución (García-Domínguez *et al.* 1994). De esta manera, el tipo de sustrato no parece estar influyendo de manera determinante sobre la morfometría de las poblaciones de *C. californiensis* ya que los tipos de sustrato para las poblaciones con mayor semejanza morfométrica (1 y 3) son distintos.

Para *C. subimbricata*, una especie intermareal que también puede habitar en mar abierto hasta profundidades de 9 m, y al igual que *C. californiensis* tiene una amplia distribución (Keen 1971, Abbot 1974), el único tipo de sustrato reportado es arena fina-limo y arena gruesa-roca en el estado de Guerrero, México (Baqueiro y Stuardo 1977); sin embargo, sería conveniente analizar si algunos de los factores anteriormente mencionados influyen sobre la morfometría de esta especie.

Aunque no se cuenta con más información que la aquí referida sobre las condiciones particulares de cada localidad, se plantea que son precisamente estas condiciones las que hacen que la morfología de cada población de *C. californiensis* mantenga variaciones a lo largo de su distribución, al menos en la escala geográfica abarcada en este estudio.

De igual manera que para el análisis genético, los resultados morfométricos de *C. californiensis* y *C. subimbricata* se consideran un punto de referencia para la correcta clasificación de los especímenes, sobretodo en estadios tempranos cuando eventualmente pudiera dificultarse su clasificación.

Los resultados generados a partir de ambos análisis confirmaron la clasificación taxonómica propuesta por Keen (1971), por lo cual se recomienda seguir utilizando dicha clasificación para las distintas especies del género *Chione*.

Agradecimientos

El presente estudio fue apoyado por la Coordinación de Posgrado e Investigación y el Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la UABC mediante el programa 4054 “Estructura genética y filogeografía de *Chione* spp. (Mollusca: Bivalvia), de las costas de la Península de Baja California”. Agradecemos al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) la beca doctoral de uno de los autores (LCAL) y a E Collins su apoyo técnico en el laboratorio.

Referencias

- Abbott RT. 1974. American Seashells: The Marine Mollusca of the Atlantic and Pacific Coast of North America. 2nd ed. Van Nostrand Reinhold Co., New York, 449 pp.
- Abreu-Grobois A. 1983. Population genetics of *Artemia*. Ph.D. thesis, University of Wales, Swansea, UK, 438 pp.
- Avisé JC. 2005. Phylogeography: The History and Formation of Species. Harvard Univ. Press, Cambridge, USA, 447 pp.
- Ayala-Castañares A, Gutiérrez ME, Malpica V. 1990. Morfo-sedimentología de la Laguna Agiabampo, Sonora-Sinaloa, México. An. Inst. Cienc. Mar Limnol. UNAM 17(2): 257–270.

Domínguez *et al.* 1991, Castro-Ortiz and García-Domínguez 1993). The type of environment inhabited by this species varies from estuaries with clayey-silt and silty-clay substrates like locality 1 (Ayala-Castañares *et al.* 1990) to highly productive lagoon complexes with predominantly sandy-rocky bottoms like locality 2 (Saad and Palacios 2004), or highly productive ecosystems (Lechuga 1977) with sand (90%) and silt (10%) substrates like locality 3, where the presence of clay significantly limits its distribution (García-Domínguez *et al.* 1994). Hence, the type of substrate does not seem to have an important influence on the morphometry of *C. californiensis*, since the populations showing greatest similarity (1 and 3) inhabit different sediment environments.

Chione subimbricata is an intertidal species that can also inhabit the open sea to depths of 9 m and, like *C. californiensis*, it has a wide distribution (Keen 1971, Abbot 1974). The only type of substrate reported for this species is fine sand-silt and coarse sand-rock in the state of Guerrero, Mexico (Baqueiro and Stuardo 1977); however, it would be pertinent to analyze whether some of the previously mentioned factors influence its morphometry.

Despite the lack of further information than that reported here on the particular conditions of each locality, we propose that it is precisely these conditions that allow the morphology of each population of *C. californiensis* to vary throughout its distribution, at least over the geographical scale covered in this study.

Just as in the case of the genetic analysis, the morphometric results obtained for *C. californiensis* and *C. subimbricata* are considered a point of reference for the correct classification of the specimens, especially those in early stages of development when it can be more difficult to identify them.

The results generated by both analyses confirm the taxonomic classification proposed by Keen (1971). We therefore recommend that this classification continue to be used for the different species of the genus *Chione*.

Acknowledgements

This study was supported by the Autonomous University of Baja California (UABC) through project 4054 “Genetic structure and phylogeography of *Chione* spp. (Mollusca: Bivalvia) from the coasts of the Baja California Peninsula”. The first author acknowledges receipt of a doctoral scholarship from the Mexican Council of Science and Technology (CONACYT). We thank E Collins for technical support in the laboratory.

English translation by Christine Harris.

- Ayre DJ, Hughes TP. 2000. Genotypic diversity and gene flow in brooding and spawning corals along the great barrier reef, Australia. *Evolution* 54(5): 1590–1605.
- Baqueiro E. 1989. Clam culture in Mexico: Past, present and future. In: Manzi JJ, Castagna M (eds.), *Clam Mariculture in North America*. Elsevier Sci., Amsterdam, pp. 383–394.

- Baqueiro E, Stuardo J. 1977. Observaciones sobre la biología, ecología y explotación de *Megapitaria aurantica* (Sow, 1835) y *Dosinia ponderosa* (Gray, 1938) (Bivalvia: Veneridae) de la Bahía Zihuatanejo e Isla Ixtapa, Gro., México. An. Centro Cienc. Mar Limnol. UNAM 4:161–208.
- Barton NH, Slatkin M. 1986. A quasi-equilibrium theory of the distribution of rare alleles in a subdivided population. Heredity 56: 409–415
- Boulding EG, Bouckland-Nicks J, Van Alstyne KL. 1993. Morphological and allozyme variation in *Littorina sitkana* and related *Littorina* species from the northeastern Pacific. Veliger 36: 43–68.
- Brown LD. 1993. Biochemical genetics and species relationships within the genus *Haliotis* (Gastropoda: Haliotidae). J. Molluscan Stud. 59: 429–443.
- Burton R. 1983. Protein polymorphisms and genetic differentiation of marine invertebrate populations. Mar. Biol. Lett. 4: 193–206.
- Cáceres-Martínez J, Del Río-Portilla M, Curiel-Ramírez S, Méndez I. 2003. Phenotypes of the California mussel, *Mytilus californianus*, Conrad (1837). J. Shellfish Res. 22(1): 135–140.
- Camarena-Rosales F. 1999. Relaciones filogeográficas entre especies y subespecies de *Fundulus* (Pises: Fundulidae) de la Península de Baja California, México. Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, México, 89 pp.
- Castro R, Mascarenhas A, Durazo R, Collins C. 2000. Variación estacional de la temperatura y salinidad en la entrada del Golfo de California, México. Cienc. Mar. 26(4): 561–583.
- Castro-Ortiz JL, García-Domínguez F. 1993. Growth of *Chione californiensis* (Broderip, 1835) (Veneridae) in the Ensenada de La Paz, Baja California Sur, Mexico. Inv. Mar. CICIMAR 8(2): 45–52.
- Correa F, Collins E, Ocegüera A, Cordero B, Domínguez D. 2004. Allozymic variation in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* from San Quintín Bay, Baja California, Mexico. Cienc. Mar. 30(1A): 89–97.
- Creasey S, Rogers A, Tyler P, Gage J, Jollivet D. 2000. Genetic and morphometric comparisons of squat lobster *Munidopsis scobina* (Decapoda: Anomura: Galateidae) populations, with notes on the phylogeny of the genus *Munidopsis*. Deep-Sea Res. II 47: 87–118.
- Dalla Vía GJ, Tappeiner U, Bitterlich G. 1987. Shore-level related morphological and physiological variations in the mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) (Mollusca Bivalvia) in the North Adriatic Sea. Monit. Zool. Ital. 21: 293–305.
- Day AJ, Hawkins AJS, Visootviseth P. 2000. The use of allozymes and shell morphology to distinguish among sympatric species of the rock oyster *Saccostrea* in Thailand. Aquaculture 187(1–2): 51–72.
- De la Rosa-Vélez J. 1986. Variabilidad génica poblacional en ostiones de la especie *Crassostrea virginica* del Golfo de México. Tesis de doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México, 124 pp.
- Elliot NG, Haskard K, Koslow JA. 1995. Morphometric analysis of the orange roughly (*Hoplostethus atlanticus*) off the continental slope of southern Australia. J. Fish Biol. 46: 202–220.
- English LJ, Maguire GB, Ward RD. 2000. Genetic variation of wild and hatchery populations of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), in Australia. Aquaculture 187: 283–298.
- Fujino Y, Yamanaka R, Smith PJ. 1983. Genetic variation in marine mollusks. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 49: 1809–1817.
- Futuyma DJ. 1998. Evolutionary Biology. 3rd ed. Sinauer Assoc., Massachusetts, 751 pp.
- García-Domínguez F, González-Acosta B, Rodríguez-Astudillo S. 1991. Symbionts of the clam *Chione californiensis* in the Ensenada de La Paz, Baja California Sur, México. Inv. Mar. CICIMAR 6(2): 283–286.
- García-Domínguez F, Arvizu-Martínez J, Rodríguez-Astudillo S, Ramírez-Sevilla R. 1994. Distribución y abundancia de *Chione californiensis* (Pelecypoda: Veneridae) en la Ensenada de La Paz, Baja California Sur, México. Rev. Biol. Trop. 42(3): 531–536.
- Gastil RG, Krumenacher D, Minch J. 1979. The record of Cenozoic volcanism around the Gulf of California. Geol. Soc. Am. Bull. 90: 839–857.
- Goudet J. 1999. FSTAT. A program to estimate and test gene diversities and fixation indices (v. 2.8). Updated from Goudet (1995).
- Guidetti R, Gandolfi A, Rossi V, Bertolani R. 2005. Phylogenetic analysis of Macrobrotidae (Eutardigrada, Parachela): A combined morphological and molecular approach. Zool. Scr. 34 (May): 235–244.
- Harris H, Hopkinson DA. 1976. Handbook of Enzyme Electrophoresis in Human Genetics. North Holland, Amsterdam, 259 pp.
- Keen AM. 1971. Sea Shells of Tropical West America: Marine Mollusks from Baja California to Perú. 2nd ed. Stanford Univ. Press, 1064 pp.
- Lechuga DC. 1977. Informe de Labores 1977. La producción orgánica primaria en la Ensenada de La Paz, Baja California Sur. Centro de Investigaciones Biológicas (México), pp. 47–69.
- Levene H. 1949. On a matching problem arising in genetics. Ann. Math. Stat. 20: 91–94.
- Licona-Chávez AL. 1999. Análisis genético de *Haliotis rufescens* en Abulones Cultivados SA de CV. Tesis de maestría en ciencias, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, México, 120 pp.
- May B. 1992. Starch gel electrophoresis of allozymes. In: Hoelzel AR (ed.), Molecular Genetic Analysis of Populations. A Practical Approach. IRL Press, Oxford, pp. 1–27.
- Miller M. 1997. Tools for population genetic analyses (TFPGA). A windows program for the analyses of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by the author.
- Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and distance from a small number of individuals. Genetics 89: 583–590.
- Raymond ML, Rousset F. 1995. An exact test for population differentiation. Evolution 49: 1280–1283.
- Raymond M, Väätäntö R, Thom F, Rousset F, de Meedüs T, Renaud F. 1997. Heterozygote deficiency in the mussel *Mytilus edulis* complex revisited. Mar. Ecol. Prog. Ser. 156: 225–337.
- Reimchen TE, Stinson EM, Nelson JS. 1985. Multivariate differentiation of parapatric and allopatric populations of threespine stickleback in the Sangan River watershed, Queen Charlotte Islands. Can. J. Zool. 63: 2944–2951.
- Reimer O, Tedengren M. 1996. Phenotypical improvement of morphological defenses in the mussel *Mytilus edulis* induced by exposure to the predator *Asterias rubens*. Oikos 75: 383–390.
- Richardson BJ, Baverstock PR, Adams M. 1986. Allozyme Electrophoresis: A Handbook for Animal Systematics and Population Studies. Academic Press, San Diego, California, 410 pp.
- Rivera-García M, Grijalva-Chon JM. 2006. Variabilidad y diferenciación genética en camarón blanco *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* de bajo y alto crecimiento. Cienc. Mar. 32(1A): 1–11.
- Roopnarine PD. 1995. A re-evaluation of evolutionary stasis between the bivalve species *Chione erosa* and *Chione cancellata* (Bivalvia: Veneridae). J. Paleontol. 69(2): 280–287.
- Roopnarine PD. 1996. Systematics, biogeography and extinction of chionine bivalves (Bivalvia: Veneridae) in tropical America: Early Oligocene–Recent. Malacologia 38(1–2): 103–142.
- Roopnarine PD, Beussink A. 1999. Extinction and naticid predation of the bivalve *Chione* von Muhlfield in the Late Neogene of Florida. Palaeontol. Electronica 2(1), 15 March: 1–24.

- Saad NG, Palacios CE. 2004. Planificación para la Conservación de Sitios: Complejo Lagunar de Bahía Magdalena-Almejas, BCS, México. Pronatura AC (Noroeste), La Paz, BCS, México, 81 pp.
- Sato S. 1996. Genetic variability and population structure of *Phacosoma japonicum* (Bivalvia: Veneridae). *Venus Jap. J. Malacol.* 55(1): 51–63.
- Seed R. 1968. Factors influencing shell shape in the mussel *Mytilus edulis*. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 48: 350–357.
- Sokal RR, Rohlf FJ. 1995. *Biometry*. 3rd ed. WH Freeman, New York, 887 pp.
- Stanley SM, Yang X. 1987. Approximate evolutionary stasis for bivalve morphology over millions of years: A multivariate multilinesage study. *Paleobiology* 13: 113–139.
- StatSoft Inc. 2002. STATISTICA (data analysis software system), v. 6. www.statsoft.com.
- Swofford DL, Selander RB. 1989. BIOSYS-1. A program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics. *J. Hered.* 72: 281–213.
- Taylor PJ, Denys C, Mukerjee M. 2004. Phylogeny of the African murid tribe *Otomyini* (Rodentia), based on morphological and allozyme evidence. *Zool. Scr.* 33: 389–402.
- Tello-Cetina JA, Rodríguez-Gil LA, Rodríguez-Romero F. 2005. Genética poblacional del caracol rosado *Strombus gigas* en la Península de Yucatán: Implicaciones para su manejo y pesquería. *Cienc. Mar.* 31(2): 379–386.
- Wang JP, Lin HD, Huang S, Pan CH, Chen XL, Chiang TY. 2004. Phylogeography of *Varicorhinus barbatulus* (Cyprinidae) in Taiwan based on nucleotide variation of mtDNA and allozym. *Mol. Phyl. Evol.* 31: 1143–1156.
- Waters JM, Esa YB, Wallis GP. 2001. Genetic and morphological evidence for reproductive isolation between sympatric populations of *Galaxias* (Teleostei: Galaxidae) in South Island, New Zealand. *Biol. J. Linn. Soc.* 73: 287–298.
- Weir BS. 1996. *Genetic Data Analysis: Methods for Discrete Population Genetic Data*. Sinauer, Sunderland, MA.
- Weir BS, Cockerham CC. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358–1370.
- Wiens JJ. 2000. *Phylogenetic Analysis of Morphological Data*. Smithsonian Institution Press, Washington, 213 pp.
- Wilson IF. 1996. Application of ecological genetics techniques to test for selection by habitat on allozymes in *Cepaea nemoralis*. *Heredity* 77: 324–335.
- Wright S. 1978. *Evolution and the Genetics of Populations. Vol 4. Variability within and among natural populations*. Univ. Chicago Press, Chicago, 580 pp.
- Zouros E, Foltz DW. 1984. Possible explanations of heterozygote deficiency in bivalve molluscs. *Malacologia* 25(2): 583–591.
- Zúñiga G, Guzmán-del-Prío S, Cisberos R, Rodríguez G. 2000. Population genetic analysis of the abalone *Haliotis fulgens* (Mollusca: Gastropoda) in Baja California, Mexico. *J. Shellfish Res.* 19 (2): 853-859.

*Recibido en septiembre de 2006;
aceptado en marzo de 2007*