

**VARIACIÓN GENÉTICA EN DOS POBLACIONES DEL COPÉPODO
CALANOIDE MARINO *Acartia californiensis* TRINAST**

**GENETIC VARIATION IN TWO POPULATIONS OF THE MARINE
CALANOID COPEPOD *Acartia californiensis* TRINAST**

Antonio Trujillo-Ortiz¹
Ronald S. Burton²
Jorge de la Rosa-Vélez¹
Francisco Correa-Sandoval³

¹ Facultad de Ciencias Marinas
Universidad Autónoma de Baja California
Apartado postal 453
Ensenada, Baja California
México.

² Marine Biology Research Division 0202
Scripps Institution of Oceanography
University of California, San Diego
9500 Gilman Drive
La Jolla, California 92093
USA

³ Instituto de Investigaciones Oceanológicas
Universidad Autónoma de Baja California
Apartado postal 453
Ensenada, Baja California
México

Recibido en septiembre de 1994; aceptado en enero de 1995

RESUMEN

Se estudió la variación genética del copépodo calanoide marino *Acartia californiensis* Trinast de dos poblaciones cercanas, estero de Punta Banda, Baja California (México) y Mission Bay, California (EUA). El estudio se realizó con aloenzimas, usando la técnica de microelectroforesis vertical en placas de gel de poliacrilamida. Se hicieron ensayos con 11 sistemas enzimáticos y un sistema amortiguador. *Acartia californiensis* reveló patrones de bandeo confiables para seis sistemas con ocho loci, de los cuales sólo PGI-1 fue polimórfico, con $P_{0.95} = 0.125$, para ambas poblaciones. La heterocigocidad para el estero de Punta Banda fue de 0.060 ± 0.060 y para Mission Bay de 0.035 ± 0.035 . Hubo una deficiencia en la heterocigocidad, en comparación con el apartamiento del equilibrio de Hardy-Weinberg esperado, que fue estadísticamente significativa en la población de Mission Bay ($D = -0.477$), pero no significativa en el estero de Punta Banda ($D = -0.096$). El valor estadístico de identidad genética de Nei (1978) entre las dos poblaciones fue de 0.994, con un valor de distancia genética de 0.006, que prueba la falta de diferenciación entre las poblaciones. Los resultados mostraron la existencia de un flujo genético, que se considera probablemente dado a través de una dispersión pasiva de los huevos diapáusicos (de reposo) que produce esta especie, llevados fuera o dentro por el flujo y reflujo marea, y transportados hacia el sur por la corriente de California y hacia el norte por la contracorriente costera de Davidson. El polimorfismo y heterocigosis de las poblaciones aquí estudiadas al ser comparados con los de otros copépodos genéticamente caracterizados, resultaron ser de los más bajos. Este es el primer trabajo realizado sobre la variación genética por aloenzimas para una especie

de copépodo calanoide confinado en un cuerpo de agua costero estuarino o lagunar. Se considera necesario un estudio más amplio, que abarque mayor número de poblaciones (localidades) y loci.

Palabras clave: variación genética, *Acartia californiensis*, copépodo calanoide marino, poli(acrilamida), electroforesis.

ABSTRACT

Genetic variation of the marine calanoid copepod *Acartia californiensis* Trinast was studied from two close populations, Estero de Punta Banda, Baja California (Mexico) and Mission Bay, California (USA). The study was conducted with allozymes using a vertical polyacrylamide microelectrophoresis of 11 enzymatic systems and one buffer system. *Acartia californiensis* presented reliable banding patterns in six systems and eight loci, from which only PGI-1 was polymorphic, with $P_{0.95} = 0.125$ in both populations. The heterozygosity observed in Estero de Punta Banda was 0.060 ± 0.060 and 0.035 ± 0.035 in Mission Bay. There was a statistically significant deficiency in heterozygosity in Mission Bay ($D = -0.477$) when compared to the expected Hardy-Weinberg equilibrium, but not in Estero de Punta Banda ($D = -0.096$). Nei's genetic similarity (1978) between the two populations studied was 0.994, with a genetic distance of 0.006, which proves the lack of differentiation between these populations. The results showed the existence of a genetic flow which was very likely established by a passive dispersal of diapause (resting) eggs that this species produces. They are very likely carried inward and outward by the tidal flux and reflux, and transported south by the California Current and north by Davidson's Coastal Countercurrent. The polymorphism and heterozygosity of the *A. californiensis* populations studied here are among the lowest when compared to other genetically characterized copepods. This is the first study conducted on the genetic variation of a calanoid copepod confined to estuarine waters or coastal lagoons using allozymes. A broader study is needed that covers a greater number of populations (locations) and loci.

Key words: genetic variation, *Acartia californiensis*, marine calanoid copepod, polyacrylamide, electrophoresis.

INTRODUCCION

Durante los últimos 25 años, la aplicación de técnicas genéticas bioquímicas al estudio de poblaciones de invertebrados geográficamente separadas, tanto marinas como estuarinas, ha incrementado significativamente la comprensión de la diferenciación poblacional en el medio ambiente marino (Gooch, 1975; Battaglia y Beardmore, 1978; Battaglia *et al.*, 1978; Levinton, 1980, 1982; Burton y Feldman, 1982; Burton, 1983).

La técnica de electroforesis en gel para separar enzimas y otras proteínas, introducida por Smithies (1955), frecuentemente da una buena idea de la estructura genética locus por locus de poblaciones coespecíficas de organismos que no pueden ser fácilmente cultivados en el laboratorio para hacer estudios formales de genética (Burton, 1983). Como una extensión del análisis genético bioquímico, los datos de la

INTRODUCTION

During the last 25 years, the use of biochemical genetic techniques to study geographically separated populations of estuarine and marine invertebrates has significantly enhanced our understanding of differentiation between populations in the marine environment (Gooch, 1975; Battaglia and Beardmore, 1978; Battaglia *et al.*, 1978; Levinton, 1980, 1982; Burton and Feldman, 1982; Burton, 1983).

The gel electrophoresis technique introduced by Smithies (1955) to separate enzymes and other proteins frequently provides a good idea of the locus by locus genetic structure of conspecific populations of organisms which cannot be readily reared in the laboratory for formal genetic studies (Burton, 1983). As an extension of biochemical genetic analysis, allozyme frequency data from selected loci are utilized to examine patterns of genetic variation

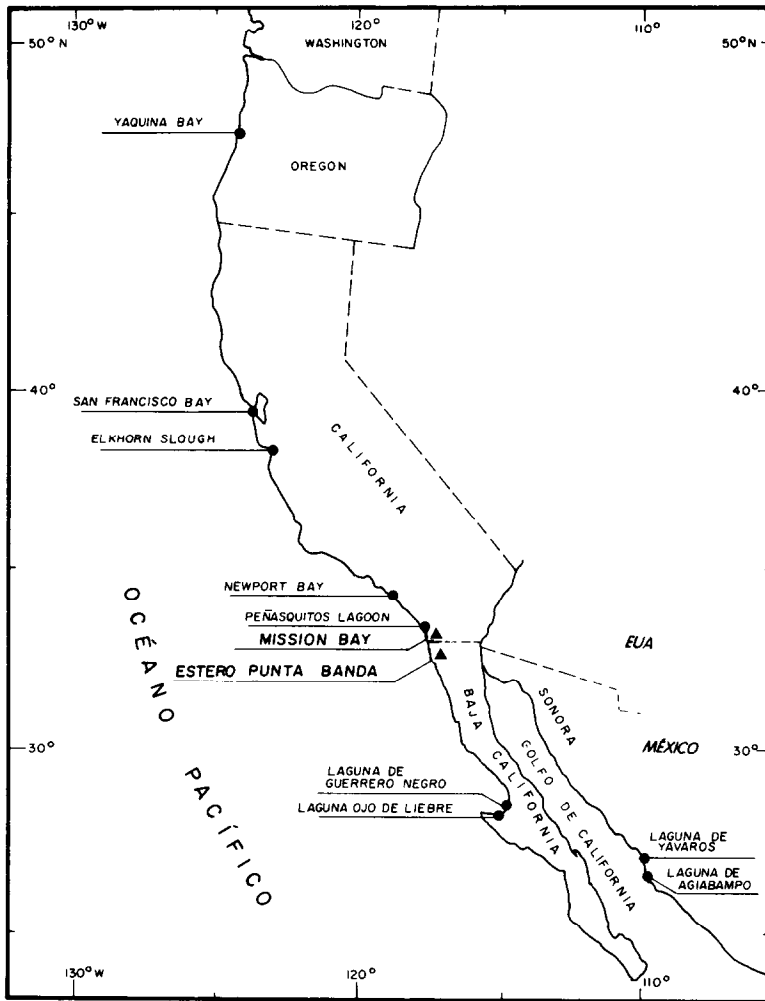


Figura 1. Distribución zoogeográfica conocida del copépodo calanoide marino *Acartia californiensis*. Los triángulos muestran los lugares muestreados.

Figure 1. Zoogeographic distribution known for the marine calanoid copepod *Acartia californiensis*. The triangles represent the sample sites.

frecuencia de aloenzimas de loci seleccionados se utilizan para examinar los patrones de la variación genética entre poblaciones naturales con amplia distribución geográfica (Bulnheim y Scholl, 1981).

El copépodo calanoide marino *Acartia californiensis* Trinast es una especie endémica del Pacífico nororiental restringida a cuerpos de

entre poblaciones naturales con una amplia distribución geográfica (Bulnheim and Scholl, 1981).

The marine calanoid copepod *Acartia Californiensis* Trinast is endemic of the northeastern Pacific, and restricted to estuaries and coastal lagoons (Trinast, 1976; Trujillo-Ortiz, 1986). This species has a zoogeographic distribution that extends from Yaquina Bay, OR

agua estuarinos y laguneros (Trinast, 1976; Trujillo-Ortíz, 1986). La distribución zoogeográfica de esta especie se extiende desde Yaquina Bay, Oregon (EUA), al norte, hasta las lagunas de Guerrero Negro y Ojo de Liebre, Baja California Sur (México). De acuerdo con Trujillo-Ortíz (1990), es probable que la distribución de este copépodo se extienda hasta la parte sur del golfo de California en las lagunas de Agiabampo y Yavaros, Sonora (México) (fig. 1). Diversos aspectos sobre la biología y ecología de esta especie han sido revisados por Trujillo-Ortíz (1990) y Trujillo-Ortíz y Arroyo-Ortega (1991). En los cuerpos de agua donde *A. californiensis* ha sido registrada, ésta domina más del 90% los ensamblajes zooplanctónicos.

Los propósitos de este trabajo son determinar la variación genética del copépodo calanoides marino *A. californiensis* en dos poblaciones cercanas (estero de Punta Banda, Baja California, México, y Mission Bay, California, EUA), utilizando microelectroforesis en gel de poliacrilamida, y estimar la similitud genética entre ellas, para explorar la importancia de los huevos diapásicos en la capacidad de dispersión de la especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las poblaciones de *A. californiensis* fueron recolectadas en arrastres subsuperficiales, utilizando una red estándar de plancton provista con malla Nytex monofilamentosa de 202 μm de luz de malla con copo de vidrio. Los arrastres se realizaron desde una embarcación de 22 pies de eslora con motor fuera de borda de 40 HP, tirando la red sujeta con un cabo, por un lado de la embarcación, en dirección circular. La duración de los arrastres dependió de la densidad zooplanctónica (nunca excedió 5 min). Las recolecciones vivas fueron transferidas a hieleras de plástico, tipo Thermo, que contenían agua de mar del lugar de recolección y fueron mantenidas perfectamente tapadas durante su transporte. Los lugares muestreados fueron el estero de Punta Banda (enero 29, 1994) y Mission Bay (febrero 4, 1994), durante la condición de marea alta. La distancia entre estos lugares es ~110 km.

(USA), to Guerrero Negro and Ojo de Liebre lagoons, BCS (Mexico). According to Trujillo-Ortíz (1990), it is possible that the distribution of this copepod extends as far as the southern part of the Gulf of California in the Agiabampo and Yavaros lagoons, Sonora (Mexico) (fig. 1). Different aspects of its biology and ecology have been reviewed by Trujillo-Ortíz (1990), and Trujillo-Ortíz and Arroyo-Ortega (1991). *Acartia californiensis* dominates more than 90% of the zooplankton assemblages in the bodies of water where it has been recorded.

The purposes of this paper are to determine genetic variation of the marine calanoid copepod *A. californiensis* from two close populations (Estero de Punta Banda, BC, Mexico and Mission Bay, CA, USA), using polyacrylamide gel microelectrophoresis, and estimate the genetic similarity between them in order to explore the importance of diapause eggs on the dispersion capability of the species.

MATERIALS AND METHODS

Populations of *A. californiensis* were collected subsuperficially using a standard plankton net with a 202 μm -mesh Nytex monofilament screen cloth with a glass cod end. Tows were made from a 22 ft long boat with a 40 HP outboard motor. The net was tied to a rope, thrown over the side of the boat, and towed in a circular direction. Towing times depended on the density of the zooplankton (never exceeding 5 min). Live samples were placed into Thermo type plastic ice chests containing sea water from the collection site and were kept perfectly covered during transport. The sampling sites were Estero de Punta Banda (29 January 1994) and Mission Bay (4 February 1994) during high tide. The distance between these locations is ~110 km.

The samples were immediately transported to the laboratory, and were allowed to settle for ~1 h. The precipitated material was siphoned off. A sieve was used to trap the organisms while almost half of the sea water from the ice chests was replaced with fresh filtered sea water. Oxygen and food consisting of *Isochrysis tahitiana* ($\sim 2 \times 10^4$ cell·ml⁻¹) were provided.

Las recolecciones fueron transportadas enseguida al laboratorio, donde se dejaron reposar aproximadamente una hora. Después, se sifoneó el material del fondo. Usando un tamiz para retener los organismos, se cambió cerca de la mitad del agua contenida en las hieleras, y se reemplazó con agua de mar fresca filtrada. Se les proveyó de aire y alimento compuesto de *Isochrysis tahitiana* ($\sim 2 \times 10^4$ cel·ml⁻¹).

Utilizando el fototactismo positivo que presenta *A. californiensis*, ésta fue separada del resto de los zooplanctones con ayuda de una lámpara de mano, con la que se hizo incidir el haz de luz sobre una de las esquinas de la hielera, bajo completa oscuridad. Una vez agrupados los copépodos, éstos fueron capturados con vasos de precipitado de 500 ml. Se reconcentraron y se colocaron en cajas Petri para revisarlos bajo el microscopio estereoscópico, de acuerdo con las características morfoanatómicas de los adultos descritas por Trinast (1976), Dawson (1980) y Trujillo-Ortiz (1986). Una vez revisados, fueron nuevamente dispuestos en los vasos de precipitado con agua de mar filtrada. Los zooplanctones extraños detectados fueron extraídos con una pipeta Pasteur.

Posteriormente, se separaron 1,100 organismos adultos de *A. californiensis* de ambos sexos, 550 por localidad, distribuyendo azarosamente 50 copépodos por enzima. La selección de los copépodos se realizó concentrándolos en vasos de precipitado, utilizando luz, y capturándolos con una pipeta Pasteur, cuyo contenido se vació sobre papel secante blanco. Inmediatamente que se visualizaron los individuos, fueron manipulados con cuidado, utilizando sólo la tensión superficial, con una microaguja entomológica No. 000 fijada a una pequeña varilla de bambú. Luego se colocaron en las depresiones (~ 6 mm de profundidad y 4.5 mm de diámetro) de placas de teflón que contenían 10 μ l de solución amortiguadora de trisborato de EDTA para electroforesis con pH de 8.9 (9.45 g de tris, 1.2 g de EDTA, 0.6 g de ácido bórico y 1 l de H₂O desionizada) con 10% de sacarosa y unas cuantas gotas de azul de bromofenol. Se maceraron en las depresiones con la ayuda de varillas de Plexiglás.

Since *A. californiensis* presents positive phototactism, a flashlight was used in total darkness to shine a beam of light on the corners of the ice chest and facilitate its separation from the rest of the zooplankters. Once the copepods were grouped, they were caught in 500 ml beakers. They were reconcentrated and placed in glass Petri dishes for microscopic identification, following the adult morphoanatomic characteristics described by Trinast (1976), Dawson (1980) and Trujillo-Ortiz (1986). Once examined, they were again placed in beakers with filtered sea water. Detected foreign zooplankters were extracted using a Pasteur pipette.

Later, 1,100 adult organisms of *A. californiensis* from both sexes were individually separated into two groups, 550 per location, and randomly distributed at 50 copepods per enzyme. Selection of the copepods was made by concentrating them in the beakers with light, catching them with a Pasteur pipette, and transferring the contents to white blotting paper. Immediately after the individuals were visualized, they were carefully manipulated, with superficial tension only, using a No. 000 entomological microneedle that was attached to a small bamboo stick. They were later placed in Teflon plate depressions (~ 6 mm deep and 4.5 mm wide) with 10 μ l of the buffer solution Trisborate EDTA with a pH of 8.9 (9.45 g Tris, 1.2 g EDTA, 0.6 g boric acid, and 1 l deionized H₂O) plus 10% sucrose and a few drops of bromophenol blue for electrophoresis. They were ground in the depressions with Plexiglas rods.

The crude tissue homogenate was extracted from the depressions with a micropipette and placed in each of the 25 wells, $\sim 4 \times 10$ mm, made *ex profeso* with combs in the upper part of each gel slabs.

The gel slabs consisted of 6% polyacrylamide w/v (3.98 g acrylamide, 0.210 g methylene bisacrylamide [BIS], 70 mg ammonium persulfate [AP], 70 ml Tris-borate EDTA buffer with a pH of 8.9 and 70 μ l tetramethylethylenediamine [TEMED], using sufficient amounts to prepare four gel slabs $\sim 169 \times 117 \times 0.8$ mm). Two gel slabs were used per enzyme and population. The polyacrylamide gel slabs

El tejido crudo homogeneizado se extrajo de las depresiones con una micropipeta y se vació en cada uno de los 25 espacios de ~4 x 10 mm hechos *ex profeso* con peines en la parte superior de cada placa de gel.

La placa de gel consistió en poliacrilamida al 6% p/v (3.98 g de acrilamida, 0.210 g de metileno de bisacrilamida [BIS], 70 mg de persulfato de amonio [AP], 70 ml de amortiguador trisborato de EDTA con pH de 8.9 y 70 µl de tetrametilenediamina [TEMED], en cantidad suficiente para preparar cuatro placas de gel de ~169 x 117 x 0.8 mm). Se utilizaron dos placas de gel por enzima y por población. Las placas de gel se prepararon 24 h antes de usarlas y se mantuvieron a la temperatura del ambiente. La microelectroforesis se realizó en un aparato para gel de poliacrilamida vertical.

Los geles fueron teñidos utilizando las 11 enzimas específicas que se listan más adelante. El tamaño pequeño de los adultos de *A. californiensis* (~0.859 mm los machos y ~1.008 mm las hembras), únicamente permitió ensayar una proteína por individuo. Se utilizó un sólo sistema amortiguador, trisborato de EDTA con pH de 8.9.

Las soluciones de los 11 sistemas enzimáticos ensayados y modificados de Harris y Hopkinson (1977) fueron:

1. Glutamato - piruvato - transaminasa (GPT): 10 mg de NADH, 40 mg de α-cetoglutarato, 80 mg de L-alanina, 5 ml de tris HCl (1 M) con pH 8.0, 30 ml de H₂O desionizada, 10 µl de deshidrogenasa láctica. (Se usó papel filtro para cubrir el gel y se vio bajo luz UV.)

2. Deshidrogenasa málica (MDH): 15 mg de NAD, 10 mg de MTT, 5 mg de metosulfato de fenazina (PMS), 40 mg de ácido málico, 5 ml de tris HCl (1 M) con pH 8.0, 150 ml de H₂O desionizada.

3. Esterasa (EST): 30 mg de α-acetato de naftilo, 30 mg de β-acetato de naftilo, 60 mg de Fast Garnet, 4 ml de acetona (para disolver los sustratos), 150 ml de amortiguador de fosfato (0.1 M) con pH 6.5.

4. Leucin-aminopeptidasa (LAP): 25 mg de L-leucina-β-naftilamida, 40 mg de Fast Black K, 4 ml de acetona (para disolver los

were prepared 24 h before use and stored at room temperature. The microelectrophoresis was carried out in a vertical polyacrylamide gel apparatus.

The gels were stained using the 11 specific enzymes listed below. Due to the small size of the *A. californiensis* adults (~0.859 mm for males and ~1.008 mm for females), only single protein assays could be conducted per individual. Only one buffer system was used, Trisborate EDTA at a pH of 8.9.

The recipes of the 11 enzymatic systems assayed and modified from Harris and Hopkinson (1977) were:

1. Glutamate - pyruvate - transaminase (GPT): 10 mg NADH, 40 mg α-ketoglutarate, 80 mg L-alanine, 5 ml Tris-HCl (1 M) at pH 8.0, 30 ml deionized H₂O, 10 µl lactic dehydrogenase. (The gel was covered with filter paper and observed under UV light.)

2. Malic dehydrogenase (MDH): 15 mg NAD, 10 mg MTT, 5 mg phenazine methosulfate (PMS), 40 mg malic acid, 5 ml Tris-HCl (1 M) at pH 8.0, 150 ml deionized H₂O.

3. Esterase (EST): 30 mg α-naphthyl acetate, 30 mg β-naphthyl acetate, 60 mg Fast Garnet, 4 ml acetone (for dissolving substrates), 150 ml phosphate buffer (0.1 M) at pH 6.5.

4. Leucine aminopeptidase (LAP): 25 mg L-leucine β-naphthylamide, 40 mg Fast Black K, 4 ml acetone (for dissolving substrates), 150 ml phosphate buffer (0.1 M) at pH 6.5.

5. Arginine phosphokinase (APK): 15 mg arginine phosphate, 10 mg ADP, 100 mg glucose (dextrose), 8 mg NADP, 8 mg MTT, 5 mg PMS, 5 ml Tris-HCl (1 M) at pH 8.0, 2 ml MgCl₂ (0.2 M), 150 ml deionized H₂O, 10 µl G-6-PDH, 10 µl hexokinase. (It was stained in the dark.)

6. Phosphoglucosmutase (PGM): 8 mg NADP, 5 mg PMS, 10 mg MTT, 100 mg glucose-1-phosphate, 5 ml Tris-HCl (1 M) at pH 8.0, 2 ml MgCl₂ (0.2 M), 150 ml deionized H₂O, 10 µl G-6-PDH. (It was stained in the dark.)

7. Glutamate-oxaloacetate-transaminase (GOT): 40 mg α-ketoglutarate, 10 mg NADH, 8 mg L-aspartic acid, 5 ml Tris-HCl (1 M) at

sustratos), 150 ml de amortiguador de fosfato (0.1 M) con pH 6.5.

5. Arginina-fosfoquinasa (APK): 15 mg de fosfato de arginina, 10 mg de ADP, 100 mg de glucosa (dextrosa), 8 mg de NADP, 8 mg de MTT, 5 mg de PMS, 5 ml de tris HCl (1 M) con pH 8.0, 2 ml de MgCl₂ (0.2 M), 150 ml de H₂O desionizada, 10 µl de G-6-PDH, 10 µl de hexoquinasa. (Se tiñó en la oscuridad.)

6. Fosfoglucomutasa (PGM): 8 mg de NADP, 5 mg de PMS, 10 mg de MTT, 100 mg de glucosa-1-fosfato, 5 ml de tris HCl (1 M) con pH 8.0, 2 ml de MgCl₂ (0.2 M), 150 ml de H₂O desionizada, 10 µl de G-6-PDH. (Se tiñó en la oscuridad.)

7. Glutamato-oxaloacetato-transaminasa (GOT): 40 mg de α-cetoglutarato, 10 mg de NADH, 8 mg de L-ácido aspártico, 5 ml de tris HCl (1 M) con pH 8.0, 30 ml de H₂O desionizada, 10 ml de deshidrogenasa málica. (Se usó papel filtro para cubrir el gel y se vio bajo luz UV.)

8. Hexoquinasa (HK): 100 mg de glucosa, 100 mg de fructosa, 40 mg de ATP, 10 mg de NADP, 8 mg de MTT, 5 mg de PMS, 5 ml de tris HCl (1 M) con pH 8.0, 2 ml de MgCl₂ (0.2 M), 150 ml de H₂O desionizada, 10 µl G-6-PDH. (Se tiñó en la oscuridad.)

9. Enzima málica (ME): 60 mg de L-ácido málico, 8 mg de NADP, 8 mg de MTT, 4 mg de PMS, 5 ml de tris HCl (1 M) con pH 8.0, 2 ml de MgCl₂ (0.2 M), 150 ml de H₂O desionizada. (Se tiñó en la oscuridad.)

10. Fosfoglucomutasa (PGI): 8 mg de NADP, 5 mg de PMS, 10 mg de MTT, 35 mg de fructosa-6-fosfato, 5 ml de tris HCl (1 M) con pH 8.0, 2 ml de MgCl₂ (0.2 M), 150 ml de H₂O desionizada, 10 µl de G-6-PDH. (Se tiñó en la oscuridad.)

11. Fumarato-hidratasa = fumarasa (FH = FUM): 5 ml de tris HCl (1 M) con pH 8.0, 100 mg de fumarato de sodio, 20 mg de NAD, 10 mg de MTT, 5 mg de PMS, 10 µl de deshidrogenasa málica, 150 ml de H₂O desionizada. (Se tiñó en la oscuridad.)

Para preparar 200 ml de amortiguador fosfato 0.1 M, se usaron 68.5 ml de fosfato de sodio monobásico monohidratado 0.2 M (27.8 g·l⁻¹), 31.5 ml de fosfato de sodio dibásico

pH 8.0, 30 ml deionized H₂O, 10 ml malic dehydrogenase. (It was covered with filter paper and observed under UV light.)

8. Hexokinase (HK): 100 mg glucose, 100 mg fructose, 40 mg ATP, 10 mg NADP, 8 mg MTT, 5 mg PMS, 5 ml Tris-HCl (1 M) at pH 8.0, 2 ml MgCl₂ (0.2 M), 150 ml deionized H₂O, 10 µl G-6-PDH. (It was stained in the dark.)

9. Malic enzyme (ME): 60 mg L-malic acid, 8 mg NADP, 8 mg MTT, 4 mg PMS, 5 ml Tris-HCl (1 M) at pH 8.0, 2 ml MgCl₂ (0.2 M), 150 ml deionized H₂O. (It was stained in the dark.)

10. Phosphoglucose isomerase (PGI): 8 mg NADP, 5 mg PMS, 10 mg MTT, 35 mg fructose-6-phosphate, 5 ml Tris-HCl (1 M) at pH 8.0, 2 ml MgCl₂ (0.2 M), 150 ml deionized H₂O, 10 µl G-6-PDH. (It was stained in the dark.)

11. Fumarate hydratase = fumarase (FH = FUM): 5 ml Tris-HCl (1 M) at pH 8.0, 100 mg sodium fumarate, 20 mg NAD, 10 mg MTT, 5 mg PMS, 10 µl malic dehydrogenase, 150 ml deionized H₂O. (It was stained in the dark.)

In order to prepare 200 ml of 0.1 M phosphate buffer, 68.5 ml of 0.2 M monobasic monohydrated sodium phosphate (27.8 g·l⁻¹), 31.5 ml of 0.2 M dibasic heptahydrated sodium phosphate (53.65 g·l⁻¹) and 100 ml of deionized H₂O were used and the pH was adjusted to 6.5.

The microelectrophoresis was run at 120 V and 7°C. The running times of the enzymatic systems were 2 h for EST and LAP; 3 h for FUM, PGI, GOT, ME, and APK; 4 h for PGM, HK, GPT and MDH.

The most common allele (standard) in each locus was registered in each gel, and was designated as allele 100. The other alleles were numerically assigned by dividing the migratory distance from the origin, in millimeters, by the migratory distance of the standard allele. The allelic frequency of each locus from both populations sampled was determined. The juxtapositions in each gel of the individuals from the populations were used for comparing the allelic identities. Option 3 (allelic designation A, B, C,

heptahidratado 0.2 M (53.65 g·l⁻¹) y 100 ml H₂O desionizada, y se ajustó el pH a 6.5.

La microelectroforesis se llevó a cabo a 120 V y 7°C. Los tiempos de corrida para los sistemas enzimáticos fueron: 2 h para EST y LAP; 3 h para FUM, PGI, GOT, ME y APK; 4 h para PGM, HK, GPT y MDH.

En cada gel se registró el alelo más común (estándar) de cada locus, designado como alelo 100. Los otros alelos se designaron numéricamente, dividiendo la distancia de migración desde el origen (en milímetros) entre la distancia de migración del alelo estándar. Se determinó la frecuencia alélica de cada locus de las dos poblaciones muestreadas. Las identidades alélicas se compararon por yuxtaposición de los individuos de las poblaciones en cada gel. Se utilizó la opción 3 (designación alélica A, B, C, etc., empezando con el que corrió la mayor distancia del origen al ánodo) del programa de estadística BIOSYS-1 (Swofford y Selander, 1989), para determinar la variación genética de cada población considerando: el número promedio de alelos por locus (\bar{n}_a), proporción de individuos heterocigóticos (H) y proporción de loci polimórficos al nivel $P_{0.95}$. Se cuantificó la distancia genética de Nei (1978) y el apartamiento del equilibrio de Hardy-Weinberg con la prueba de χ^2 (Sokal y Rohlf, 1981), a la cual se aplicó la corrección de Levene (1949) para muestras pequeñas. Ayala y Kiger (1984) escribieron un excelente texto donde desarrollan y explican los estimadores genéticos aquí utilizados para procesar los datos obtenidos en los zimogramas.

RESULTADOS

Acartia californiensis reveló patrones de bandeo (zimogramas) confiables, a través de microelectroforesis vertical en placas de gel de poliacrilamida, para seis sistemas enzimáticos. La variación de *A. californiensis* fue monomórfica en siete loci, EST-1, LAP-1, APK-1, APK-2, GOT-1, GOT-2 y ME-1, y polimórfica en PGI-1 (tabla 1). Aunque se encontraron en total diez alelos en PGI-1, no todos se presentaron en las dos poblaciones muestreadas. En relación con las frecuencias alélicas entre ambas poblaciones (tabla 1), PGI-1 reveló que el alelo

etc., starting with the allele that moved the greatest distance from the origin to the anode) from the computer program BIOSYS-1 (Swofford and Selander, 1989) was used to determine the genetic variation of each population sampled using the average number of alleles per locus (\bar{n}_a), the proportion of heterozygote individuals (H) and the proportion of polymorphic loci at level $P_{0.95}$. Nei's genetic distance (1978) was quantified and deviations from the Hardy-Weinberg equilibrium using the χ^2 test (Sokal and Rohlf, 1981) to which Levene's (1949) correction for small samples was applied. Ayala and Kiger (1984) presented an excellent study where they develop and explain the genetic estimators used here for processing the data obtained in the zymograms.

RESULTS

Acartia californiensis revealed reliable banding patterns (zymograms) in six enzymatic systems using polyacrylamide gels in vertical microelectrophoresis. The variation of *A. californiensis* was monomorphic in seven loci, EST-1, LAP-1, APK-1, APK-2, GOT-1, GOT-2 and ME-1, and polymorphic in PGI-1 (table 1). Although a total of ten alleles was found in PGI-1, not all were present in both populations sampled. With regard to the allelic frequencies between both populations (table 1), PGI-1 revealed that the most common allele was C. However, there are alleles present in Estero de Punta Banda, A, B, G and E, that do not appear in Mission Bay where alleles D, F, H, I and J do appear, but not in Estero de Punta Banda. With the exception of alleles B, C, and D, those remaining present a frequency less than 0.1, indicating that they are rare alleles. Allele B is only present in Estero de Punta Banda with a frequency of 0.24, and allele D only in Mission Bay with a frequency of 0.16.

The average number of alleles per locus was similar in both locations, 1.5 ± 0.5 for Estero de Punta Banda and 1.6 ± 0.6 for Mission Bay. Of the loci analyzed from both populations, only PGI-1 was polymorphic ($P_{0.95} = 0.125$; table 2).

Tabla 1. Frecuencias alélicas de los ocho loci para las poblaciones de *Acartia californiensis*.

Table 1. Allelic frequencies of the eight loci from the populations of *Acartia californiensis*.

Locus	Código	Alelo	Poblaciones	
			PB (50)	MB (50)
EST-1	C	100	1.00	1.00
LAP-1	C	100	1.00	1.00
APK-1	C	100	1.00	1.00
APK-2	C	100	1.00	1.00
GOT-1	C	100	1.00	1.00
GOT-2	C	100	1.00	1.00
ME-1	C	100	1.00	1.00
PGI-1	C	100	1.00	1.00
	J	43	0	0.06
	I	61	0	0.04
	H	71	0	0.04
	G	75	0.02	0
	F	82	0	0.04
	E	86	0.08	0
	D	89	0	0.16
	C	100	0.64	0.66
	B	114	0.24	0
	A	142	0.02	0

PB, estero de Punta Banda; MB, Mission Bay; (50), número de genomas ensayados; A,B,C, etc., código asignado para la opción 3 del programa BIOSYS-1.

PB, Estero de Punta Banda; MB, Mission Bay; (50), number of genomes assayed; A,B,C, etc., code assigned from option 3 of the program BIOSYS-1.

más común fue C. Sin embargo, se encontraron alelos en el estero de Punta Banda, A, B, G y E, que no aparecieron en Mission Bay, donde, a su vez, hubo otros, D, F, H, I y J, que no se encontraron en Punta Banda. Con excepción de los alelos B, C y D, los restantes presentaron una frecuencia menor de 0.1, lo que indica que son alelos raros. El alelo B únicamente se presentó en el estero de Punta Banda, con una frecuencia de 0.24, y el D sólo en Mission Bay, con una frecuencia de 0.16.

El número promedio de alelos por locus fue similar en ambas localidades, 1.5 ± 0.5 para el estero de Punta Banda y 1.6 ± 0.6 para Mission Bay. De los loci analizados para ambas poblaciones sólo PGI-1 fue polimórfico ($P_{0.95} = 0.125$; tabla 2).

The heterozygosity in Estero de Punta Banda was 0.060 ± 0.060 and 0.035 ± 0.035 in Mission Bay. There was a statistically significant heterozygote deficiency in the Mission Bay population ($D = -0.477$) when compared to the expected deviation of the Hardy-Weinberg equilibrium, but not in Estero de Punta Banda ($D = -0.096$; table 2, 3 and 4; $p \leq 0.001$), that, as can be observed, was governed by PGI-1 in all cases.

The genotype frequencies for the aggregated values in PGI-1 in Estero de Punta Banda were not significantly different ($\alpha = 0.01$; $p = 0.314$), while Mission Bay presented highly significant differences ($p \leq 0.01$; table 4).

The most frequent genotypes observed in Estero de Punta Banda were C-C and B-C

Tabla 2. Variación genética de cada población de *Acartia californiensis* ensayada por: 1) número promedio de alelos por locus; 2) polimorfismo ($P_{0.95}$), frecuencia de loci para los cuales la frecuencia del alelo más común no es mayor que 0.95, y 3) heterocigidad (H), frecuencia de individuos heterocigotos promediada de todos los loci.

Table 2. Genetic variation for each population of *Acartia californiensis* assayed by: 1) average number of alleles per locus; 2) polymorphism ($P_{0.95}$), the frequency of loci for which the frequency of the most common allele is not greater than 0.95, and 3) heterozygosity (H), frequency of heterozygote individuals averaged over all loci.

Muestra	No. de loci	No. de alelos por locus	$P_{0.95}$	Heterocigidad		S
				H_o	H_e	
PB	8	1.5 ± 0.5	0.125	0.060 ± 0.060	0.066 ± 0.066	ns
MB	8	1.6 ± 0.6	0.125	0.035 ± 0.035	0.067 ± 0.067	ns
Promedio global		1.55 ± 0.05	0.125	0.048 ± 0.013	0.067 ± 0.0005	ns

H_o , heterocigidad observada; H_e , heterocigidad esperada; ns, no significativo; PB, estero de Punta Banda; MB, Mission Bay.

H_o , observed heterozygosity; H_e , expected heterozygosity; ns, not significant; PB, Estero de Punta Banda; MB, Mission Bay.

Tabla 3. Heterocigidad determinada de la frecuencia alélica para PGI-1 de *Acartia californiensis*.

Table 3. Heterozygosity determined from the allelic frequency of PGI-1 of *Acartia californiensis*.

Población	Locus	Heterocigidad		S
		H_o	H_e	
PB	PGI-1	0.480	0.531	ns
MB	PGI-1	0.280	0.536	ns

H_o , heterocigidad observada; H_e , heterocigidad esperada; PB, Punta Banda; MB, Mission Bay; ns, no significativo.

H_o , observed heterozygosity; H_e , expected heterozygosity; PB, Punta Banda; MB, Mission Bay; ns, not significant.

La heterocigidad en el estero de Punta Banda fue 0.060 ± 0.060 y en Mission Bay 0.035 ± 0.035 . Hubo una deficiencia en la heterocigidad estadísticamente significativa comparada con el apartamiento del equilibrio de Hardy-Weinberg esperado en la población de Mission Bay ($D = -0.477$), pero ésta no se dio en el estero de Punta Banda ($D = -0.096$; tablas 2, 3 y 4; $p \leq 0.001$), donde, como se observa, dominó en todos los casos PGI-1.

Las frecuencias genotípicas de PGI-1 en el estero de Punta Banda para los valores agrupados no fueron significativamente diferentes ($\alpha =$

(table 5). It appears that allele C is more frequent in homozygote condition since the rest of the genotypes where this allele intervenes have very low or no frequencies, with the exception of genotype B-C. The inverse occurs with allele B where, in homozygote condition, its observed frequency is 2; however, the genotype B-C presents a higher value of 16. In the rest of the genotypes where B participates, the frequency is low or null. The D statistic (heterozygote difference) for this population was -0.096 , which is not statistically significant ($\chi^2 = 1.013$; $p = 0.314$).

Tabla 4. Prueba χ^2 para determinar la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg para el locus PGI-1, por agrupamiento de clases en cada población de *Acartia californiensis*.

Table 4. χ^2 test for determining deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium for the locus PGI-1 by grouping the classes in each population of *Acartia californiensis*.

Población	Locus	Clase	H_o	H_e	χ^2	g.l.	p	D
PB	PGI-1	Homocigotos para el alelo más común	22	20.364				
		Heterocigotos comunes raros	20	23.273				
		Heterocigotos raros y otros heterocigotos	8	6.364	1.013	1	0.314	-0.096
MB	PGI-1	Homocigotos para el alelo más común	28	21.667				
		Heterocigotos comunes raros	10	22.667				
		Heterocigotos raros y otros heterocigotos	12	5.667	16.008	1	0.000	-0.477

PB, estero de Punta Banda; MB, Mission Bay; H_o , heterocigocidad observada; H_e , heterocigocidad esperada; g.l., grados de libertad; p, nivel de significación.

PB, Estero de Punta Banda; MB, Mission Bay; H_o , observed heterozygosity; H_e , expected heterozygosity; g.l., degrees of freedom; p, significance level.

0.01; $p = 0.314$); mientras que en Mission Bay se presentaron diferencias altamente significativas ($p \leq 0.01$; tabla 4).

Los genotipos más frecuentes observados en el estero de Punta Banda fueron C-C y B-C (tabla 5). Parece ser que el alelo C es más frecuente en condición homocigota dado que, a excepción del genotipo B-C, el resto de los genotipos donde interviene este alelo tienen frecuencias observadas muy bajas o nulas. Lo inverso sucede con el alelo B donde, en condición homocigota, su frecuencia observada es de 2; sin embargo, el genotipo B-C presenta el valor más alto, 16. En el resto de los genotipos donde participa B, la frecuencia es baja o nula. El estadígrafo D (diferencia heterocigótica) para esta población fue de -0.096, el cual no es estadísticamente significativo ($\chi^2 = 1.013$; $p = 0.314$).

Para Mission Bay, nuevamente el alelo C y el genotipo C-C son de alta frecuencia, y en condición heterocigota sus frecuencias son bajas. Les sigue en orden de importancia el

Allele C and the genotype C-C in Mission Bay have high frequencies, and under heterozygote condition their frequencies are low. The homozygote genotype D-D follows in order of importance with an observed frequency of 6; however, with the exception of the genotype D-I, the heterozygotes are absent where this allele participates. The value of D for this population was -0.477, which indicates a statistically significant deficiency of heterozygotes ($\chi^2 = 16.008$; $p < 0.001$).

The statistical value of genetic identity I (Nei, 1978), calculated from the allelic frequencies between the populations, is high, 0.994, and the statistical value of genetic distance D (Nei, 1978) is low, 0.006, with evidence of indifferentiation.

DISCUSSION

The causes that promote the presence of distinct heterozygote genotypes and different grades of heterozygote deficiency in the pop-

Tabla 5. Frecuencia genotípica del equilibrio de Hardy-Weinberg para el locus PGI-1, en cada una de las poblaciones muestreadas de *Acartia californiensis*.

Table 5. Genotype frequency from the Hardy-Weinberg equilibrium in locus PGI-1 in each of the populations sampled of *Acartia californiensis*.

Población	Locus	Clase	H_o	H_e
PB	PGI-1	A-A	0	0.010
		A-B	2	0.485
		A-C	0	1.293
		A-E	0	0.162
		A-G	0	0.040
		B-B	2	2.788
		B-C	16	15.515
		B-E	2	1.939
		B-G	0	0.485
		C-C	22	20.364
		C-E	2	5.172
		C-G	2	1.293
		E-E	2	0.283
		E-G	0	0.162
G-G	0	0.010		
MB	PGI-1	C-C	28	21.667
		C-D	0	10.667
		C-F	0	2.667
		C-H	4	2.667
		C-I	0	2.667
		C-J	6	4.000
		D-D	6	1.212
		D-F	0	0.646
		D-H	0	0.646
		D-I	4	0.646
		D-J	0	0.970
		F-F	2	0.061
		F-H	0	0.162
		F-I	0	0.162
		F-J	0	0.242
		H-H	0	0.061
		H-I	0	0.162
		H-J	0	0.242
I-I	0	0.061		
I-J	0	0.242		
J-J	0	0.152		

PB, estero de Punta Banda; MB, Mission Bay; H_o , heterocigocidad observada; H_e , heterocigocidad esperada.

PB, Estero de Punta Banda; MB, Mission Bay; H_o , observed heterozygosity; H_e , expected heterozygosity.

genotipo homocigoto D-D, cuya frecuencia observada es de 6; sin embargo, los heterocigotos donde participa este alelo, con excepción del genotipo D-I, están ausentes. El valor de D para esta población es de -0.477, que indica una deficiencia de heterocigotos estadísticamente significativa ($\chi^2 = 16.008$; $p < 0.001$).

El valor estadístico de identidad genética I (Nei, 1978), calculado a partir de las frecuencias alélicas entre las poblaciones, es alto, 0.994, y el valor de la distancia genética D (Nei, 1978) es bajo, 0.006, con evidencias de indiferenciación.

DISCUSION

Las causas que originan la presencia de distintos genotipos heterocigotos y diferentes grados de deficiencia heterocigótica en las poblaciones estudiadas del estero de Punta Banda y Mission Bay pueden ser diversas. En primer lugar, las fuerzas estocásticas y determinísticas conllevan a la configuración génica de cada población, tal es el caso de los procesos de mutación, migración, selección natural y deriva génica (Burton, 1987, 1990). El grado de participación de cada una de ellas puede ser diferente, ya que es función de la biología de la especie, su posible origen geográfico o sus preferencias térmicas. Aunado a lo anterior, su hábitat restringido a cuerpos de agua semicerrados, como los esteros y lagunas costeras, origina que estas poblaciones estén parcialmente aisladas. Sin embargo, dado que *A. californiensis* produce huevos diapáusicos o de reposo, éstos pueden, en tal condición, ser transportados fuera o dentro de éstos cuerpos de agua (dispersión pasiva de huevos diapáusicos), conducidos hacia el sur por la corriente de California, de Mission Bay al estero de Punta Banda, o al norte por la contracorriente costera de Davidson, del estero de Punta Banda a Mission Bay. Es probable que este patrón de flujos de agua mantenga las frecuencias alélicas y genotípicas similares o muy cercanas entre sí.

Burton y Feldman (1982) y Burton (1983) hicieron revisiones donde presentan evidencias de que el comportamiento diferenciado de

ulaciones studied in Estero de Punta Banda and Mission Bay can be diverse. In the first place, the stochastic and deterministic powers promote the genetic configuration of each population, such as the processes of mutation, migration, natural selection and genetic drift (Burton, 1987, 1990). The grade of participation of each one of these can be different, since it is a function of the species biology, its possible geographic origin or thermal preference. Adding to the above, its restrictive habitat of semi-enclosed bodies of water, such as estuaries and coastal lagoons, provides that these populations are partially isolated. However, given that *A. californiensis* produces diapause or resting eggs, these can, under such conditions, be transported from or to these bodies of water and carried (passive dispersal of diapause eggs) southward by the California Current (Mission Bay to Estero de Punta Banda) or northward by Davidson's Coastal Countercurrent (Estero de Punta Banda to Mission Bay). It is possible that this flow pattern maintains similar or very close allelic and genotypical frequencies between both populations.

In reviews made by Burton and Feldman (1982) and Burton (1983), they present evidence that the differentiated behavior of some molluscan and crustacean species, that appear to have great dispersal and recruitment capacity, is sufficient to control them. The species present a significant differentiation between populations due to the restricted genetic flow. These authors hypothesize that the differences in the structure of these populations and those of other species are a result of some adaptive advantage for preventing passive dispersal. With this, they avoid being transported to potentially hostile environments outside of the region where their parents have successfully reproduced. They believe that there is truly little evidence of extensive genetic flow between populations of geographically separated invertebrates. Even in the species considered as good candidates for transoceanic dispersal, such as the gastropod mollusc *Littorina littorea*, the genetic data are clearly incompatible with any genetic flow of transoceanic character.

algunas especies de moluscos y crustáceos, que parecen tener alta capacidad de dispersión y reclutamiento, es suficiente para controlarlas, y éstas muestran una significativa diferenciación poblacional debido a la restricción del flujo genético. Estos autores presentan la hipótesis de que las diferencias en la estructura poblacional entre éstas y otras especies son el resultado de alguna ventaja adaptativa con la que previenen la dispersión pasiva, al evitar ser transportadas a ambientes potencialmente hostiles, fuera de la región donde sus ancestros se han reproducido exitosamente. Afirman, además, que realmente existe muy poca evidencia de flujo genético extenso de invertebrados entre poblaciones geográficamente separadas. Aun en especies consideradas como buenas candidatas para llevar a cabo una dispersión transoceánica, como el molusco gasterópodo *Littorina littorea*, los datos genéticos son claramente incompatibles con cualquier flujo genético de carácter transoceánico.

Entre los crustáceos revisados por Burton y Feldman (1982) y Burton (1983) se presenta el caso de sólo una especie de copépodo harpacticóide confinado a pozas intermareales, *Tigriopus californicus*, que parece poseer una considerable capacidad de dispersión pasiva, pero los datos demuestran que su transporte genético a lo largo de la costa es extremadamente bajo. Entre los posibles mecanismos utilizados por este copépodo para prevenir la dispersión pasiva están el aferrarse al sustrato o el nadar activamente para mantenerse y regresar a las pozas supralitorales después del lavado mareal. Bozic (1975) presenta pruebas del segundo mecanismo a partir de observaciones hechas con una especie de *Tigriopus*, y señala que ésta se mueve preferentemente a lugares que han sido ocupados previamente por adultos coespecíficos. Este proceso es altamente significativo para *T. californicus*, ya que en estudios combinados de polimorfismo enzimático y trasplantes en el campo, Burton y Swisher (1984) han demostrado un intenso flujo genético entre los organismos que habitan pozas intermareales localizadas en una misma prominencia rocosa, mientras que tal flujo está altamente restringido entre las poblaciones situadas en pozas de prominencias rocosas vecinas (< 1 km).

Among the crustaceans reviewed by Burton and Feldman (1982) and Burton (1983) there is only one species of harpacticoid copepod confined to intertidal pools, *Tigriopus californicus*, that appears to possess a considerable capacity for passive dispersal, but the data demonstrate that its genetic transport along the coast is extremely low. Among the possible mechanisms used by this copepod for preventing passive dispersal are to grasp to the substrate or actively swim to remain in or return to the supralittoral pools after being washed out. Bozic (1975) presents proof of the second mechanism from observations made with the species *Tigriopus*, and shows that it moves preferably to vessels that have been previously occupied by conspecific adults. This process is highly significant for *T. californicus*, since in combined studies of enzymatic polymorphism and transplants in the field, Burton and Swisher (1984) have demonstrated an intense genetic flow between the organisms that inhabit intertidal pools located on the same rocky outcrop, while said flow is highly restricted between populations situated in pools on neighboring outcrops (< 1 km).

Acartia californiensis is a copepod species entirely different from *T. californicus*. It is completely pelagic, confined to estuaries and has never been recorded among the larval or adult members of the oceanic plankton communities, where adverse conditions evidently exist for its survival. It can also be included in the group of organisms that avoids being passively transported by currents; however, it appears that the egg stage does not guarantee it this condition.

Trinast (1975) affirms that current systems strongly influence retention, translocation and dispersion of populations, and that the conservation of the *Acartia* n. sp. (*A. californiensis*) population can partially be explained by their tendency to congregate on the bottom during tidal reflux and enter eddy systems; however, it is possible that not all of the eggs are retained and some of them are transported to the open sea.

According to Bucklin *et al.* (1989), the relationship between biological and physical structures can provide important information on how

Acartia californiensis es una especie de copépodo completamente diferente de *T. californicus*. Es una especie netamente pelágica, confinada en cuerpos de agua estuarinos y nunca registrada entre los miembros larvales o adultos de las comunidades planctónicas oceánicas, donde evidentemente existen condiciones adversas para su existencia, y puede incluirse en el grupo de organismos que evitan ser transportados pasivamente por corrientes; sin embargo, parece que el estado de huevo no le garantiza esta condición.

Trinast (1975) afirma que los sistemas de corrientes ejercen una fuerte influencia en la retención, translocación y dispersión de poblaciones, y que la conservación de la población de *Acartia* n. sp. (*A. californiensis*) puede parcialmente explicarse por la tendencia a congregarse en el fondo durante el refluo marea, yéndose a los sistemas de giros; sin embargo, es probable que no todos los huevos sean retenidos y parte de ellos salgan a mar abierto.

De acuerdo con Bucklin *et al.* (1989), la relación entre las estructuras biológica y física puede aportar valiosa información respecto a la contribución de la dinámica del océano a la variabilidad biológica de los organismos. Se ha visto que las aloenzimas son altamente variables en algunas especies zooplanctónicas (Bucklin y Marcus, 1985; Bucklin, 1986; Bucklin y Wiebe, 1986), y pueden ser útiles para diferenciar poblaciones y rastrear patrones de dispersión. Al respecto, Bucklin *et al.* (1989) utilizaron, en un primer intento, la variabilidad aloenzimática como indicadora de patrones de dispersión del copépodo calanoide *Metridia pacifica*, en un filamento frío con flujo de chorro que se alejaba de la costa norte de California (filamento costero). Los datos genéticos señalan que las poblaciones de este copépodo, en la fuente costera del filamento, eran genéticamente heterogéneas, y había aislamiento de poblaciones debido a que los procesos de mezcla dados a través del filamento no fueron suficientes para homogeneizar las poblaciones atrapadas en remolinos por varias generaciones (meses). En el caso de *A. californiensis*, especie restringida a cuerpos de agua costeros semicerrados, como esteros y lagunas costeras, y que produce hue-

ocean dynamics contribute to the biological variability of organisms. It has been observed that allozymes are highly variable in some zooplanktonic species (Bucklin and Marcus, 1985; Bucklin, 1986; Bucklin and Wiebe, 1986), and they can be useful in differentiating populations and tracing dispersal patterns. To that respect, Bucklin *et al.* (1989) first attempted to utilize allozymic variability to indicate dispersal patterns of the calanoid copepod *Metridia pacifica* in a cool filament with an offshore flowing jet extending from the northern California coast (coastal filament). The genetic data indicated that the populations of this copepod at the coastal source of the filament were genetically heterogenous, presenting isolated populations due to the insufficient mixing processes in the filament to homogenize the populations that are trapped in eddies for several generations (months). In the case of *A. californiensis*, a species restricted to semi-enclosed coastal bodies of water such as estuaries and coastal lagoons, and that produces diapause eggs under unfavorable temperature conditions, it is possible that they remain in this condition during their open-ocean experience, while they confront mainly unfavorable temperatures. However, this is not conclusive since it requires more specific studies that supply elements to support this hypothesis.

There are close to 21 species of copepods that lay diapause facultative eggs, pertaining to the Temoridae, Centropagidae, Pontellidae, Acartiidae, and Metridae families which are present in temperate coastal waters (Grice and Marcus, 1981). According to Johnson (1980), the resting stage of the eggs allows the majority of the neritic and estuarine coastal species of copepods to survive periods during which environmental conditions are unfavorable. This diapause condition can be a physiological response of the female to a changing environment that modifies the eggs, or a response of the eggs while they sink through the water column and reach the bottom sediment. Johnson (1980) found in experiments on *A. californiensis* in the Yaquina Bay region of Oregon, that the induction of the diapause eggs of this species depends fundamentally on a temperature lower

vos diapáusicos bajo condiciones desfavorables de temperatura, es probable que éstos permanezcan en esa condición durante el tiempo que duran en mar abierto, enfrentándose principalmente a temperaturas desfavorables. Sin embargo, esto no es concluyente, ya que se requieren estudios más específicos, que aporten elementos para apoyar la hipótesis planteada.

Existen cerca de 21 especies de copépodos que presentan huevos diapáusicos facultativos pertenecientes a las familias Temoridae, Centropagidae, Pontellidae, Acartiidae y Metridae, presentes en aguas templadas costeras (Grice y Marcus, 1981). Según Johnson (1980), el estado de reposo de los huevos permite que la mayoría de las especies de copépodos costeros neríticos y estuarinos sobrevivan periodos durante los cuales las condiciones del medio son desfavorables. La condición diapáusica puede resultar como una respuesta fisiológica de la hembra a un medio cambiante que modifica los huevos o como una respuesta de los huevos mientras se hunden a través de la columna de agua hasta alcanzar el sedimento del fondo. Johnson (1980) encontró, a partir de resultados experimentales realizados con *A. californiensis*, que la inducción de huevos diapáusicos de esta especie dependía fundamentalmente de la temperatura, por debajo de los 15°C en la región de Yaquina Bay, Oregon, y que la salinidad no era inductora de este estado.

En los cuerpos de agua estudiados (estero de Punta Banda y Mission Bay), las condiciones locales de temperatura, turbidez, concentración de oxígeno, disponibilidad de alimento, profundidad y dinámica física, en general, conducen a que cada población tenga genotipos particulares (e.g., B-C para el estero de Punta Banda y C-D para Mission Bay), que los hacen más eficientes en su desempeño fisiológico particular. Si existiesen las mismas condiciones hidrológicas en ambos cuerpos de agua y un considerable flujo genético, las poblaciones deberían presentar los mismos genotipos y las mismas frecuencias génicas, tal como lo muestra Hedgecock (1986) para la langosta *Homarus americanus*, cuando se plantea que el flujo genético está dado, pero la selección sobre cier-

than 15°C, and that salinity was not inductive to this stage.

In the bodies of water studied (Estero de Punta Banda and Mission Bay), the local conditions of temperature, turbidity, oxygen concentration, food availability, depth and physical dynamics generally conduce each population to have particular genotypes (e.g., B-C for Estero de Punta Banda and C-D for Mission Bay), which make them more efficient in their particular physiological tasks. If the same hydrological conditions and a considerable genetic flux exist in both bodies of water, the populations should present the same genotypes and genetic frequencies as shown by Hedgecock (1986) for the *Homarus americanus* lobster. He states that the genetic flow is given, but the selection of certain genetic compositions establishes differences among subpopulations.

On the other hand, it seems that allele C in PGI-1 in homozygote condition for the populations studied here is successful, it would not be present to the contrary. The heterozygote genotypes with low frequencies partially denote the deficiency between them.

Seven species of harpacticoid copepods, *Tisbe biminienensis*, *T. clodiensis*, *T. holothuriae*, *Tigriopus brevicornis* and *T. fulvus* (Battaglia et al., 1978) and *T. californicus* (Burton and Feldman, 1981; Burton et al., 1979) were genetically characterized using allozymes; and four species of calanoid copepods, two with allozymic studies, *Labidocera aestiva* (Bucklin and Marcus, 1985) and *Metridia pacifica* (Bucklin et al., 1989), and two with DNA sequences, *Calanus pacificus* (Bucklin, 1993) and *Nannocalanus minor* (Bucklin, 1994). *Tigriopus californicus* has also been studied using DNA sequences (Burton, 1993)

With respect to the copepods characterized with allozymes, *T. californicus* was the most polymorphic with a value of $P_{0.95} = 0.83$, with six loci assayed (Burton and Feldman, 1981; Burton et al., 1979). The rest varied from 0.10 to 0.50 with an average of 16.6 assayed loci, with the exception of the high values presented by *L. aestiva* of 0.78 ± 0.10 with an average of 6 assayed loci—that according to Bucklin and

tas composiciones genéticas establece diferencias entre subpoblaciones.

Por otro lado, parece ser que el alelo C para PGI-1 en condición homocigota tiene éxito en las poblaciones aquí estudiadas, de lo contrario no estaría presente. Los genotipos heterocigóticos con frecuencias bajas explican parcialmente la deficiencia entre ellos.

Genéticamente se han caracterizado aloenzimáticamente siete especies de copépodos harpacticoides: *Tisbe biminiensis*, *T. clodiensis*, *T. holothuriae*, *Tigriopus brevicornis* y *T. fulvus* (Battaglia *et al.*, 1978) y *T. californicus* (Burton y Feldman, 1981; Burton *et al.*, 1979); y cuatro especies de copépodos calanoideos: dos por estudios de aloenzimas, *Labidocera aestiva* (Bucklin y Marcus, 1985) y *Metridia pacifica* (Bucklin *et al.*, 1989), y dos por secuenciación de DNA, *Calanus pacificus* (Bucklin, 1993) y *Nannocalanus minor* (Bucklin, 1994). *Tigriopus californicus* también ha sido estudiado por secuenciación de DNA (Burton, 1993).

Respecto a los copépodos caracterizados por aloenzimas, *T. californicus* fue el más polimórfico, con un valor de $P_{0.95} = 0.83$, con seis loci ensayados (Burton y Feldman, 1981; Burton *et al.*, 1979). El resto varió entre 0.10 y 0.50, con un promedio de 16.6 loci ensayados. Fueron excepciones los altos valores revelados por *L. aestiva*, 0.78 ± 0.10 , con un promedio de 6 loci ensayados —el cual, según Bucklin y Marcus (1985), puede deberse en parte a un error de muestreo— y *M. pacifica*, 0.77, con un promedio de 8.4 loci ensayados (Bucklin *et al.*, 1989). Respecto a la heterocigocidad, *T. holothuriae* presenta el valor más alto, $H = 0.241 \pm 0.058$, y *T. fulvus* el más bajo, $H = 0.054 \pm 0.036$; el resto varió de 0.071 ± 0.032 a 0.240 ± 0.061 .

El polimorfismo ($P_{0.95}$) para ambas poblaciones fue de 0.125. La heterocigosis para el estero de Punta Banda fue 0.060 ± 0.060 y para Mission Bay 0.035 ± 0.035 . Comparativamente, estos parámetros son de los más bajos entre las especies de copépodos hasta ahora estudiadas.

Éste es el primer trabajo realizado sobre la variación genética de una especie de copépodo calanoide marino confinado en un cuerpo de agua costero estuarino o lagunar. Se considera

Marcus (1985) can be due in part to a sampling error—and *M. pacifica* with 0.77 and an average of 8.4 assayed loci (Bucklin *et al.*, 1989). With respect to heterozygosity, *T. holothuriae* presents the highest value, $H = 0.241 \pm 0.058$ and *T. fulvus* the lowest with $H = 0.054 \pm 0.036$; the rest varied from 0.071 ± 0.032 to 0.240 ± 0.061 .

The polymorphism ($P_{0.95}$) for both populations was 1.25. The heterozygosity for Estero de Punta Banda was 0.060 ± 0.060 and 0.035 ± 0.035 for Mission Bay. Both parameters are comparatively among the lowest of the copepod species studied until now.

This is the first paper on genetic variation of a marine calanoid species confined to estuarine waters or coastal lagoons. It is necessary to conduct a more extensive study with a greater number of assayed populations (locations) and loci of *A. californiensis* to obtain a greater panorama of the structural and genetic variability of the populations. It is also recommended to extend this kind of study to other species of related copepods.

ACKNOWLEDGEMENTS

Thanks to the technical group headed by Ronald S. Burton for their help during the laboratory assays. Also to Peter Edwards and Mia Tegner from Scripps Institution of Oceanography for their help in the sampling at Mission Bay, and to Norberto Castro and María Moramay Badillo from the *Facultad de Ciencias Marinas* for their collaboration in Estero de Punta Banda.

We thank the three anonymous reviewers for the valuable comments and suggestions that improved this paper.

Finally, the first author expresses his appreciation to the administration of the *Facultad de Ciencias Marinas* for the opportunity to stay at Scripps Institution of Oceanography, and to Ronald S. Burton for having so graciously shared his knowledge and experience.

English translation by the author.

necesario realizar un estudio más amplio, en el que se ensaye con mayor número de poblaciones (localidades) y loci de *Acartia californiensis*, para tener un panorama más completo de la estructura y variabilidad genética de tales poblaciones. Asimismo, se recomienda extender este tipo de estudios a otras especies de copépodos afines.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al grupo técnico encabezado por Ronald S. Burton la ayuda brindada en los ensayos de laboratorio; así como a Peter Edwards y Mia Tenger, de Scripps Institution of Oceanography, su apoyo en la toma de muestras en Mission Bay, y a Norberto Castro y María Moramay Badillo, de la Facultad de Ciencias Marinas, la colaboración en el muestreo en el estero Punta Banda.

Damos las gracias a tres revisores anónimos por sus valiosos comentarios para mejorar este trabajo.

Finalmente, el primer autor expresa su agradecimiento a los directivos de la Facultad de Ciencias Marinas, por las facilidades brindadas para realizar una estancia en Scripps Institution of Oceanography, y a Ronald S. Burton, por haber compartido amablemente sus conocimientos y experiencias

REFERENCIAS

- Ayala, F.J. y Kiger, J.A. (1984). **Genética Moderna**. Fondo Educativo Interamericano, México.
- Battaglia, B. and Beardmore, J.A. (1978). **Marine Organisms: Genetics, Ecology and Evolution**. Plenum Press, New York.
- Battaglia, B., Bisol, P.M. and Fava, G. (1978). Genetic variability in relation to the environment in some marine invertebrates. In: B. Battaglia y J.A. Beardmore (eds.), **Marine Organisms: genetics, ecology and evolution**, Plenum Press, New York, pp. 53-70.
- Bozic, B. (1975). Détection actométrique d'un facteur d'attraction chez *Tigriopus* (Crustacés, Copépodes, Harpacticoides). **Bull. Soc. Zool. Fr.**, 100: 305-311.
- Bucklin, A. and Marcus, N.H. (1985). Genetic differentiation of populations of the planktonic copepod *Labidocera aestiva*. **Mar. Biol.**, 84: 219-224.
- Bucklin, A. (1986). The genetic structure of zooplankton populations. In: A.C. Pierrot-Bults, S. van der Spoel, B.J. Zahuranec and R.K. Johnson (eds.), **Pelagic Biogeography**, Tech. Pap. in Mar. Sci., UNESCO, Geneva, Italy, 49: 35-41.
- Bucklin, A. (1993). Intraspecific variation of mtDNA of *Calanus pacificus*: evidence for subspecific differentiation and population structure of *C. p. californicus*. **Program and Abstracts of the California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations**, Annual Conference 1993, S-1, Lake Arrowhead, CA, 2-4 Nov.
- Bucklin, A. (1994). Molecular genetic diversity of the copepod, *Nannocalanus minor*, in the Gulf Stream: evidence of large-scale transport. **Abstracts of the 1994 Ocean Sciences Meeting**, San Diego, CA, 21-24 Feb., pp. 60.
- Bucklin, A. and Wiebe, P.H. (1986). Genetic heterogeneity in euphausiid populations: *Euphausia krohnii* and *Nematoscelis megalops* in North Atlantic Slope water. **Limnol. Oceanogr.**, 31: 1346-1352.
- Bucklin, A., Rienecker, M.M. and Mooers, C.N.K. (1989). Genetic tracers of zooplankton transport in coastal filaments off Northern California. **J. Geophys. Res.**, 94: 8277-8288.
- Bulnheim, H.P. and Scholl, A. (1981). Genetic variation between geographic populations of the amphipods *Gammarus zaddachi* and *G. salinus*. **Mar. Biol.**, 64: 105-115.
- Burton, R.S. (1983). Protein polymorphisms and genetic differentiation of marine invertebrate populations. **Mar. Biol. Lett.**, 4: 193-206.
- Burton, R.S. (1987). Differentiation and integration of the genome in populations of the marine copepod *Tigriopus californicus*. **Evolution**, 41(3): 504-513.
- Burton, R.S. (1990). Hybrid breakdown in physiological response: a mechanistic approach. **Evolution**, 44(7): 1806-1813.

- Burton, R.S. (1993). Comparison of DNA sequence and allozyme data for elucidation of the genetic structure of natural populations of the harpacticoid copepod *Tigriopus californicus*. **Program and Abstracts of the California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations**, Annual Conference 1993, S-2, Lake Arrowhead, CA, 2-4 Nov.
- Burton, R.S. and Feldman, M.W. (1981). Population genetics of *Tigriopus californicus*. II. Differentiation among neighboring populations. **Evolution**, 35: 1192-1205.
- Burton, R.S. and Feldman, M.W. (1982). Population genetics of coastal and estuarine invertebrates: does larval behavior influence population structure? In: V.S. Kennedy (ed.), **Estuarine Comparisons**, Academic Press, New York, pp. 537-551.
- Burton, R.S. and Swisher, S.G. (1984). Population structure of the intertidal copepod *Tigriopus californicus* as revealed by field manipulation of allele frequencies. **Oecologia**, 65: 108-111.
- Burton, R.S., Feldman, M.W. and Curtsinger, J.W. (1979). Population genetics of *Tigriopus californicus* (Copepoda: Harpacticoida). I. Population structure along the central California coast. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, 1: 29-39.
- Dawson, J.K. (1980). Recognition and occurrence of *Acartia californiensis* and *Acartia tonsa* in the Los Angeles-Long Beach Harbors and Marina del Rey, California. **2nd Winter Meeting, ASLO, USC**, Los Angeles, CA, Jan. 31- Feb. 4, 7 pp.
- Gooch, J.L. (1975). Mechanisms of evolution and populations genetics. In: O. Kinne (ed.), **Marine Ecology**, Wiley, London, Vol II, Part I, pp. 349- 409.
- Grice, G.D. and Marcus, N.H. (1981). Dormant eggs of marine copepods. **Ann. Rev. Oceanogr. Mar. Biol.**, 19: 125-140.
- Harris, H. and Hopkinson, D.A. (1977). **Handbook of Enzyme Electrophoresis**. North-Holland, New York.
- Hedgecock, D. (1986). Is gene flow from pelagic larval dispersal important in the adaptation and evolution of marine invertebrates? **Bull. Mar. Sci.**, 39(2): 550-564.
- Johnson, J.K. (1980). Effects of temperature and salinity on production and hatching of dormant eggs of *Acartia californiensis* (Copepoda) in a Oregon estuary. **Fish. Bull.**, 77: 567-584.
- Levene, H. (1949). On a matching problem arising in genetics. **Ann. Math. Statist.**, 20: 91-94.
- Levinton, J.S. (1980). Genetic divergence in estuaries. In: V.S. Kennedy (ed.), **Estuarine Perspectives**, Academic Press, New York, pp. 509-520.
- Levinton, J.S. (1982). **Marine Ecology**. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
- Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, 89: 583-590.
- Smithies, O. (1955). Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal individuals. **J. Biochem.**, 61: 629-641.
- Sokal, R.R. and Rohlf, F.J. (1981). **Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research**. 2nd Ed., W.H. Freedman & Co., San Francisco.
- Swofford, D.L. and Selander, R.M. (1989). BIOSYS-1: a FORTRAN program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics. **J. Hered.**, 72: 281-283.
- Trinast, E.M. (1975). Tidal currents and *Acartia* distribution in Newport Bay, California. **Est. Coast. Mar. Sci.**, 3: 165-176.
- Trinast, E.M. (1976). Preliminary note on *Acartia californiensis*, a new calanoid copepod from Newport Bay, California. **Crustaceana**, 31: 54-58.
- Trujillo-Ortiz, A. (1986). Life cycle of the marine calanoid copepod *Acartia californiensis* Trinast reared under laboratory conditions. **CalCOFI, Rep.**, 27: 188-204.
- Trujillo-Ortiz, A. (1990). Porcentaje de eclosión, producción de huevos y tiempo de desarrollo de *Acartia californiensis* Trinast (Copepoda: Calanoida) bajo condiciones de laboratorio. **Ciencias Marinas**, 16(1): 1-22.

- Trujillo-Ortiz, A. y Arroyo-Ortega, J.E. (1991).
Análisis de la mortalidad y esperanza de
vida de *Acartia californiensis* Trinast bajo
condiciones de laboratorio. **Ciencias Ma-
rinas**, 17(4): 11-18.