

ANÁLISIS ELECTROFORETICO DE LAS ESTERASAS DE *Cyprinodon dearborni* DE LA ISLA DE MARGARITA, ESTADO NUEVA ESPARTA, VENEZUELA

*Nirchio T. Mauro

RESUMEN

Las esterasas de *Cyprinodon dearborni* fueron analizadas mediante electroforesis en gel de almidón. Fueron detectadas seis zonas de actividad de esterasas. El análisis electroforético de la progenie obtenida de reproductores de genotipo conocido permitió establecer que tres de las seis zonas electroforéticas están determinadas por tres loci con alelos codominantes. Se determinó la estructura genética de la población de *C. dearborni* para los loci *EST-2*, *EST-5* y *EST-6*. La deficiencia de heterocigotos para *EST-2* y *EST-6* y la aparente heterosis para *EST-5* es discutida.

PALABRAS CLAVE: Electroforesis, Esterasas, *Cyprinodon dearborni*

ABSTRACT

Esterases of *Cyprinodon dearborni* were studied by electrophoresis on starch gel. There are six electrophoretic zones of esterase activity. Electrophoretic analysis of progeny obtained from brodstock of known genotype allowed to establish that three of the six electrophoretic zones are genetically determined. Population genetic structure for *EST-2*, *EST-5* and *EST-6* loci is determined. Deficiency of heterozygotes for *EST-2* and *EST-6*, and apparent heterosis for *EST-5* is discussed.

KEY WORDS: Electrophoresis, Esterases, *Cyprinodon dearborni*.

*Universidad de Oriente, Núcleo de Nueva Esparta, Escuela de Ciencias Aplicadas del Mar. Apartado Postal 147.

INTRODUCCION

Uno de los polimorfismos genéticos más estudiados en los teleosteos, por su fácil detección y gran variabilidad, es el de las esterasas (SPRAGUE, 1967; 1974; LIGNY, 1968; UTTER *et al.*, 1970; FUJINO, 1974; RIDGWAY, 1970; McCABEY y DEAN, 1974; METCALF *et al.*, 1972; TURNER, 1973; SMITH *et al.*, 1981).

Las esterasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces ésteres formados entre diversos ácidos y alcoholes y, aunque pertenecen al mismo grupo, es costumbre referirse a las enzimas que hidrolizan a los triglicéridos (ésteres de ácidos grasos) como lipasa, mientras que se ha reservado el término esterasas para aquellas que actúan sobre compuestos como el etil butirato (esterasas simples) y lípidos más complejos como los fosfolípidos, el colesterol y las ceras (HOAR, 1973).

Debido, por un lado, al rol de las esterasas en el metabolismo de los lípidos, que por lo demás son de gran importancia a nivel estructural para mantener la integridad de la estructura celular y como fuente de energía y, por el otro, a que su control genético es ejercido por alelos codominantes cuyas frecuencias, en algunos casos, parecen estar asociadas con factores ambientales como la temperatura y el pH (KOEHN y RASMUSSEN, 1967; KOEHN, 1969; 1970; KOEHN *et al.*, 1971; PEREZ, 1974; MORENO y PEREZ, 1975; JOHNSON, 1981), es lógico suponer que la estructura genética de las poblaciones para los loci que codifican este grupo de enzimas pueda ser el resultado de la acción directa de la selección natural bajo condiciones ambientales heterogéneas y fluctuantes.

Entre los peces marinos, la familia Cyprinodontidae constituye un excelente grupo para analizar la posible relación de los polimorfismos de las esterasas con las variaciones ambientales, ya que dicho Taxón está compuesto por especies vigorosas y de gran abundancia que colonizan aguas someras y lagunas, a menudo aisladas del mar abierto, donde deben resistir variaciones

extremas de temperatura y salinidad (SIMPSON y GUNTER, 1956).

En este trabajo se estudia la variabilidad genética de las esterasas de *Cyprinodon dearborni*, uno de los representantes de los *Cyprinodontidae* en Venezuela, con el propósito de establecer las bases que permitan diseñar investigaciones tendientes a dilucidar los factores que afectan el mantenimiento de esos polimorfismos en las poblaciones naturales de peces marinos.

MATERIALES Y METODOS

Ejemplares adultos de *Cyprinodon dearborni* de, ambos sexos, fueron colectados mediante redes en las cercanías del canal de entrada a la laguna La Restinga, Isla de Margarita, Venezuela y transportados al laboratorio en recipientes plásticos.

A fin de elegir el tejido más apropiado para detectar las esterasas se determinó la distribución de estas enzimas en corazón, hígado, vesícula, riñón, bazo, cerebro, piel, gónadas, ojos, intestino y estómago. Cada muestra fue homogeneizada, en frío, en amortiguador Tris-HCl, 0.05 M, pH 7.00, centrifugada a 3.000 r.p.m. durante 15 minutos y el sobrenadante fue sometido inmediatamente a electroforesis horizontal en gel de almidón.

Los geles (10 x 15 x 0,5 cm) fueron preparados con 14 g de almidón hidrolizado (Sigma Chem. Co, Missouri) en 100 ml de amortiguador. Para procurar obtener la mejor resolución en la separación electroforética, se estudió el efecto del pH del buffer del gel. Los valores de pH usados fueron 7.00, 7.60 y 8.00. Cada buffer fue preparado con Tris hidroximetil aminometano 0,03M, ajustando el pH con ácido cítrico 0,025M hasta alcanzar el valor deseado.

La electroforesis se realizó en frío, dentro de una nevera, y aplicando una diferencia de potencial de 200 voltios entre los extremos del gel durante 1 hora y 45 minutos. Para los reservorios se utilizó un tampón de Ácido Bórico 0,3 M, ajustado a pH 8,6 con hidróxido de sodio.

Para la detección de las esterasas, el gel, luego de ser cortado horizontalmente, fue incubado a 37 °C durante 45 minutos en una solución de Tris-HCl, 0,05 M, pH 7.0 (40 ml) con 50 mg de Fast Blue RR y 2 ml de una solución al 1% de α -naftil acetato en acetona (50% V:V).

Las zonas de actividad enzimática fueron identificadas en función de su movilidad hacia el ánodo. La zona de menor movilidad fue designada EST-1, la siguiente EST-2 y así sucesivamente.

Para confirmar cada zona de actividad enzimática como el producto de diferentes loci, se siguió la segregación de los electromorfos en la progenie resultante de algunos cruces efectuados en el laboratorio mediante fecundación artificial. Para ello fueron seleccionados hembras y machos adultos, con coloraciones que indicaban que se encontraban en el máximo grado de actividad sexual (CARDONA, 1983). Los óvulos fueron obtenidos mediante presión abdominal. Para obtener el esperma, a los machos se les extrajeron los testículos, que fueron introducidos en un tubo de ensayo, se agregó 0,5 ml de agua de mar filtrada y se homogeneizó con una varilla de vidrio. Los gametos fueron mezclados y, luego de 1/2 hora, los ovocitos fecundados fueron enjuagados con agua de mar recién filtrada y colocados en recipientes de 500 cc, también con agua de mar filtrada, en los que se completó el desarrollo embrionario (temperatura de 26 ± 1 °C y salinidad de 38 ‰). Al cabo de 5 días se produjo la eclosión y 30 días más tarde la progenie fue analizada. Cada individuo fue triturado en 50 μ l de tampón Tris-HCl 0.05 M, pH 7.0 e inmediatamente el homogeneizado resultante se dejó embeber por un cuadro de papel de filtro Whatman Nº 3, el cual fue insertado en el gel de almidón para efectuar la separación electroforética.

Los alelos fueron identificados de acuerdo a la movilidad electroforética relativa de sus productos, asignando el número 100 al alelo más frecuente (SHAKLEE *et al.*, 1970).

Las frecuencias alélicas se estimaron como el número de cada variante electroforética entre el total de variantes observadas con un error estándar $\sqrt{[(1-p)/2N]}$ (LEVINTON y KOEHN, 1976). El desvío con respecto al número de heterocigotos esperados según la ley de HardyWeinberg se calculó como $D = (\Sigma H_o - \Sigma H_e) / \Sigma H_e$, donde H_o es el número de heterocigotos observados y H_e el esperado, este último obtenido a partir de las frecuencias alélicas estimadas (SELANDER, 1970).

Para determinar la independencia de la distribución de las frecuencias fenotípicas entre los sexos se utilizó la prueba de contingencia Chi-cuadrado (SOKAL y ROHLF, 1969). Para cada locus se determinó si la heterocigosidad observada se ajustaba a la esperada según el principio de equilibrio de Hardy-Weinberg siguiendo las recomendaciones de LESSIOS (1992) para la realización

del test estadístico y para la determinación del nivel de significación.

RESULTADOS

En la Tabla I se indica la distribución de las esterases en los diferentes tejidos y órganos. Se detectaron seis zonas de actividad que fueron denominadas EST-1, EST-2, EST-3, EST-4, EST-5 y EST-6, en orden creciente de velocidad de migración al ánodo.

La comparación de los electroforetogramas entre tejidos reveló la presencia de zonas de actividad estero-lítica de localización específica y zonas de distribución amplia (Tabla I). Debido a que en el hígado se presentaron todas las zonas de actividad, se escogió a ese órgano para la obtención de los homogeneizados a lo fines de realizar los análisis electroforéticos en los ejemplares adultos.

TABLA I. Distribución de las esterases en los tejidos de *Cyprinodon dearborni*

TEJIDO	ZONA DE ACTIVIDAD ENZIMATICA					
	EST-1	EST-2	EST-3	EST-4	EST-5	EST-6
VESICULA	+					
CORAZON		+	+			
HIGADO	+	+	+	+	+	+
RIÑON				+		
BAZO				+		
CEREBRO				+		
PIEL				+		
TESTICULO	+	+	+	+		+
OVARIO	+	+	+	+		+
OJO	+	+	+	+		+
MUSCULO				+		+
INTESTINO		+	+	+		+

Se observó la mejor resolución de los electromorfos a pH 7,60. Sin embargo, en algunas muestras, para la zona EST-6 se redujo la intensidad de coloración de una banda que se detecta con nitidez a pH 7,00, pero que a medida que se incrementa el pH hasta 8,00 desaparece totalmente. Ello motivó a efectuar los análisis electroforéticos a pH 7,00 para EST-6 y a pH 7,60 para el resto de las zonas.

La electroforesis de los homogeneizados de la proge-nie resultante de los cruces efectuados en el laboratorio permitió confirmar que las zonas EST-3, EST-5 y EST-6

están genéticamente controladas por loci diferentes, por cuanto para cada uno de esos loci se observó la segregación de los fenotipos electroforéticos según lo esperado para caracteres mendelianos simples (Tabla II).

Las zonas EST-1, EST-2 y EST-4 no revelaron en la progenie (juveniles de 35 días de nacidos) resultante de los cruces efectuados, lo que impidió verificar el control genético de esas zonas de actividad.

TABLA II. Resultado del cruce entre un macho de genotipo *EST-3100/100*, *EST-5100/102*, *EST-6100/102* y una hembra de genotipo *EST-398/102*, *EST-5100/102*, *EST-6100/100*.

Locus	Genotipos de la descendencia	Número observado	Número esperado	χ^2	Contribución
EST-1	No reveló				
EST-2	No reveló				
EST-3	100/102	14	16	0,281ns	
	100/98	18	16		
EST-4	No reveló				
EST-5	100/100	6	8	14,188**	3,5%
	100/102	27	16		53,3%
	102/102	1	8		43,2%
EST-6	100/100	15	16	0,031 ^{ns}	
	100/102	17	16		

El locus *EST-3* se presentó con tres alelos, *EST-398*, *EST-3100* y *EST-3102*, con frecuencias de 0,24; 0,66 y 0,10 respectivamente. Para este locus la población presentó diferencias significativas entre las frecuencias fenotípicas observadas y las esperadas en el equilibrio. El déficit de heterocigotos fue de 52,5 (Tabla III).

Para el locus *EST-5*, se observaron 2 electromorfos, *EST-5100* y *EST-5102*, con frecuencias de 0,60 y 0,40 respectivamente. Para este locus la población no se encontró en equilibrio y presentó un exceso significativo de heterocigotos del 43,8%. (Tabla III).

El locus *EST-6* presentó 3 electromorfos, *EST-6100*, *EST-6102* y *EST-6104*. El índice D arrojó un valor de 32,1%, el cual resultó ser significativo por cuanto el test de bondad de ajuste reveló discrepancias ($p < 0,05$) entre la heterocigosidad observada y la esperada bajo la condición de equilibrio de Hardy-Weinberg (Tabla III)

TABLA III. Frecuencias (F) \pm error estándar (ES) de los alelos para cuatro loci de esterasas de *Cyprinodon dearborni*. Se indica la frecuencia de heterocigotos observada (Ho), esperada (He), el índice D, y el estadístico X^2 para la prueba de bondad de ajuste. N representa el número de alelos muestreados.

Locus	Alelo	F \pm ES	Ho	He	D	X ² (χ^2)
EST-2	98	0,24 \pm 0,027	0,236	0,497	-0,525	33,00**
	100	0,66 \pm 0,030				
	102	0,10 \pm 0,019				
	N: 123					
EST-5	100	0,60 \pm 0,016	0,690	0,480	+0,438	19,19**
	102	0,40 \pm 0,016				
	N: 110					
EST-6	100	0,71 \pm 0,014	0,290	0,427	-0,321	8,10**
	102	0,03 \pm 0,002				
	104	0,26 \pm 0,013				
	N: 110					

En la Tabla IV se indica la distribución de los fenotipos según el sexo para los loci *EST-3*, *EST-5* y *EST-6*. El estadístico X^2 para probar la homogeneidad de las frecuencias fenotípicas entre los sexos, en todos los casos, resultó ser no significativo ($p > 0,05$).

TABLA IV. Distribución de fenotipos según el sexo. Se indica el valor X^2 para probar la homogeneidad de la distribución de las frecuencias fenotípicas entre los sexos.

Locus	Fenotipo	Machos	Hembras	X^2 de Homogeneidad
EST-3	98/98	4	12	7,85ns
	100/100	32	35	
	102/102	6	5	
	98/100	17	10	
	98/102	-	1	
	100/102	-	1	
EST-5	100/100	15	13	0,536ns
	102/102	4	2	
	100/102	39	37	
EST-6	100/100	36	26	4,06ns
	102/102	1	1	
	104/104	9	5	
	100/102	1	1	
	102/104	-	-	
	100/104	11	19	

DISCUSION

Los resultados de este trabajo coinciden con los de otras investigaciones realizadas en teleosteos, en las que se ha determinado que las esterasas muestran un considerable grado de diversidad (KOEHN y RASSMUSSEN, 1967; FUJINO y KANG, 1968; KOEHN *et al.*, 1971; PEREZ, 1974; MITTON y KOEHN, 1975). En las seis zonas de actividad esterolítica detectadas en *Cyprinodon dearborni*, se observó polimorfismo y los resultados del cruce entre progenitores de genotipos conocidos permitieron confirmar que al menos tres de las seis zonas polimórficas están determinadas genéticamente.

El análisis de las frecuencias génicas y genotípicas de la población en estudio para los loci *EST-3*, *EST-5* y *EST-6* evidenció diferencias significativas ($p < 0,01$) entre las frecuencias fenotípicas observadas y las esperadas para el equilibrio H-W. Las desviaciones de las frecuencias fenotípicas observadas en poblaciones naturales, respecto a las esperadas según la ley de Hardy-Weinberg constituyen un fenómeno que se ha intentado explicar en función de diversos factores tales como el intracruzamiento, el cruzamiento no aleatorio, la mezcla de subpoblaciones con frecuencias génicas diferentes (efecto Wahlund), la presencia de alelos nulos o silentes y la selección (SMITH, 1970; BOYER, 1974; LASSEN y TURANO, 1978; ZOUROS y FOLTZ, 1984; GAFFNEY *et al.*, 1990). Sin embargo, resulta complicado precisar cuál de esos factores, o cual combinación de ellos es responsable de las desviaciones observadas para los loci de esterasas de la población de *C. dearborni* estudiada, ya que simultáneamente con la deficiencia de heterocigotos para *EST-3* y *EST-6*, también se registró un acentuado exceso de heterocigotos para *EST-5*.

En el caso que nos ocupa, tales desviaciones no pueden ser explicada como consecuencia de intracruzamiento o de la mezcla mecánica de poblaciones genéticamente diferentes (efecto Wahlund), por cuanto estos factores actuarían sobre todos los loci de igual manera, provocando deficiencias de heterocigotos similares (GAFFNEY *et al.*, 1990; LESSIOS, 1992), y los valores de D obtenidos en los loci estudiados son muy diferentes (Tabla III).

Otra alternativa sería la existencia de alelos nulos o silentes, es decir, genes cuyos productos son inactivos, lo cual conduciría a registrar las combinaciones heterocigóticas de esos alelos con cualesquiera otros como si fuesen homocigóticas. La frecuencia de un alelo nulo (v) puede estimarse como $(1-t)/(1+t)=(v)$, donde t es la razón entre los heterocigotos observados y los esperados

(BOYER, 1974), o bien por la relación $-D=2x/(1+x)$, siendo x la frecuencia del alelo nulo y D el índice de deficiencia de heterocigotos (GAFFNEY *et al.*, 1990). Aplicando cualquiera de esas ecuaciones, la frecuencia estimada de un alelo nulo en el locus *EST-3* es de 0,33. Debido a que no se observó ningún individuo que no presentara actividad enzimática, se puede asumir que el alelo nulo, de estar presente, sería letal en condición homocigótica. Teóricamente, el cambio de la frecuencia, Δq , de un alelo recesivo letal en condición homocigótica por eliminación selectiva, queda descrita por la expresión $\Delta q = -q^2 / (1+q)$, lo cual representa una considerable presión de selección en contra de un alelo presente en elevada frecuencia (STRICKBERGER, 1987; pág. 797). Consecuentemente, para explicar la persistencia de un alelo nulo en el locus *EST-3* en una frecuencia tan elevada, la pérdida por selección en contra debería estar compensada exactamente por la ganancia por mutación ($\mu - q^2$) (STRICKBERGER, 1987; pág. 806). Por lo tanto, el argumento de la presencia de alelos nulos para justificar la deficiencia de heterocigotos en el locus *EST-3* no parece ser la más adecuada, debido a que se requeriría de una tasa de mutación del orden de $1,089 \times 10^{-1}$ que resulta ser exageradamente elevada para ser razonable.

En relación al exceso de heterocigotos para *EST-5* (Tabla III), es posible suponer que ese genotipo pudiera conferir mayor ventaja reproductiva que los homocigotos, produciéndose una selección en favor de los primeros, suposición que se ve reforzada por los resultados del cruce realizado (Tabla II), donde los heterocigotos se presentaron con una frecuencia de 84,4% en la descendencia. Según BERGER (1976), la heterosis se explicaría, a nivel molecular, en función de una mayor eficiencia catalítica en los heterocigotos, lo cual minimizaría la cantidad de energía metabólica requerida para sostener los niveles de actividad de esas enzimas, permitiendo canalizarla para la reproducción. Al respecto KOEHN (1991) señala que en las poblaciones naturales, los individuos que presentan elevada heterocigosidad también exhiben grandes producciones (e.g. crecimiento, reproducción, etc) como consecuencia de la alta eficiencia metabólica.

Un estudio realizado por TURNER (1973) en 5 especies del género *Cyprinodon* (*C. macularis*, *C. radiosus*, *C. nevadensis*, *C. diabolis* y *C. salinus*) reveló la presencia de una gran heterogeneidad de esterasas producto de por lo menos 10 loci y, aunque el grado de divergencia entre los patrones electroforéticos de las 5 especies fue elevado, sólo uno (*EST-V*) en *C. nevadensis* presentó polimorfismo. El mismo autor señaló que la especifici-

dad de los patrones electroforéticos de esas enzimas entre especies y las diferencias ecológicas entre los hábitats que ellas ocupan, sugerían que las esterasas divergentes podrían estar involucradas en la adaptación a los parámetros ambientales.

Se ha demostrado experimentalmente que la variabilidad genética detectable por electroforesis es mayor en poblaciones mantenidas bajo condiciones ambientales heterogéneas y fluctuantes, que en las poblaciones mantenidas en ambientes estables (POWELL, 1971), lo que va en favor del postulado que sostiene que la heterogeneidad ambiental y la selección natural constituyen factores determinantes de los polimorfismos (ANTONOVICS, 1971; POWELL, 1971; LEVINTON, 1973; NEVO *et al.*, 1986; KOEHN y HILBISH, 1987).

En este sentido, existen estudios que aportan evidencia experimental que asocia la heterogeneidad en ciertos parámetros ambientales, como la temperatura y el pH, con algunos polimorfismos para esterasas en teleósteos. Entre éstos destacan los de KOEHN y RASMUSSEN (1967), quienes encontraron correlación lineal entre la distribución de las frecuencias alélicas de un polimorfismo de esterasas y la latitud en *Catostomus clarki*. Posteriormente, para esa misma especie, KOEHN (1969; 1970) obtuvo evidencia que explicaba la variación latitudinal de las frecuencias alélicas para esterasas en función de la actividad enzimática que exhibían los fenotipos a diferentes temperaturas. También se ha encontrado que la temperatura constituye el factor selectivo en el mantenimiento de un polimorfismo de esterasas, determinado por dos alelos, en *Notropis stramineus* (KOEHN *et al.*, 1971). En el teleósteo *Anoplarchus purpureus* se ha establecido una estrecha asociación entre la variabilidad de la temperatura ambiental y la heterocigosidad para esterasas (JOHNSON, 1977) y en *Chrysophrys auratus* se ha demostrado una estrecha asociación entre el incremento de temperatura y el descenso en la frecuencia de un alelo para un locus de esterasas (SMITH, 1979). Además, se ha sugerido que el pH del agua parece ser el factor selectivo en el mantenimiento de un polimorfismo de esterasas en *Poecilia reticulata* (MORENO y PEREZ, 1975).

Cyprinodon dearborni es una especie que tiene un rango de tolerancia a la salinidad que va desde cero hasta 130 ‰, posee hábitos de alimentación onnivóros y adopta estrategias que le permiten sobrevivir a la desecación (SIMPSON y GUNTER, 1956; KRISTENSEN, 1968; CARDONA, 1983; PERSCHBACHER y STRAWN, 1988). Estas características le han permitido colonizar un hábitat constituido por cuerpos de agua de

poca profundidad, en los que la insolación conduce a cambios extremos de temperatura, salinidades elevadas y bajos niveles de oxígeno disuelto, condiciones que, según CARDONA (1983) y MARTÍN (1972), restringen la presencia de predadores y de otras especies que pudieran competir por alimento y espacio.

En consecuencia, la elevada variación genética que presenta *C. dearborni* para esterasas podría interpretarse como el resultado de la selección natural en respuesta a las variaciones ambientales en el hábitat que ocupa y las diferencias en el índice de Selander que mostró una considerable deficiencia de heterocigotos en los loci *EST-3* y *EST-6*, mientras que para *EST-5* reveló un exceso de heterocigotos, pudiera obedecer a presiones selectivas marcadamente diferentes sobre los individuos que poseen los genes que codifican esos productos. No obstante, es necesario aclarar que mucha de la variación genética existente en las poblaciones naturales pudiera ser explicada como resultado de mutaciones selectivamente neutrales (KIMURA, 1968). Esto se ha planteado una vez más como un dilema en una revisión reciente sobre la evolución de las hemoglobinas múltiples en peces (PEREZ *et al.*, 1995).

El estudio de las propiedades funcionales de las esterasas de *C. dearborni* bajo condiciones ambientales controladas quizás podría aclarar el dilema.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo fue financiado por el Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente (Proyecto CI-4-020-00476/91).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ANTONOVICS, J. 1971. The effects of a heterogeneous environment on the genetics of natural populations. *Amer. Scient.* 59 (5): 593-599.
- BERGER, E. 1976. Heterosis and the maintenance of enzyme polymorphism. *Am. Nat.* 110 (975): 823-834.
- BOYER, J. F. 1974. Clinal and size-dependent variation at the LAP locus in *Mytilus edulis* along the Atlantic coast and the Gulf of Mexico. *Mar. Biol.* 75: 99-112.
- CARDONA, G. J. D. 1983. Aspectos biológicos de *Cyprinodon dearborni* (Meek, 1909) (Pisces: Cyprinodontidae). Tesis de Grado. Universidad de Oriente.
- FUJINO, K. 1970. Immunological and biochemical genetics of tunas. *Trans. Amer. Fish. Soc.* 99 (1): 152-175.
- FUJINO, K. y T. KANG. 1968. Serum esterase groups of pacific and atlantic tunas. *Copeia*. 1: 56-63.
- GAFFNEY, P. M., T. M. SCOTT, R. K. KOEHN y W. J. DIEHL. 1990. Interrelationships of heterozygosity, growth rate and heterozygote deficiencies in the coot clam, *Mullina lateralis*. *Genetics* 124: 687-699.
- HOAR, W. S. 1973. *General and Comparative Physiology*. Prentice-Hall International, INC., London.
- JHONSON, M. S. 1977. Association of allozymes and temperature in the crested blenny *Anoplarchus purpureus*. *Mar. Biol.* 41: 147-152.
- KIMURA, M. 1968. The neutral theory of molecular evolution. En: NEI, M y KOEHN, R. K., eds. Evolution of genes and proteins. Sunderland, M. A: Sinauer.
- KOEHN, R. K. 1969. Esterase heterogeneity: Dynamics of a polymorphism. *Science* 163: 943-944.
- KOEHN, R. K. 1970. Functional and evolutionary dynamics of polymorphic esterases in catostomid fishes. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 99 (1): 219-228.
- KOEHN, R. K. y T. J. HILBISH. 1987. The adaptive importance of genetic variation. *Amer. Scient.* 75: 134-141.
- KOEHN, R. K. y D. I. RASSMUSSEN. 1967. Polymorphic and monomorphic serum esterase heterogeneity in catostomid fish populations. *Biochem. Genet.* 1: 131-144.
- KOEHN, R. K., J. E. PEREZ y R. B. MERRIT. 1971. Esterase enzyme function and genetical structure of populations of the freshwater fish, *Notropis stramineus*. *Amer. Natur.* 105: 51-69.
- KRISTENSEN, I. 1968. Competition in three cyprinodont fish species in the Netherlands Antilles. Studies on the fauna of Curacao and other caribbean islands. *N* 119: 82-101.
- LASSEN, H. H. y F. J. TURANO. 1978. Clinal variation and heterozygote deficit at the Lap-locus in *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* 49: 245-254.
- LESSIOS, H. A. 1992. Testing electrophoretic data for agreement with Hardy-Weinberg expectations. *Mar. Biol.* 112: 517-523.

- LEVINTON, J. 1973. Genetic variation in a gradient of environmental variability: Marine Bivalvia (Mollusca). *Science*. 180: 75-76.
- LEVINTON, J. S. y R. K. KOEHN. 1976. Population genetics of mussels. En: (B. L. Bayne ed.). *Marine mussels, their ecology and physiology*.
- LIGNY de, WILHELMINA. 1968. Polymorphism of plasma esterases in flounder and plaice. *Genet. Res.* 11: 179-182.
- MARTIN, F. D. 1972. Factors influencing local distribution of *Cyprinodon variegatus* (Pisces: Cyprinodontidae). *Trans Amer. Fish. Soc.* 1: 89-93.
- McCABEY, M. M. y D. M. DEAN. 1970. Esterase polymorphisms in the skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis*. *Com. Biochem. Physiol.* 34: 671-681.
- METCALF, R. A., G. S. WHITT, W. F. CHILDERS y R. L. METCALF. 1972. A comparative analysis of the tissue esterases of the white crappie (*Pomoxis annularis Rafinesque*) and black crappie (*Pomoxis nigromaculatus Lesueur*) by electrophoresis and selective inhibitors. *Comp. Biochem. Physiol.* 41 B: 27-38.
- MITTON, J. B. y R. K. KOEHN. 1975. Genetic organization and adaptive response of allozymes to ecological variables in *Fundulus heteroclitus*. *Genetics* 79: 97-111.
- MORENO J. C. y J. E. PEREZ. 1975. pH, Factor selectivo en el mantenimiento de un polimorfismo de esterases del macerado muscular del pez de agua dulce *Poecillia reticulata* Peters. *Acta Cient. Venezolana*. 26: 170-176.
- NEVO, E., A. BEILES, D. KAPLAN, E. M. GOLENBERG, L. OLSVING-WHITTAKER y Z. NAHEV. 1986. Natural selection of allozyme polymorphisms: A microsite test revealing ecological genetic differentiation in wild barley. *Evolution* 40 (1): 13-20.
- PEREZ, J. E. 1974. Variación genética en poblaciones de *Poecillia reticulata*. *Acta Cient. Venezolana*. 25: 24-27.
- PEREZ, J. E., K. RYLANDER y M. NIRCHIO. 1995. The evolution of multiple haemoglobins in fishes. *Rev. Fish Biol. and Fish.* 5: 304-319.
- PERSCHBACHER, P. W. y K. STRAWN. 1988. The sheepshead minnow *Cyprinodon variegatus*- A major pest in experimental mariculture of the Gulf killifish *Fundulus grandis*. *J. World Aquacult. Soc.* 19 (3): 113-117.
- POWELL, J. R. 1971. Genetic polymorphisms in varied environments. *Science*. 174: 1035-1036.
- SELANDER, R. K. 1970. Behaviour and genetic variation in natural populations. *Amer. Zool.* 10: 53-66.
- SHAKLEE, J. B.; F. W. ALLENDORF; D. C. MORIZOT y G. S. WHITT. 1990. Gene nomenclature for protein-coding loci in fish. *Trans. Amer. Fish. Soc.* 119: 2-15.
- SIMPSON, D. G. y G. GUNTER. 1956. Notes on habits, systematic characters and life histories of Texas saltwaters *Cyprinodontes*. *Tulane Stud. Zool.* 4 (4): 115-134.
- SMITH, A. B. C. 1970. Esterase gene frequencies and temperature relationship in the New Zealand snapper *Chrysophrys auratus*. *Mar. Biol.* 53: 305-310.
- SMITH, P. J., R. I. C. C. FRANCIS y A. JAMIESON. 1981. An excess of homozygotes at a serum esterase locus in the Atlantic mackerel *Scomber scombrus*. *Anim. Blood Grps. Biochem. Genet.* 12: 171-180.
- SOKAL, R. y F. ROHLF. 1979. *Biometría*. Edit. H. Blume, Madrid.
- SPRAGUE, L. M. 1967. Multiple molecular forms of serum esterase in three tuna species from the Pacific ocean. *Hereditas*. 57: 198-204.
- SPRAGUE, L. 1970. The electrophoretic patterns of skipjack tuna tissue esterases. *Hereditas*. 65: 197-190.
- STRICKBERGER, M. W. 1987. *GENETICA*. Segunda edición. Ediciones Omega, Barcelona.
- TURNER, B. J. 1973. Genetic divergence of death valley pupfish populations: species-specific esterases. *Comp. Biochem. Physiol.* 46B: 57-70.
- UTTER, F. M., C. J. STORMONT y H. O. HODGINS. 1970. Esterase polymorphism in vitreous fluid of Pacific hake, *Merluccius productus*. *Anim. Blood Grps. Biochem. Genet.* 1: 69-82.
- ZOUROS, E. y D. W. FOLTZ. 1984. Possible explanation of heterozygote deficiency in bivalve molluscs. *Malacologia* 25: 583-591. pa.