

Efecto de la contaminación marina sobre la estructura genética poblacional
del bivalvo *Crassostrea angulata*

Effect of marine contamination on the genetic population structure
of the bivalve *Crassostrea angulata*

Ismael Cross
Laureana Rebordinos*

Laboratorio de Genética
Facultad de Ciencias del Mar
Universidad de Cádiz
Polígono Río San Pedro
E-11510 Puerto Real, Cádiz, España
*E-mail: laureana.rebordinos@uca.es

Recibido en diciembre de 2001; aceptado en marzo de 2003

Resumen

Se analizaron siete loci alozímicos en tres poblaciones naturales de *Crassostrea angulata* localizadas en la costa suratlántica de la Península Ibérica. Dos de las poblaciones mostraban distintos niveles de contaminación por metales pesados, mientras que la otra no estaba contaminada y se utilizó como control. Los siete loci se mostraron muy variables en cuanto a número de alelos, nivel de polimorfismo y heterocigosidad media. Los loci *Lap* y *Mdh1* presentaron alelos nulos. Para el hierro se encontró una correlación positiva significativa entre el número de alelos y la concentración que se ajustaba a un modelo de regresión lineal; sin embargo, esta correlación fue negativa para la heterocigosidad, y significativa para el cadmio y el zinc. Los loci *Em*, *Lap*, *Mdh1* y *Xdh* mostraron déficits de heterocigotos en todas las poblaciones. Los valores de déficit de heterocigotos (*D*) fueron estadísticamente significativos entre las poblaciones contaminadas y la control para el locus *Mdh1* y muy próximos al nivel de significación para el *Em*. En el locus *Pgm* apareció un exceso de heterocigotos en la población control y un déficit, correlacionado con el aumento de niveles de concentración de metales, en los otros dos. Las diferencias entre los valores de *D* de las tres poblaciones también fueron significativas para este locus. Se obtuvieron relaciones significativas, positivas y negativas entre la concentración de metales y algunos alelos de los loci *Em*, *Lap* y *Pgm*. Además, los genotipos homocigotos de los alelos con valores de correlación positivos fueron seleccionados en las zonas más contaminadas, mientras los heterocigotos eran los más favorecidos en la población control, mostrando un comportamiento adaptativo y corroborando la utilidad de algunos de estos loci como biomarcadores en estudios de dinámica de poblaciones en zonas sometidas a contaminación ambiental.

Palabras clave: ostra, *Crassostrea angulata*, biomarcadores, poblaciones, alozimas.

Abstract

Seven enzyme loci were analyzed in three natural populations of *Crassostrea angulata* located on the southern Atlantic coast of the Iberian Peninsula. Two of the populations showed distinct levels of contamination by heavy metals, whereas the third was not contaminated and served as control. These seven loci were shown to be very variable in terms of the number of alleles, polymorphism and average heterozygosity. The *Lap* and *Mdh1* loci presented null alleles. A significant positive correlation was found between the number of alleles and the concentration of iron that was fitted to a model of linear regression. However, this correlation was negative for the heterozygosity, and significant for cadmium and zinc. The *Em*, *Lap*, *Mdh1* and *Xdh* loci showed a deficit of heterozygotes in all the populations. The values of heterozygotic deficit (*D*) were statistically significant between the contaminated populations and the control for *Mdh1* and very close to a significant level for *Em*. In *Pgm*, a heterozygotic excess appeared in the control population and a deficit, which was correlated to the increased levels of metal concentration, occurred in the other two populations. The differences between the *D* values of the three populations were also significant in this locus. Positive, negative and significant relationships were obtained between the concentration of metals and some alleles of the *Em*, *Lap* and *Pgm* loci. Also, the homozygotic genotypes of the alleles with positive correlation values were selected in the contaminated areas, while the heterozygotes were more favoured in the control population, showing an adaptive behavior and corroborating the utility of some of these loci as biomarkers in studies of population dynamics in areas subjected to environmental contamination.

Key words: oyster, *Crassostrea angulata*, biomarker, population, allozyme.

Introducción

Las regiones estuarinas son zonas muy contaminadas por residuos orgánicos e inorgánicos, aumentándose su concentración en las zonas de mezcla de agua dulce y salada debido a la sedimentación de la mayor parte de los residuos. Existen diversos organismos, tanto marinos como estuarinos, que acumulan contaminantes y que, debido a sus características biológicas y a su distribución y tamaño, se han propuesto como bioindicadores de contaminación ambiental, como es el caso de algunas especies de moluscos (Rebordinos *et al.*, 1999).

El cobre, hierro, manganeso y zinc son los metales que se encuentran en mayor proporción en lamelibranquios de ambientes contaminados (Galtsoff, 1964). Se han descrito los efectos perjudiciales que presentan sobre el crecimiento y reproducción de organismos acuáticos, en general, mediante estudios histológicos y fisiológicos (Baker, 1969; MacInnes y Thurberg, 1973; Sarasquete *et al.*, 1992).

El análisis genético se ha considerado una herramienta útil para determinar la calidad de los ambientes acuáticos. El principal requerimiento a nivel genético para que un organismo pueda ser utilizado como bioindicador es que presente loci polimórficos que permitan detectar fácilmente variaciones en frecuencias génicas, heterocigosidades o en estructuras multilocus entre poblaciones de áreas contaminadas (Beardmore *et al.*, 1980; Michinina y Rebordinos, 1997; Rebordinos y Cross, 1999).

Crassostrea angulata (Lamarck, 1819) es un molusco bivalvo sésil que cumple todos los requerimientos anteriores para ser utilizado como bioindicador porque, debido a su actividad filtradora y bajo metabolismo, acumula metales en sus tejidos que se incorporan en las células en forma de gránulos inertes de derivados de zinc y depósitos insolubles de cobre y azufre (Establier, 1969).

Los contaminantes pueden afectar la constitución genética produciendo mutaciones génicas o variaciones cromosómicas. Se han descrito alteraciones de la división celular y también del contenido y organización cromosómica de diversos moluscos, principalmente referidos a supresión mitótica, poliploidización y degeneración. A nivel de cromosomas individuales se han descrito aneuploidías y fusión de cromátidas hermanas (Barsiene, 1994). Además se ha demostrado un efecto selectivo en contra de determinados genotipos por exposición a altas concentraciones de metales pesados. Se ha propuesto que la interacción de los metales con la estructura de las proteínas podría cambiar las propiedades enzimáticas de diferentes genotipos en un locus polimórfico, de manera que se reflejaría en la condición física del organismo, sobre todo si se trata de enzimas importantes para la glicólisis o el ciclo de Krebs (Nevo *et al.*, 1984; Hummel y Patarnello, 1994).

Los estudios de campo que evalúan los efectos de los contaminantes basados en estructura genética son escasos, a pesar de que los datos disponibles apuntan a que las poblaciones que viven en ambientes contaminados a menudo

Introduction

Estuaries are areas that are highly contaminated by organic and inorganic residuals, which increase in concentration in the junction of freshwater and seawater due to the sedimentation of most residuals. There are several organisms, both marine and estuarine, that accumulate contaminants and have been proposed as bioindicators of environmental contamination because of their biological characteristics, distribution and size; for example, some species of molluscs (Rebordinos *et al.*, 1999).

Copper, iron, manganese and zinc are the metals predominantly found in lamellibranchs of contaminated environments (Galtsoff, 1964). Histological and physiological studies have shown that these metals affect the growth and reproduction of aquatic organisms (Baker, 1969; MacInnes and Thurberg, 1973; Sarasquete *et al.*, 1992).

Genetic analysis has proven to be a useful tool to determine the quality of the aquatic environment. The main requirement for an organism to be considered a bioindicator at genetic level is that it provides polymorphic loci that can be used to easily detect variations in gene frequencies, heterozygosity or multilocus structures between populations in contaminated areas (Beardmore *et al.*, 1980; Michinina and Rebordinos, 1997; Rebordinos and Cross, 1999).

Crassostrea angulata (Lamarck, 1819) is a sessile bivalve mollusc that fulfills all the above requirements to be used as a bioindicator. Due to its filtration activity and low metabolism, it accumulates metals in the tissues that are incorporated into the cells in the form of inert granules derived from zinc and insoluble deposits of copper and sulfur (Establier, 1969).

Contaminants can affect the genetic constitution by producing genetic mutations or chromosomal variations. Alterations of the cellular division, as well as chromosomal complement and organization have been described in diverse molluscs, mainly with reference to mitotic suppression, polyploidization and degeneration. At the level of individual chromosomes, aneuploidy and fusion of sister chromatids have been described (Barsiene, 1994). In addition, the selection against certain genotypes, which were exposed to high heavy metal concentrations, has been demonstrated. It has been suggested that the interaction of metals with the protein structures could change the enzymatic activities of different genotypes in a polymorphic locus, so that it would be reflected in the fitness of the organism, especially in regard to important enzymes involved in glycolysis or the Krebs cycle (Nevo *et al.*, 1984; Hummel and Patarnello, 1994).

Field studies that have examined the effect of contaminants on the genetic structure are scarce, even though the available results, focused on those populations that inhabit contaminated environments, have shown changes in their genetic structure relative to that of the control population (Fevolden and Garner, 1987).

The objective of the present study is to determine whether any relationship exists between the genetic structure of three populations that were subjected to a gradient of contamination.

muestran cambios en su estructura genética en relación con las poblaciones control (Fevolden y Garner, 1987).

El objetivo del presente trabajo fue determinar la relación existente entre la estructura genética de tres poblaciones de *C. angulata*, sometidas a un gradiente de contaminación. Además, se pretendió establecer relaciones entre concentraciones de metales pesados y la presencia de determinados alelos y/o genotipos para valorar su influencia sobre el componente genético individual y la estructura genética poblacional de esta especie que potencialmente podría ser utilizada como bioindicador.

Material y métodos

En la figura 1 se representan las poblaciones de *C. angulata* muestreadas en este estudio. La zona A está localizada en la desembocadura de los ríos Tinto y Odiel (Huelva, España), los cuales presentan niveles muy altos de contaminación por metales pesados procedentes de la cuencas mineras existentes en la región. La zona B se encuentra en la desembocadura del Río Guadalquivir (Cádiz, España), caracterizada por tener valores altos de contaminación por metales pesados. La zona C, localizada al SE de la zona B, se encuentra alejada de los puntos de mayor contaminación de la Bahía de Cádiz y se ha utilizado como población control.

Los muestreos se realizaron durante 1996–1997; se recogieron 317 individuos de la zona A, 219 de la zona B y 215 de la zona C. Los ejemplares fueron recolectados en el periodo intermareal y se llevaron al laboratorio, donde se diseccionaron sus hepatopáncreas, se congelaron en N₂ y se mantuvieron a –80°C hasta el momento de la electroforesis. Los sistemas enzimáticos analizados fueron: enzima málico (EM), leucín aminopeptidasa (LAP), malato deshidrogenasa (MDH), fosfoglucoisomerasa (PGI), fosfoglucomutasa (PGM) y xantín deshidrogenasa (XDH). La técnica utilizada fue electroforesis en geles de almidón que reveló un control genético monogénico para EM (*Em*), LAP (*Lap*), PGI (*Pgi*), PGM (*Pgm*) y XDH (*Xdh*). La enzima MDH se reveló en dos zonas de actividad, controladas por un gen cada una de ellas (*Mdh1* y *Mdh2*) (Michinina y Rebordinos, 1997).

Algunas de las enzimas se han escogido por su posible sensibilidad a metales pesados, así PGM y LAP son afectadas de manera directa por iones metálicos (Milstein, 1961; Young *et al.* 1969). La PGI se ha utilizado porque, en general, es muy polimórfica y porque debido a su posición en la glicólisis y gluconeogénesis juega un papel importante en la distribución de carbohidratos para diferentes usos metabólicos. Además, diversos estudios han demostrado que está bajo selección natural, especialmente en ambientes inestables (Paternello y Battaglia, 1992). Las enzimas MDH, EM y XDH no están descritas como dianas de metales, pero son enzimas centrales del metabolismo primario, por lo que se usaron con el objeto de tener dos materiales diferentes sobre los que estudiar el posible efecto ambiental.

In addition, we attempt to establish relationships between heavy metal concentrations and the presence of variable alleles and/or genotypes, in order to evaluate their influence on the individual genetic component and the population genetic structure of this species that could be potentially used as a bioindicator.

Material and methods

The populations of *C. angulata* used for this study were obtained from the areas shown in figure 1. Zone A, located at the mouth of the Tinto and Odiel rivers (Huelva, Spain), is highly contaminated by heavy metals coming from the existing mining river basins in the region. Zone B, at the mouth of the Guadalquivir River (Cádiz, Spain), is also quite contaminated by heavy metals. Zone C, located to the southeast of zone B, is distant from the points of greater contamination in the Bay of Cádiz and this population was used as control.

The samplings were made during 1996–1997, and 317 oysters were collected from zone A, 219 from zone B and 215 from zone C. The specimens were taken during the intertidal period and transported to the laboratory, where the hepatopancreas were excized, frozen in N₂ and stored at –80°C until electrophoresis. The enzyme systems analyzed were malic enzyme (EM), leucine aminopeptidase (LAP), malate dehydrogenase (MDH), phosphoglucoisomerase (PGI), phosphoglucomutase (PGM) and xanthine dehydrogenase (XDH). The technique used was starch-gel electrophoresis that revealed a monogenic genetic control for EM (*Em*), LAP (*Lap*), PGI (*Pgi*), PGM (*Pgm*) and XDH (*Xdh*). Enzyme MDH activity revealed two zones of activity, each of which (*Mdh1* and *Mdh2*) was controlled by a gene (Michinina and Rebordinos, 1997).

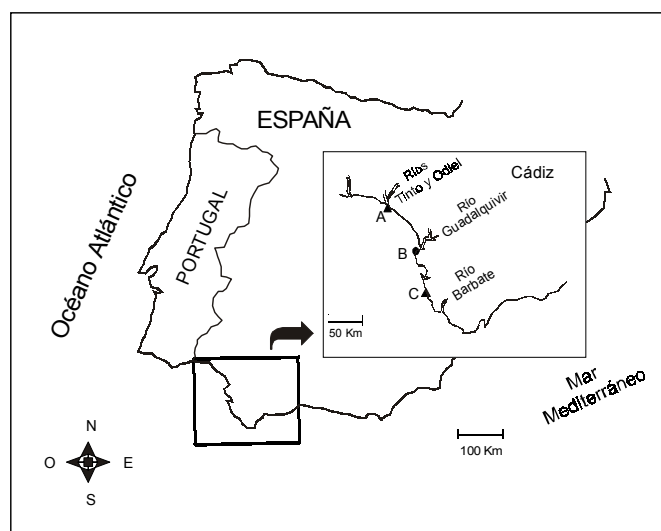


Figura 1. Mapa de la zona en la que se muestrearon las poblaciones A, B y C de *Crassostrea angulata*.

Figure 1. Map of localities where populations A, B and C of *Crassostrea angulata* were sampled.

Las zonas de actividad se numeraron por orden de migración creciente, y a los alelos dentro de un locus se les asignaron números indicando su movilidad relativa en relación al más común que se denominó *100*. Los alelos nulos se nombraron con el número *00* y se identificaban por ausencia total de actividad del sistema, presentando actividad normal para el resto de las enzimas.

Las concentraciones de los metales se obtuvieron a partir de datos publicados por Sáenz-Aurrecochea (1998) y por Blasco *et al.* (1999).

El análisis de los datos se llevó a cabo mediante los programas Genetix 4.0 y SYSTAT 8.0. La relación entre los parámetros genéticos y la presencia de metales se determinó mediante el análisis de correlación entre las concentraciones de metales en cada zona y la variable en cuestión (frecuencias alélicas, números de alelos, heterocigosidades, etc.). Las matrices de correlación fueron utilizadas para determinar si existían relaciones estadísticamente significativas entre las dos variables mediante análisis de regresión.

Resultados

Los seis enzimas estudiados nos permitieron analizar siete loci en las tres poblaciones de *C. angulata*. Los resultados de las frecuencias alélicas en cada uno de los loci se presentan en la tabla 1. Todos los loci fueron variables y se detectó un alelo nulo en el locus *Lap* en las poblaciones B y C, y otro en el locus *Mdh1* en las de A y B. Puesto que no fue posible distinguir los heterocigotos para nulos todos los patrones con una banda fueron considerados homocigotos para el alelo activo.

Las heterocigosidades medias obtenidas de las tres poblaciones difirieron considerablemente de los valores insesgados esperados. El número medio de alelos por locus también varió entre las poblaciones; además, aparece una relación inversa entre el número medio de alelos por locus y las heterocigosidades. Así, se puede observar que la población A es la que presenta un número de alelos más alto ($n_a = 4$) y un valor de H_{dc} más bajo ($H_{dc} = 0.246$), al contrario de lo que ocurre con la población C control ($n_a = 3.43$, $H_{dc} = 0.289$).

En la tabla 2 se recogen los valores de heterocigosidades observadas y esperadas en cada locus de cada zona, con el fin de poder compararlas y determinar si su comportamiento es similar en las tres zonas de estudio. Las diferencias entre los valores fueron estadísticamente significativas en todos los loci, excepto en *Pgi* y *Mdh2*. En *Pgm* también se observaron desviaciones significativas de las condiciones de equilibrio, pero mientras que en la población A esta desviación se debió a un déficit de heterocigotos, en las de B y C se obtuvo un exceso de éstos. Los valores de heterocigosidad esperada fueron similares para las tres poblaciones en todos los loci. Sin embargo, se observaron diferencias apreciables entre los valores observados en varios loci. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas para los loci *Mdh1* y *Pgm*, y próximas al nivel de significación para *Em*.

Some enzymes were chosen for their possible sensitivity to heavy metals. Enzymes such as PGM and LAP have been affected directly by metallic ions (Milstein, 1961; Young *et al.*, 1969). Enzyme PGI was used because, in general, it is very polymorphic and its place in glycolysis and gluconeogenesis plays an important role in the carbohydrate metabolism. In addition, diverse studies have demonstrated that it is under natural selection, especially in unstable environments. Enzymes MDH, EM and XDH have not been described as metal targets, but they are central enzymes of the primary metabolism and were used in order to have two different materials with which to study the possible environmental effect.

The bands representing the enzymatic activity were numbered by the speed of migration, and numbers were assigned to alleles of the locus indicating their relative mobility in relation to the common one that was denominated *100*. Null alleles were given the number *00* and identified by the total absence of enzymatic activity, presenting normal activity for the rest of the enzymes.

The concentrations of metals were obtained from Sáenz-Aurrecochea (1998) and Blasco *et al.* (1999).

The results were analyzed using the Genetix 4.0 and SYSTAT 8.0 programs. The relationship between the genetic parameter and the metal presence was determined by analyzing the correlation between the metal concentrations in each area and the variable in question (allelic frequencies, number of alleles, heterozygosity, etc.). The correlation matrices were used to determine if statistically significant relationships existed between the two variables by regression analysis.

Results

In this study, the six enzymes allowed us to analyze seven loci in the three populations of *C. angulata*. The allelic frequencies of each locus are shown in table 1. All the loci were variable. One null allele was detected in locus *Lap* in populations B and C, while another one was observed in locus *Mdh1* in populations A and B. Since it was not possible to distinguish the null heterozygotes, all the patterns with one band were considered homozygotes for an active allele.

Average heterozygosities of the three populations differed considerably from unbiased predicted values. The average number of alleles per locus also varied between the populations and an inverse relation appeared between the average number of alleles per locus and the heterozygosities. Population A had the most alleles ($n_a = 4$) and the lowest H_{dc} value ($H_{dc} = 0.246$), in contrast to that of the control population ($n_a = 3.43$, $H_{dc} = 0.289$).

The observed and expected heterozygosities for each locus of each area are shown in table 2. The results were compared and examined to determine whether the behavior was similar in the three areas under study. The differences among the values were statistically significant in all the loci, except *Pgi* and *Mdh2*. In *Pgm*, significant deviations from the equilibrium

Tabla 1. Variabilidad genética en siete loci de tres poblaciones de *Crassostrea angulata*. Poblaciones A y B son de zonas contaminadas por metales pesados, y C es la población control no contaminada. $H_{med D-C}$ = heterocigosidad media observada; $H_{med U-E}$ = heterocigosidad media inesgada; n_a = número medio de alelos por locus; P_{95} y P_{99} = porcentaje de loci polimórficos a nivel de 95% y 99%, respectivamente.
Table 1. Genetic variability in seven loci of three populations of *Crassostrea angulata*. Populations A and B are from areas contaminated by heavy metals, and C is the uncontaminated control population. $H_{med D-C}$ = observed average heterozygosity; $H_{med U-E}$ = unbiased average heterozygosity; n_a = average number of alleles per locus; P_{95} and P_{99} = percentage of polymorphic loci, at 95% and 99% level, respectively.

Loci		Población A	Población B	Población C
<i>Em</i>	(N)	190	283	218
	90	0.224	0.207	0.188
	100	0.532	0.597	0.599
	110	0.245	0.196	0.213
<i>Lap</i>	(N)	144	315	176
	00	0.000	0.048	0.028
	73	0.007	0.000	0.003
	91	0.181	0.127	0.145
	100	0.740	0.754	0.741
	122	0.073	0.071	0.082
<i>Mdh1</i>	(N)	215	310	219
	00	0.014	0.032	0.000
	85	0.019	0.013	0.023
	100	0.967	0.955	0.977
<i>Mdh2</i>	(N)	215	317	219
	100	0.953	0.998	1.000
	118	0.047	0.002	0.000
<i>Pgi</i>	(N)	202	279	219
	54	0.002	0.000	0.000
	77	0.084	0.082	0.068
	100	0.886	0.914	0.932
	127	0.002	0.000	0.000
	157	0.025	0.004	0.000
<i>Pgm</i>	(N)	205	308	219
	80	0.010	0.002	0.002
	90	0.046	0.011	0.016
	94	0.049	0.062	0.048
	96	0.183	0.060	0.064
	100	0.351	0.326	0.320
	114	0.183	0.235	0.199
	132	0.117	0.292	0.345
<i>Xdh</i>	(N)	177	310	203
	99	0.268	0.184	0.328
	100	0.449	0.615	0.525
	101	0.282	0.202	0.148
$H_{med D-C}$		0.246 ± 0.069	0.272 ± 0.107	0.289 ± 0.113
$H_{med U-E}$		0.403 ± 0.110	0.359 ± 0.106	0.356 ± 0.112
n_a		4.00 ± 0.76	3.71 ± 0.75	3.43 ± 0.90
P_{95}		0.71	0.71	0.71
P_{99}		1.00	0.85	0.85

Tabla 2. Comparación estadística entre la frecuencia de heterocigotos observada (h_{obs}) y esperada (h_{esp}) en las tres poblaciones estudiadas. $D = \frac{No. \text{ het. obs} - No. \text{ het. esp.}}{No. \text{ het. esp.}}$.

Table 2. Statistical comparison between the observed (h_{obs}) and expected (h_{esp}) heterozygote frequencies in the three populations studied.

$$D = \frac{No. \text{ het. obs} - No. \text{ het. exp.}}{No. \text{ het. exp.}}$$

Loci	Población	N	h_{obs}	h_{esp}	P(H-W)	D
<i>Em</i>	A	190	0.21	0.607	***	-0.653
	B	283	0.279	0.562	***	-0.503
	C	218	0.394	0.561	***	-0.297
<i>Lap</i>	A	144	0.305	0.415	**	-0.264
	B	315	0.263	0.407	***	-0.362
	C	176	0.289	0.422	***	-0.313
<i>Mdh1</i>	A	215	0.037	0.063	***	-0.414
	B	310	0.026	0.087	***	-0.704
	C	219	0.036	0.045	ns	-0.181
<i>Mdh2</i>	A	215	0.093	0.088	ns	0.049
	B	317	0.003	0.003	ns	0.002
	C	219	nd	nd	nd	nd
<i>Pgi</i>	A	202	0.178	0.207	ns	-0.139
	B	279	0.165	0.158	ns	0.045
	C	219	0.128	0.127	ns	0.002
<i>Pgm</i>	A	205	0.595	0.788	***	-0.244
	B	308	0.854	0.745	***	0.146
	C	219	0.886	0.733	***	0.209
<i>Xdh</i>	A	177	0.299	0.646	***	-0.537
	B	310	0.316	0.54	***	-0.423
	C	203	0.291	0.595	***	-0.512

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; ns: no significativo; nd: no determinado.

La relación entre las diferencias genéticas observadas en las poblaciones y la presencia de concentraciones variables de metales pesados se determinó mediante análisis de regresión. En la tabla 3 se muestran los resultados de los coeficientes de regresión obtenidos para las matrices de correlación entre las frecuencias alélicas y la concentración de los metales en cada población. Se obtuvieron resultados estadísticamente significativos para los loci *Em*, *Lap* y *Pgm*. La enzima LAP es afectada por cobre, hierro y manganeso, de manera que la frecuencia del alelo 91 aparece correlacionada positivamente con la concentración de hierro y zinc, mientras que para el alelo 122 esta correlación fue negativa. Además, en la población A, que es la más contaminada, no se obtuvo ninguna actividad para este sistema en un número considerable de individuos mostrando que, además de un efecto específico sobre alelos concretos, se produce un efecto general en algunos individuos de inhibición

were also observed; this deviation occurred in population A due to a deficit of heterozygotes, and in B and C due to an excess. The expected heterozygosity values were similar among all the loci of the three populations. Nevertheless, appreciable differences between the heterozygosity were observed in several loci. These differences were statistically significant in loci *Mdh1* and *Pgm* and close to a significant level in locus *Em*.

The relationship between the genetic differences observed in the populations and the presence of variable heavy metal concentrations was determined by regression analysis. Table 3 shows the matrices of correlation between the allelic frequencies and the concentration of metals representing each population. Statistically significant relationships were obtained for loci *Em*, *Lap* and *Pgm*. Enzyme LAP was affected by copper, iron and manganese, so that the frequency of allele 91

Tabla 3. Comparación estadística entre las frecuencias de los alelos y la concentración de los metales en las tres poblaciones mediante análisis de regresión. Las concentraciones de metales pesados son las descritas por Blasco *et al.* (1999).

Table 3. Statistical comparison between the allele frequencies and the metal concentrations in the populations through regression analysis. The heavy metal concentrations were taken from Blasco *et al.* (1999).

	Cd		Cu		Fe		Mn		Pb		Zn	
	r^2	P	r^2	P	r^2	P	r^2	P	r^2	P	r^2	P
<i>Em90</i>	0.952	0.141	0.822	0.277	0.999	0.023	0.943	0.154	0.935	0.164	0.952	0.141
<i>Em100</i>	-0.912	0.192	-0.310	0.624	-0.698	0.370	-0.499	0.501	-0.919	0.183	-0.899	0.206
<i>Em110</i>	0.608	0.431	0.055	0.849	0.353	0.595	0.175	0.725	0.642	0.408	0.608	0.431
<i>Lap122</i>	-0.585	0.446	-1.000	0.005	-0.843	0.259	-0.960	0.129	-0.275	0.649	-0.620	0.423
<i>Lap91</i>	0.842	0.260	0.922	0.180	0.987	0.073	0.992	0.057	0.558	0.463	0.867	0.237
<i>Pgm100</i>	0.992	0.057	0.503	0.498	0.860	0.244	0.692	0.375	0.949	0.146	0.984	0.080
<i>Pgm132</i>	-0.995	0.045	-0.523	0.485	-0.873	0.232	-0.710	0.362	-0.940	0.158	-0.989	0.068
n_a	0.966	0.118	0.794	0.300	0.995	0.046	0.925	0.177	0.952	0.141	0.966	0.118
$H_{med D-C}$	-0.994	0.048	-0.699	0.370	-0.967	0.116	-0.857	0.247	-0.988	0.070	-0.994	0.048

total de la actividad enzimática. Se obtuvieron resultados similares para los alelos 100 y 132 de *Pgm*. El alelo 100 mostró un coeficiente de correlación muy próximo al nivel de significancia de 0.05 ($r^2 = 0.992$, $P = 0.057$) para el cadmio y el zinc ($r^2 = 0.984$, $P = 0.080$) pero, en cambio, esta correlación fue negativa y significativa ($P = 0.045$) entre el alelo 132 y la concentración de cadmio. El número de alelos también mostró una correlación positiva significativa con la concentración de hierro presente. Mientras que la heterocigosidad media está inversamente correlacionada ($P < 0.05$) con las concentraciones de cadmio y zinc, respecto a las de plomo la correlación está próxima a ser significativa ($r^2 = 0.988$, $P = 0.07$).

Para determinar si existe una selección genotípica se calcularon las frecuencias observadas y esperadas de cada genotipo en cada población para los loci *Em* y *Pgm* (tablas 4, 5), por ser los loci en los que se puede detectar el efecto de la contaminación sin interferir con otros factores. En ellas se puede ver que los genotipos de alozimas más resistentes a altas concentraciones de metales (tabla 3) aparecen en las poblaciones contaminadas con frecuencias mayores que las esperadas, mientras que en la población control los más frecuentes son los heterocigotos.

Discusión

Las tres poblaciones mostraron diferencias significativas entre el número de heterocigotos observado y el esperado, y un déficit generalizado de heterocigotos, siendo ésta una característica común en las poblaciones naturales de bivalvos marinos para la que todavía no se ha encontrado una explicación satisfactoria (David *et al.*, 1995; Bierne *et al.*, 1998). Las comparaciones de la estructura genética entre las tres poblaciones muestran diferencias entre ellas, fundamentalmente, cuando se compararon las dos poblaciones contaminadas con la no contaminada. La población A, más contaminada, es la

aparece positivamente correlada con la concentración de hierro y zinc, whereas for allele 122 the correlation was negative. Population A, which was the most contaminated, did not present any activity in LAP in a considerable number of individuals, showing that, in addition to a specific effect on concrete alleles, a general effect which occurred in some individuals caused a total inhibition of the enzymatic activity. Similar results were obtained for alleles 100 and 132 of *Pgm*. Allele 100 showed a correlation coefficient very close to a significant level of 0.05 for cadmium ($r^2 = 0.992$, $P = 0.057$) and zinc ($r^2 = 0.984$, $P = 0.080$), but this correlation was negative and significant ($P = 0.045$) between allele 132 and the cadmium concentration. The number of alleles also showed a positive and significant correlation with the iron concentration. Whereas the average heterozygosity is correlated inversely ($P < 0.05$) with the concentrations of cadmium and zinc, it is close to $P = 0.05$ ($r^2 = 0.988$, $P = 0.07$) with lead.

In order to determine if a genotypic selection existed, the observed and predicted frequencies of each genotype in loci *Em* and *Pgm* of each population (tables 4, 5) were calculated so that the effect of the contamination without interference from other factors could be detected. It can be seen that the allozyme genotypes more resistant to high metal concentrations (table 3) appear in the contaminated populations in greater predicted frequencies, whereas in the control, the most frequent ones are the heterozygotes.

Discussion

The three populations showed significant differences between the number of observed and expected heterozygotes. A generalized deficit of heterozygotes has been a common characteristic in natural populations of marine bivalves, for which a satisfactory explanation has not yet been found (David *et al.*, 1995; Bierne *et al.*, 1998). The comparison of the genetic

que presenta un mayor número medio de alelos por locus y una menor heterocigosidad, mientras que en el control no contaminado ocurre lo contrario. En la B, con valores intermedios de contaminación, se observan también a nivel genético valores intermedios entre los obtenidos para A y C. Además, estos valores de correlación se ajustaron a un modelo de regresión lineal que, en el caso del hierro, fue significativo a nivel de 5%. Sin embargo, en el caso de la heterocigosidad los valores fueron negativos en todos los casos, ajustándose también a un modelo lineal con valores significativos en el caso del cadmio y del zinc y próximo al nivel de significancia ($P = 0.070$) para el plomo.

Existen datos que evidencian que la diversidad genotípica y la resistencia a contaminantes están positivamente correlacionadas (Nevo *et al.*, 1986). Además, se han descrito efectos genéticos de la contaminación por metales pesados en invertebrados marinos en forma de cambios en las frecuencias génicas y/o genotípicas de las zonas contaminadas comparadas con las de control, demostrando la existencia de patrones adaptativos en ambientes contaminados (Nevo *et al.*, 1984; Lavie y Nevo, 1986).

Los loci de moluscos se han descrito muy polimórficos y se han relacionado con ambientes estuarinos muy variables (Sarver *et al.*, 1992), lo cual explicaría el aumento en el número de alelos con el aumento de la concentración de metales. Por otra parte, a la vez que propician la aparición de nuevos alelos, estos metales estarían ejerciendo una fuerte presión de selección a nivel genotípico a favor de aquellas variantes enzimáticas más o mejor adaptadas a estas condiciones, lo cual explicaría el descenso en la heterocigosidad con el aumento en la concentración de metales. Este efecto estaría relacionado con la situación general de déficit de heterocigotos en las poblaciones y que resulta difícil de esclarecer puesto que no se conoce la causa del déficit de heterocigotos (Zouros *et al.*, 1983).

Existen datos que indican la existencia de selección entre los estadios juveniles y adultos de invertebrados de zonas contaminadas por metales, contribuyendo al aumento de las clases homocigotas (Patarnello *et al.*, 1991). En nuestro caso, el agrupamiento de clases genotípicas para aumentar la frecuencia de esperados siguió presentando valores de desviación significativos.

Aunque se detectaron déficits generalizados de heterocigotos en las poblaciones conviene analizar con detalle la situación locus a locus. Los loci *Lap* y *Mdh1* presentaron alelos nulos, la cual ha sido una de las explicaciones del déficit de heterocigotos en poblaciones naturales (Foltz, 1986). Para el locus *Mdh1*, la población C control no mostró nulos ni presentó diferencias estadísticamente significativas entre el número de heterocigotos observado y esperado mientras que las diferencias fueron altamente significativas ($P < 0.001$) en el caso de las poblaciones A y B, por lo que la situación de este locus sería un reflejo de las condiciones ambientales.

La actividad de la enzima LAP se ha descrito como altamente afectada por metales (Young *et al.*, 1969). En

structure of the three populations showed differences, especially when the two contaminated populations were compared with the uncontaminated population. The most contaminated population A presented the highest average number of alleles per locus and lower heterozygosity, whereas the opposite occurred in the control. Population B, with an intermediate degree of contamination, presented intermediate values at the genetic level relative to those of populations A and C. In addition, these values of correlation were fit to a model of linear regression and, in terms of the iron, it was significant at $P = 0.05$. Nevertheless, in terms of the heterozygosity, the values were negative in all the cases, and when also fitted to a linear regression model, it was significant in cadmium and zinc and close to $P = 0.05$ in lead ($P = 0.070$).

There is evidence that the genotypic diversity and the resistance to contaminants are positively correlated (Nevo *et al.*, 1986). In addition, the effect of heavy metal contamination on the genetics of marine invertebrates has altered the gene and/or genotypic frequencies in the contaminated areas as compared with the control, demonstrating the existence of genetic patterns adapted to the contaminated environment (Nevo *et al.*, 1984; Lavie and Nevo, 1986).

Loci of molluscs have been described to be very polymorphic and this has been related to very variable estuary environments (Sarver *et al.*, 1992), which would explain the increase in the number of alleles following the increase in metal concentration. On the other hand, simultaneously causing the appearance of new alleles, these metals exert a strong selection pressure at genotypic level in favour of those enzymatic variants much better adapted to these conditions, which would explain the reduction in heterozygosity following the increase in metal concentration. This effect might be related to the deficit of heterozygotes in the populations and, in turn, it would be difficult to clarify since the cause of heterozygote loss is not known (Zouros *et al.*, 1983).

Evidence exists indicating that the selection between the juvenile and adult stages of invertebrates occurs in the areas contaminated by metals, contributing to the increase in homozygotic classes (Patarnello *et al.*, 1991). In this study, the grouping of genotypic classes to increase the predicted frequencies continued to present significant deviations.

Although a widespread heterozygotic deficit was detected in the populations, it would be better to analyze the situation in detail from locus to locus. The *Lap* and *Mdh1* loci presented null alleles, which has been one explanation for the heterozygotic deficit in natural populations (Foltz, 1986). Regarding locus *Mdh1*, the control population C did not show either null or statistically significant differences between the number of observed and predicted heterozygotes, while the differences were highly significant ($P < 0.001$) in populations A and B; therefore, the situation of this locus suggests a reflection of the environmental conditions.

The activity of the LAP enzyme has been described to be highly sensitive to metals (Young *et al.*, 1969). In this study, a total inhibition of LAP activity was observed in a considerable

Tabla 4. Frecuencias observadas y esperadas para cada genotipo en las tres poblaciones estudiadas para el locus *Em*.

Table 4. Observed and expected frequencies for each genotype in the three populations studied for the *Em* locus.

Genotipo	Población A		Población B		Población C	
	Frec. obs.	Frec. esp.	Frec. obs.	Frec. esp.	Frec. obs.	Frec. esp.
<i>90/90</i>	0.179	0.050	0.106	0.043	0.064	0.035
<i>90/100</i>	0.089	0.238	0.155	0.247	0.197	0.225
<i>90/110</i>	0.000	0.109	0.046	0.081	0.050	0.080
<i>100/100</i>	0.426	0.283	0.481	0.357	0.427	0.358
<i>100/110</i>	0.121	0.260	0.078	0.234	0.147	0.255
<i>110/110</i>	0.184	0.060	0.134	0.038	0.115	0.046

Tabla 5. Frecuencias observadas y esperadas para cada genotipo en las tres poblaciones estudiadas para el locus *Pgm*. Las frecuencias son las de los genotipos cuyo número observado o esperado era ≥ 5 . Todas las demás frecuencias se agruparon en "otros": a.

Table 5. Observed and expected frequencies for each genotype in the three populations studied for the *Pgm* locus. The frequencies shown are those whose observed or expected number was ≥ 5 . The rest of the frequencies were pooled in "others": a.

Genotipo	Población A		Población B		Población C	
	Frec. obs.	Frec. esp.	Frec. obs.	Frec. esp.	Frec. obs.	Frec. esp.
<i>90/100</i>	0.029	0.033	a	a	a	a
<i>94/100</i>	0.034	0.034	0.026	0.040	0.009	0.031
<i>94/114</i>	a	a	0.062	0.029	0.041	0.019
<i>94/132</i>	a	a	0.029	0.036	0.037	0.033
<i>96/96</i>	0.068	0.033	a	a	a	a
<i>96/100</i>	0.068	0.128	0.003	0.039	0.014	0.041
<i>96/114</i>	0.078	0.067	0.055	0.028	0.032	0.025
<i>96/132</i>	0.029	0.043	0.055	0.035	0.059	0.044
<i>100/100</i>	0.190	0.123	0.055	0.106	0.037	0.102
<i>100/114</i>	0.102	0.128	0.185	0.154	0.164	0.127
<i>100/132</i>	0.059	0.082	0.312	0.191	0.370	0.220
<i>100/138</i>	0.024	0.043	a	a	a	a
<i>114/114</i>	0.054	0.033	0.036	0.055	0.018	0.039
<i>114/132</i>	0.029	0.043	0.084	0.138	0.119	0.137
<i>132/132</i>	0.044	0.014	0.045	0.085	0.041	0.119
<i>138/138</i>	0.024	0.004	a	a	a	a
Otros	0.170	0.191	0.051	0.06	0.063	0.061

nuestro caso se observó una total inhibición de la actividad en todo el sistema *Lap* en un número considerable de individuos de la población altamente contaminada, A. Por lo tanto, los datos que se muestran corresponden solamente a los de aquellos individuos de la población A que mostraron actividad. Además se encontró una correlación entre las frecuencias de determinados alelos y la concentración de metales. En concreto para los alelos *Lap91* y *Lap122*, ésta fue positiva para el primero y negativa para el segundo, apuntando a una adaptación a las condiciones contaminadas y no contaminadas,

number of individuals from population A. Therefore, the results only correspond to those individuals of population A which showed activity. In addition, correlations between frequencies of certain alleles and the concentration of metals were found. In brief, the enzymatic activity of alleles *Lap91* and *Lap122* was positive for the former and negative for the latter, indicating an adaptation to the contaminated and uncontaminated conditions, respectively. However, the genotypic frequencies present clear results in this sense, probably due to the presence of null alleles that were masked by heterozygotes.

respectivamente. Sin embargo, las frecuencias de los genotipos muestran resultados claros en este sentido, probablemente debido a la presencia de nulos que quedan enmascarados en los heterocigotos.

Mdh2 ha aparecido muy poco polimórfico, aún así la única población que presentó un solo alelo fijado fue la C.

El locus *Xdh* no está en equilibrio en ninguna de las tres poblaciones y presenta fuertes déficits de heterocigotos. Sin embargo, mediante análisis de electroforesis secuencial (datos no mostrados) está apareciendo un alto grado de variabilidad críptica u oculta, o sea que, variando las condiciones de electroforesis se está obteniendo el desdoblamiento de bandas que aparecían como únicas en las condiciones de electroforesis estándar, lo que significaría que el método general subestima la variabilidad de este loci porque bajo un fenotipo homocigoto manifestado como única banda existirían varias distintas. En los loci con alelos nulos que presentan una situación similar en cuanto a no detección de heterocigotos, se han encontrado evidencias experimentales de que la no detección de variabilidad genética críptica produce déficit de heterocigotos (Foltz *et al.*, 1986).

La detección de variabilidad genética críptica es de gran interés en estudios de genética de poblaciones porque puede modificar los resultados de determinados trabajos de control genético, distribución clinal de alozimas, etc. (Rebordinos y Pérez-de la Vega, 1990; Verrelli y Eanes, 2000).

Los loci *Em*, *Pgi* y *Pgm*, aunque aparentemente presentaron resultados diferentes, cuando se analizan con detalle se puede ver que siguen el mismo patrón de comportamiento. La *Pgm* se ha descrito como una enzima muy afectada por la concentración de metales (Milstein, 1961). Para *Pgi* también existen datos que indican que está bajo selección natural especialmente en ambientes muy variables (Patarnello y Battaglia, 1992). No conocemos datos publicados al respecto para *Em*, pero se esperaría que su comportamiento no fuera neutro de acuerdo con la teoría general, porque es una enzima clave en la ruta biosintética de obtención de energía (Zouros, 1975). Este locus mostró en las tres poblaciones una desviación altamente significativa de las condiciones de equilibrio Hardy-Weinberg, pero el déficit observado en C ($D = -0.297$) es considerablemente más bajo que en B ($D = -0.503$) y que en la más contaminada A ($D = -0.653$). Además, se obtuvo un ajuste significativo ($P = 0.023$) a un modelo de regresión lineal entre la presencia del alelo 90 y la concentración de hierro. Los resultados de la tabla 4 evidencian la selección genotípica ejercida sobre los genotipos dependiendo de las condiciones ambientales, indicando un comportamiento adaptativo de los alelos.

El locus *Pgi* no presentó diferencias significativas en ninguna población; sin embargo, en la única población que apareció un déficit de heterocigotos ($D = -0.139$) fue en la A más contaminada, que fue la que mostró también un mayor número de alelos, seguida por la de contaminación intermedia, B, y la control, C, con dos alelos presentes.

Finalmente, el locus *Pgm* fue el que presentó mayor número de alelos y diferencias significativas en las tres

Locus *Mdh2* appears very little polymorphic, so that only population C presented one fixed allele.

Locus *Xdh* was not in equilibrium in any of the three populations and it presented a big deficit of heterozygotes. However, using a sequential electrophoretic analysis (data not shown) a high degree of cryptic or non-detected variability appeared, that is to say, varying the electrophoresis conditions unfolded the only band shown under standard electrophoresis. This suggests that the variability of locus *Xdh* was underestimated using general electrophoresis, in which more than one band existed. In those loci with null alleles, heterozygotes might similarly not have been detected. Experimental evidence shows that undetected cryptic genetic variability causes the deficit of heterozygotes (Foltz *et al.*, 1986).

The detection of cryptic genetic variability is of great interest in studies of population genetics because it can modify the results of certain studies on genetic control, clinal distribution of allozymes, etc. (Rebordinos and Pérez-de la Vega, 1990; Verrelli and Eanes, 2000).

Although loci *Em*, *Pgi* and *Pgm* apparently presented different results, a detailed analysis shows that they followed the same pattern of behavior. *Pgm* has been described as an enzyme that is very sensitive to metal concentrations (Milstein, 1961). Evidence also indicates that *Pgi* is under natural selection especially in very variable environments (Patarnello and Battaglia, 1992). To our knowledge, very little data has been published regarding *Em*, but it is expected that its behavior is likely to follow the general theory, because it is a key enzyme in the biosynthetic pathway for obtaining energy (Zouros, 1975). This locus showed highly significant deviations from the Hardy-Weinberg equilibrium in the three populations, but the deficit of heterozygotes observed in population C ($D = -0.297$) is considerably lower than in B ($D = -0.503$) and in A, the most contaminated ($D = -0.653$). In addition, a significant correlation ($P = 0.023$) between the presence of allele 90 and the iron concentration was obtained. The results in table 4 demonstrate that a genotypic selection is exerted on genotypes depending on environmental conditions, indicating an adaptive behavior of alleles.

Locus *Pgi* did not present significant differences in any population. The only population that presented a deficit of heterozygotes ($D = -0.139$) was A, the most contaminated, which also showed a greater number of alleles, followed by the intermediate contaminated population B and the control population C, with the presence of two alleles.

Finally, the *Pgm* locus was the one that presented the most alleles and significant differences among the three populations. However, these differences were only due to a deficit of heterozygotes in population A; surprisingly, in populations B and C excess heterozygotes were obtained, although the excess was greater in the latter ($D = 0.209$) than in the former ($D = 0.146$). In addition, in this locus positive and significant correlations occurred between the frequency of allele 100 and the concentration of zinc as well as cadmium, while negative

poblaciones. Sin embargo, estas diferencias sólo se debieron a un déficit de heterocigotos en la población A mientras que, sorprendentemente, en las poblaciones B y C se obtuvieron excesos, aunque este exceso fue mayor ($D = 0.209$) en la población control que en la que presentaba niveles de contaminación intermedia ($D = 0.146$). Además, en este locus se obtuvieron valores de correlación positivos y significativos entre las concentraciones de cadmio y de zinc y la frecuencia del alelo 100, y valores negativos y significativos entre el alelo 132 y la concentración de cadmio. La correlación entre el alelo 132 y la presencia de zinc fue negativa aunque no llegó a ser significativa ($r^2 = -0.969$, $P = 0.232$).

Según se puede ver en la tabla 4 existen más homocigotos de los esperados en las poblaciones contaminadas para los tres alelos del locus *Em*, indicando que existe una selección genotípica en los loci *Em* y *Pgm*. De manera similar, en la tabla 5 se puede ver que el homocigoto más favorecido en la población A es el correspondiente al alelo positivamente correlacionado con la concentración de metales, mientras que en las otras dos poblaciones los genotipos más favorecidos son los heterocigotos para este alelo y el que produjo valores de correlación negativos. La PGM es una enzima implicada en la glicólisis y la EM es una enzima del ciclo de Krebs, de manera que el genotipo para estas formas enzimáticas implicaría diferencias en la condición física de los individuos portadores. Es interesante, por tanto, extender estos estudios a otras poblaciones para obtener más datos y analizar otras enzimas que actúen en rutas metabólicas importantes, o que puedan estar interrelacionadas con las estudiadas en el presente trabajo, así como profundizar en el mecanismo por el que los metales pesados pueden afectar la eficacia biológica de los genotipos.

Agradecimientos

Este estudio se realizó gracias a los fondos del proyecto CV-219 de la Junta de Andalucía. Los autores agradecen a Jesús Cantoral Fernández su colaboración en la consecución de financiación y en la recogida de algunas muestras y a Edgardo Díaz Ferguson su ayuda en el tratamiento estadístico de los datos.

Referencias

- Baker, J.T.P. (1969). Histological and electron microscopical observations on copper poisoning in the winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 26: 2785–2793.
- Barsiene, J. (1994). Chromosome set changes in molluscs from highly polluted habitats. In: A.R. Beaumont (ed.), *Genetics and Evolution of Aquatic Organisms*. Chapman and Hall, London, pp. 434–446.
- Beardmore, J.A., Barker, C.J., Battaglia, B. *et al.* (1980). The use of the approaches to monitoring biological effects of pollution. *Rapp. P.-V. Reun. Cons. Int. Explor. Mer*, 179: 299–305.
- Bierne, N., Launei, S., Naciri-Graven, Y. and Bonhomme, F. (1998). Early effect of inbreedings as revealed by microsatellite analyses on *Ostrea edulis* larvae. *Genetics*, 148: 1893–1906.
- and significant correlations occurred between allele 132 and the concentration of cadmium. The correlation between allele 132 and the zinc presence was negative, although not significant ($r^2 = -0.969$, $P = 0.232$).
- Table 4 shows more homozygotes than predicted exist in the contaminated populations for the three alleles of locus *Em*, indicating that a genotypic selection exists for the *Em* and *Pgm* loci. Similarly, in table 5 it can be seen that the most favoured homozygote in population A corresponds to the allele positively correlated with the concentration of metals, whereas in the other two populations, the most favored genotypes are the heterozygotes for this allele that gave negative correlation. PGM is an enzyme involved in glycolysis and EM is an enzyme in the Krebs cycle, so that genotypes of these enzymes would imply differences in the fitness of carriers. Therefore, it would be interesting to extend these studies to other populations and to analyze other enzymes that act in important metabolic pathways, so that they can be interrelated with the present study and allow us to understand the mechanism of how the heavy metals can affect the biological efficiencies of the genotypes.

Acknowledgements

This study was carried out with funding for the CV-219 project from the Junta de Andalucía. The authors thank Jesús Cantoral-Fernández for his collaboration in the attainment of financing and in collecting some samples, and Edgardo Díaz-Ferguson for his advise in the statistical analysis.

English translation by the authors.

- Blasco, J., Arias, A. and Sáenz, V. (1999). Heavy metals in organisms of the River Guadalquivir estuary: Possible incidence of the Aznalcóllar disaster. *Sci. Tot. Environ.*, 242: 249–259.
- David, P., Delay, B., Berthou, P. and Jarne, P. (1995). Alternative models for allozyme-associated heterosis in the marine bivalve *Spisula ovalis*. *Genetics*, 139: 1719–1726.
- Establier, R. (1969). Contenido en cobre, hierro, manganeso y zinc de los ostiones (*Crassostrea angulata*) de las costas de Cádiz.. *Inv. Pesq.*, 33(1): 335–343.
- Fevolden, S.E. and Garner, S.P. (1987). Environmental stress and allozyme variation in *Littorina littorea* (Prosobranchia). *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 39: 129–136.
- Foltz, D.W. (1986). Null alleles as a possible cause of heterozygote deficiencies in the oyster *Crassostrea virginica* and other bivalves. *Evolution*, 40: 869–870.
- Galtsoff, P.S. (1964). The American oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. *US Fish Wildlife Serv., Fish. Bull.*, 64.
- Hummel, H. and Patarnello, T. (1994). Genetics effects of pollutants on marine and estuarine invertebrates. In: A.R. Beaumont (ed.), *Genetics and Evolution of Aquatic Organisms*. Chapman and Hall, London, pp. 425–434.
- Lavie, B. and Nevo, E. (1986). The interactive effects of cadmium and mercury pollution on allozyme polymorphisms in marine gastropods *Cerithium scabridum*. *Mar. Pollut. Bull.*, 17: 21–23.

- MacInnes, J.R. and Thurberg, F.P. (1973). Effect of metal on the behaviour and oxygen consumption of the mud snail. *Mar. Pollut. Bull.*, 12: 185–186.
- Michinina, S. and Rebordinos, L. (1997). Genetic differentiation in marine and estuarine natural populations of *Crassostrea angulata*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 154: 167–174.
- Milstein, C. (1961). Inhibition of phosphoglucosmutase by trace metals. *Biochem. J.*, 79: 591–596.
- Nevo, E., Ben-Shlomo, R. and Lavie, B. (1984). Mercury selection of allozyme in marine organisms: Prediction and verification in nature. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81: 1258–1259.
- Nevo, E., Noy, R. Lavie, B., Beiles, A. and Muchtar, S. (1986). Genetic diversity and resistance to marine pollution. *Biol. J. Linn. Soc.*, 29: 139–144.
- Patarnello, T. and Battaglia, B. (1992). Glucosephosphate isomerase and fitness: Effects of temperature on genotype dependent mortality and enzyme activity in two species of genus *Gammarus* (Crustacea: Amphipoda). *Evolution*, 46: 1568–1573.
- Patarnello, T., Guñez, R. and Battaglia, B. (1991). Effects of pollution on heterozygosity in the barnacle *Balanus amphitrite* (Cirripedia: Thoracica). *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 70: 237–243.
- Rebordinos, L. and Pérez de la Vega, M. (1990). Genetic variability of leaf esterases in *Triticum aestivum* L. $2n = 6x = 42$. *Theor. Appl. Genet.*, 79: 673–678.
- Rebordinos, L. and Cross, I. (1999). The use of genetic markers in the study of marine natural populations. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.*, 15 (1–4): 363–372.
- Rebordinos, L., Cross, I., Amezcua, O., Infante, J.J., Vega, L. and Cantoral, J.M. (1999). The use of molluscs as bioindicators of pollution. *BFU Res. Bull.*, No. 3. RSHU, St.-Petesburg, pp. 121–122.
- Sáenz-Aurrecochea, V. (1998). Distribución espacial y especiación de metales pesados en sedimentos de tres sistemas litorales del Golfo de Cádiz. Tesis doctoral, Universidad de Cádiz, Cádiz, España.
- Sarasquete, C., González de Canales, M.L. and Gimeno, S. (1992). Comparative histopathological alterations in the digestive gland of marine bivalves exposed to Cu and Cd. *Eur. J. Histochem.*, 36: 223–232.
- Sarver, S.K., Katoh, M. and Foltz, D.W. (1992). Apparent overdominance of enzyme specific activity in two marine bivalves. *Genetica*, 85: 231–239.
- Verrelli, B. and Eanes, W. (2000). Extensive amino acid polymorphisms at the *Pgm* locus is consistent with adaptative protein evolution in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 156: 1737–1752.
- Young, P.W., Koehn, R.K. and Arnheim, N. (1969). Biochemical characterization of “LAP”, a polymorphic aminopeptidase from the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Biochem. Genet.*, 17: 305–323.
- Zouros, E. (1975). Electrophoretic variation in allelozymes related to function or structure. *Nature*, 254 (April 3): 446–448.
- Zouros, E., Singh, S., Foltz, D.W. and Mallet, A. (1983). Post-settlement viability in the American oyster (*Crassostrea virginica*): An over dominant phenotype. *Genet. Res. Camb.*, 41: 259–270.