

Variabilidad geográfica y alozímica en *Neritina latissima* (Gastropoda: Neritidae) en Costa Rica.

por

Marta F. Valdez* y Ramiro Barrantes**

(Recibido por su publicación el 14 de diciembre de 1979)

Abstract: A phenotypic study of shell color and molecular variation in the loci glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) and glucosephosphate isomerase (GPI) in the estuarine gastropod *Neritina latissima* in four populations in the Pacific coast of Puntarenas, Costa Rica, confirmed that the variation in frequencies of the different morphs is regulated through predation. There was no apparent effect of climate or any other environmental factor. Eight polymorphic alleles were detected in G-6-PD and fourteen in GPI with starch gel electrophoresis. In both cases the allelic frequencies differ among populations, but there are unique variants in each. The average heterozygosity (H) per locus and per population is very high, ranging between 0.76 and 0.82 in G-6-PD and 0.78 to 0.87 in GPI. No apparent association was found between the allozymic variation and the different phenotypes. Possible evolutionary implications on these results are discussed.

Los estudios electroforéticos en los diferentes grupos taxonómicos a partir de 1966 muestran que la variación alozímica a nivel molecular es muy alta (Lewontin y Hubby, 1966; Lewontin, 1974; Selander, 1976; Nevo, 1978). No obstante, las causas y el mantenimiento de esta variación no están bien establecidos, reconociéndose dos puntos de vista diferentes para explicarlas: la hipótesis de la selección natural (Ayala, 1975; Clarke, 1975; Dobzhansky *et al.*, 1977) y la hipótesis neutralista (Kimura, 1968; Kimura y Ohta, 1974).

Los trabajos en moluscos con relación a la variación molecular son muy escasos, predominando aquellos en especies terrestres de zonas templadas, principalmente sobre *Cepaea nemoralis* (Brussard y McCracken, 1974; Brussard, 1975; Johnson, 1976); algunas especies de *Partula* (Johnson *et al.*, 1977); *Helix aspersa* (Selander y Kaufman, 1973). Sobre *Neritina latissima*, de origen marino, que existe en ambientes estuarinos tropicales (Keen, 1971), no existen referencias al respecto.

A nivel fenotípico, ha sido bastante estudiada *Cepaea nemoralis*, que presenta 5 patrones de coloración de la concha, encontrándose la existencia de una acción selectiva diferencial por depredación sobre los morfos de esta especie (Cain y Shepard, 1954; Ford, 1971). Algunos autores han tratado de establecer asociaciones

* Escuela de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.

** Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica.

entre este efecto selectivo y la variación molecular (Brussard y McCracken, 1974; Johnson, 1976), pero los resultados obtenidos no son concluyentes.

El propósito del presente trabajo es estudiar la variación en los loci de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y glucosa fosfato isomerasa y su relación con la variación a nivel fenotípico, en cuanto a los patrones de coloración de la concha, en 4 poblaciones de *N. latissima* en la costa del Océano Pacífico de Costa Rica.

MATERIAL Y METODOS

Las localidades de estudio comprenden las desembocaduras del Río Pánica en Bahía Ballena; Quebrada Colorada y Río Montezuma, en dos sitios: desembocadura, y a 1.200 m de ésta, en la Provincia de Puntarenas, Costa Rica (Fig. 1). Cada tres meses, desde abril de 1977 hasta diciembre de 1978, en Quebrada Colorada y Río Pánica, se estudió la variación en la frecuencia de cada morfo, por medio de muestreos al azar en varios sitios de cada lugar. De igual manera, se estudió la frecuencia de morfos en las otras dos localidades mencionadas durante diciembre de 1978. En esta fecha, en todas las localidades se colectaron los individuos depredados y se calcularon sus frecuencias en relación con los tipos de morfos. Posteriormente se obtuvieron los valores del cociente de la frecuencia de individuos depredados entre la frecuencia de individuos vivos para cada morfo, con el propósito de evaluar la preferencia de ciertos morfos por los posibles depredadores.

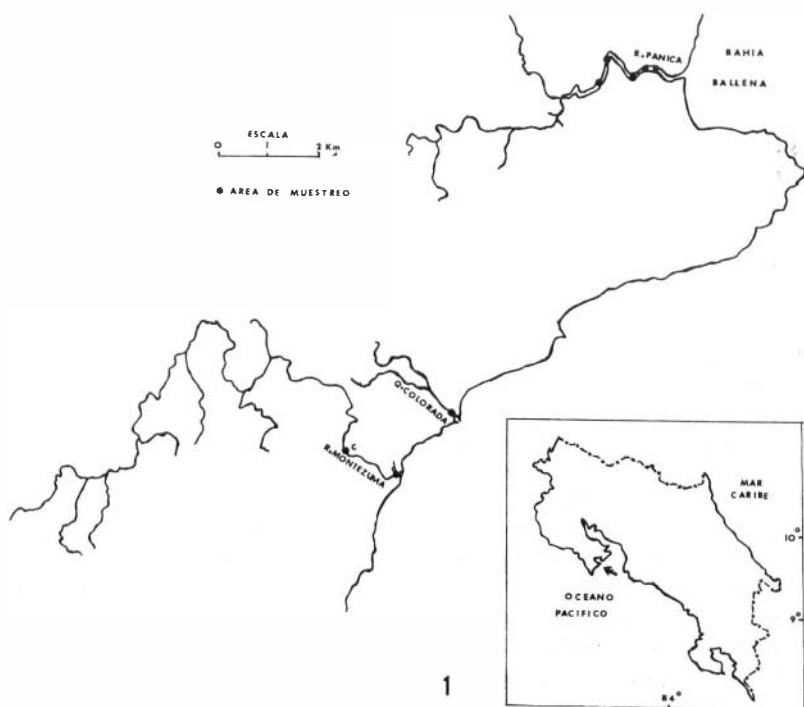


Fig. 1. Mapa ilustrando las localidades de estudio. Provincia de Puntarenas, Costa Rica.

El análisis de la variación alozímica se realizó mediante técnicas de electroforesis horizontal en geles de almidón (Harris y Hopkinson, 1976). Las muestras se prepararon extrayendo, a animales vivos mantenidos en acuarios, el hígado y la gonada, a los cuales se agregó solución Tris-EDTA-NADP pH 7,0 (1,21 g de Tris, 0,34 g de EDTA y 40 mg de NADP en 1 litro de agua desionizada) en una proporción de peso a volumen de 1g a 2ml. Las muestras fueron maceradas manualmente y centrifugadas a 15.000 r p m durante 20 minutos a 4 C. A los sobrenadantes se les eliminó la grasa flotante con aplicadores de algodón esterilizados. Luego se guardaron a - 45 C hasta su utilización.

Las técnicas de preparación de geles y mezclas químicas para la tinción y detección de las zonas de actividad de las enzimas son semejantes a las de Harris y Hopkinson (1976) con las siguientes modificaciones: 1) se usó una solución 0,5 M de Tris, 0,02 M de EDTA y 0,65 M de ácido bórico a pH 8,0 para los electrodos, y esta solución diluida (1:9) en agua desionizada, para la preparación de los geles (23,71 g de almidón en 201 ml de solución); 2) se aplicó 150 voltios durante 5 horas a cada gel.

La frecuencia de alelos para cada locus se calculó por conteo directo. Con estos datos se estimó la heterocigosis para cada locus y su promedio. Como se anotó el morfo correspondiente a cada muestra, se relacionaron las frecuencias alélicas con los tipos de morfos.

RESULTADOS

El Cuadro 1 muestra los valores de la frecuencia de morfos de *N. latissima* y su variación temporal en Quebrada Colorada y Río Pánica. En Quebrada Colorada los morfos verde y verde con dos líneas negras presentan mayores frecuencias durante todo el período de estudio. El morfo café muestra valores entre 3 y 6 por ciento y la forma amarilla con dos bandas negras entre 2 y 4 por ciento. En Río Pánica, el patrón morado varía entre 76 y 100 por ciento, y morfos como el verde alcanzan valores máximos del 12 por ciento en algunas épocas del estudio. Sin embargo, observaciones en el estereoscopio de estos individuos morados revelaron que el 27,8 por ciento de ejemplares de conchas verdes, verde con dos líneas negras, amarillo y café se encuentran encubiertos por la coloración morada, y un 2,4 por ciento no se encuentra encubiertos. En el 69,72 por ciento de los morados, no se pudo identificar el morfo correspondiente (N = 208). Estas observaciones y otros resultados sobre incorporación de manganeso (Valdez y Briceño, 1980), demuestran que, en esta localidad de Río Pánica, el patrón morado encubre la coloración característica en los diferentes morfos.

El Cuadro 2 presenta los valores de las frecuencias de los diferentes patrones de coloración en las cuatro localidades estudiadas, y con la excepción de Río Pánica y Río Montezuma sitio continental, la variación en estos valores no difiere sustancialmente. En el sitio continental de Río Montezuma, el 100 por ciento de los individuos son de morfo verde. En este mismo Cuadro se muestra que en Quebrada Colorada las formas más depredadas son el amarillo con bandas negras y el café, y las menos los morfos verde y verde con dos líneas negras. En cambio, en Río Pánica, la intensidad de depredación es menor para los individuos morados y muy alta para los morfos no encubiertos por la coloración debida a la presencia de manganeso. En Río Montezuma, en la desembocadura, la frecuencia de depredación sobre los morfos amarillo y café es menor que en las otras localidades, y en el sitio continental, no se encontraron individuos muertos por depredación.

*Variación temporal en las frecuencias de morfos de Neritina latissima
en Quebrada Colorada y Río Pánico, Provincia de Puntarenas, Costa Rica, 1977-1978*

Localidad	Fecha Morfo	Abril 1977	Junio 1977	Julio 1977	Octubre 1977	Diciembre 1977	Enero 1978	Abril 1978	Junio 1978	Julio 1978	Diciembre 1978
QUEBRADA COLORADA	Verde	0,8970	—	0,7663	0,6989	—	0,8057	0,5339	—	0,4296	0,7518
	Verde dos líneas negras	0,0411	—	0,1386	0,2258	—	0,1116	0,3856	—	0,4759	0,1898
	Café	0,0403	—	0,0636	0,0323	—	0,0496	0,0551	—	0,0578	0,0365
	Amarillo con dos bandas	0,0216	—	0,0318	0,0430	—	0,0331	0,0254	—	0,0377	0,0219
	N	236		251	160		168	213		526	866
RÍO PÁNICO	Verde	—	0,0000	—	—	0,0000	—	0,0991	0,0048	—	0,1250
	Verde dos líneas negras	—	0,0079	—	—	0,0000	—	0,0631	0,0095	—	0,0488
	Café	—	0,0000	—	—	0,0000	—	0,0270	0,0095	—	0,0332
	Amarillo con dos bandas negras	—	0,0005	—	—	0,0000	—	0,0450	0,0000	—	0,0273
	Patrón morado	—	0,9916	—	—	1,0000	—	0,7658	0,9762	—	0,7650
	N	—	75	—	—	33	—	111	208	—	513

Para las cuatro localidades estudiadas, se detectaron 8 alelos polimórficos en el locus de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Figs. 2 y 3) y 14 alelos polimórficos en el locus de glucosa fosfato isomerasa (Figs. 4 y 5). Los valores de las frecuencias de alelos, de G-6-FD para cada una de las localidades examinadas se presentan en el Cuadro 3. El alelo A⁻ es más frecuente en Quebrada Colorada y Río Pánica; y el AA⁻ en las dos poblaciones de Río Montezuma. Se observa, no obstante, que el orden de magnitud en las frecuencias de todos los alelos es diferente en todas las localidades, así como la ausencia de algunos alelos tal como el A en Río Montezuma (continental), el DE en Quebrada Colorada, el BAC y B en Río Montezuma (desembocadura). Río Pánica presenta el mayor número de alelos. Los valores de heterocigosis para este locus variaron desde 0,80 en Quebrada Colorada; 0,78 en Río Pánica; 0,76 en Río Montezuma (desembocadura); y hasta 0,82 en Río Montezuma (continental).

El Cuadro 4 muestra los valores de las frecuencias de alelos en el locus de GFI en las localidades de estudio. El alelo 08 fue más frecuente en Quebrada Colorada y Río Pánica, y el 07 en los dos sitios de Río Montezuma. Al igual que para el locus G-6-FD, el orden en el aumento de las frecuencias de los alelos es diferente en todas las poblaciones. Además, el alelo 01 se encontró únicamente en la población de Río Pánica; el 10 en Quebrada Colorada y el 14 en Río Montezuma (desembocadura). En Río Pánica se detectaron 12 alelos, en cambio, en Río Montezuma (continental) únicamente 6. Los valores de heterocigosis para cada localidad se encuentran en este mismo Cuadro. Para ambos loci, la heterocigosis media tuvo valores considerablemente altos si se los compara con los resultados presentados por Nevo (1978). Para la población de Quebrada Colorada fue de 0,9704; en Río Pánica de 0,8071; en la desembocadura de Río Montezuma de 0,8148; y de 0,8075 en Río Montezuma, sitio continental. No se encontró relación entre las frecuencias de alelos en los dos loci y los morfos examinados. Cada morfo en las cuatro localidades presenta cualquier alelo, sin ninguna especificidad.

DISCUSION

Los factores ambientales y ecológicos no parecieran afectar la distribución de frecuencias de los morfos de *N. latissima*, ya que no se observó variación estacional en dichas frecuencias, tal como se nota en los resultados del Cuadro 1. Sobre la variación fenotípica en *N. latissima* actúan mecanismos biológicos selectivos de depredación, en que los morfos más llamativos o contrastantes en relación con la coloración del sustrato son los más depredados, como se demuestra en los resultados del Cuadro 2. No obstante que en la población de Río Pánica la frecuencia de morfos es diferente a las demás localidades, dado que la incorporación metabólica de manganeso produce un efecto ecofenotípico en el patrón de coloración de *N. latissima*, el mecanismo selectivo de depredación actúa de manera semejante a las demás localidades. Resultados similares se han encontrado para *Cepaea nemoralis* en varios trabajos (Cain y Sheppard, 1954; Ford, 1971). Igualmente, los resultados en el presente trabajo confirman la hipótesis propuesta por Clarke (1978) en el sentido de que el polimorfismo fenotípico, en moluscos marinos de zonas tropicales, es regulado por la complejidad biológica en estos sistemas, a diferencia de los templados.

La población de Río Montezuma en el sitio continental presenta características diferentes con respecto a las otras poblaciones; sus individuos son redondos, de mayor tamaño (15,00–30,00 mm) y monomórficos en su patrón de coloración (Valdez, 1979). En esta población se observa la ausencia de individuos muertos por

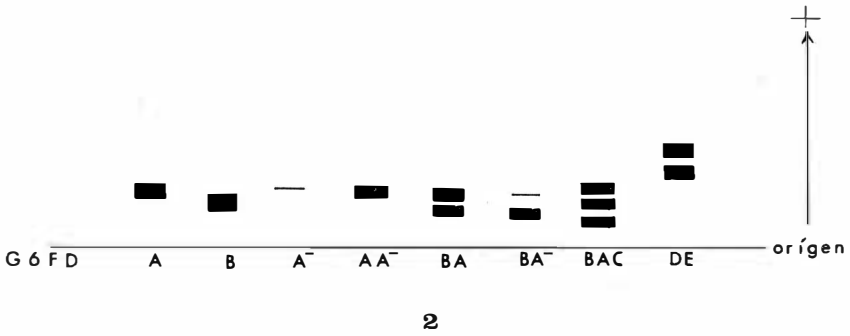


Fig. 2. Diagrama de alozimas de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G-6-F) en individuos de *Neritina latissima*, en las localidades de estudio.

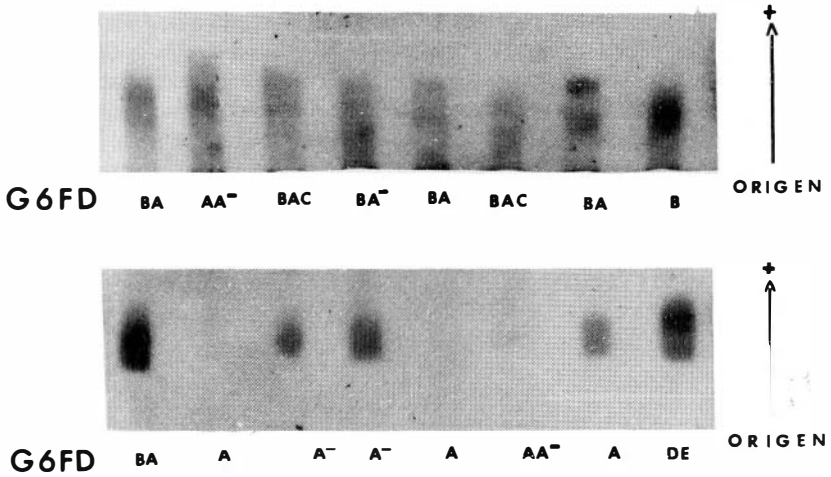


Fig. 3. Alozimas de glucosa 6-fosfato- deshidrogenada (G-6-FD) en individuos de *Neritina latissima*, en las localidades de estudio.

depredación, lo que sugiere que el establecimiento de esta pequeña población (menor de 500 individuos) podría haberse originado a partir de pocos individuos migrantes del fenotipo menos depredado, y por lo tanto, con mayor probabilidad de sobrevivencia. Estos individuos estarían desplazándose hacia las áreas superiores, a partir de la desembocadura del río a un ritmo muy lento, dada la ausencia de individuos entre las dos localidades, y que esta población ha colonizado recientemente este hábitaculo, por lo que aún no se han alcanzado los mecanismos biológicos reguladores a nivel de sistema.

Todos los alelos para ambos loci estudiados fueron polimórficos, sin embargo, comparaciones con otras especies de moluscos muestran que el comportamiento de estos loci es diferente dentro y entre las especies. El locus G-6-FD es monomórfico en *Partula* (Johnson *et al.*, 1977); en *Cepaea nemoralis* segrega 3 alelos en Europa y es monomórfica en Norte América (Levan y Fredga, 1972; Brussard y McCracken, 1974). En *Mytilus edulis* se detectaron 10 alelos para GFI (Koehn *et al.*, 1976) a diferencia de 14 en *N. latissima*.

CUADRO 2.

Relación entre las frecuencias de morfos depredados y morfos vivos (R^D/V) de *Neritina latissima* en las localidades de estudio. Provincia de Puntarenas, Costa Rica. Diciembre de 1978.

Morfo	Frecuencia	Río Pánica	Quebrada Colorada	Río Montezuma (desembocadura)	Río Montezuma (continental)
Verde	Depredados	0,4200	0,6267	0,7327	0,0000
	Vivos	0,1252	0,6905	0,7051	1,0000
	R^D/V	3,3546	0,9076	1,0391	—
Verde con dos líneas negras.	Depredados	0,0450	0,1491	0,2327	—
	Vivos	0,0489	0,2714	0,2215	—
	R^D/V	0,9202	0,5494	1,0506	—
Amarillo con dos bandas negras.	Depredados	0,1350	0,0746	0,0172	—
	Vivos	0,0274	0,0104	0,0225	—
	R^D/V	4,9270	7,1731	0,7644	—
Café	Depredados	0,1800	0,1492	0,0172	—
	Vivos	0,0333	0,0277	0,0579	—
	R^D/V	5,4054	5,3863	0,2971	—
Patrón morado.	Depredados	0,2200	—	—	—
	Vivos	0,7652	—	—	—
	R^D/V	0,2875	—	—	—

La alta variabilidad genética para los loci (Cuadros 3 y 4) posiblemente está relacionada con el tipo de reproducción mostrada en *N. latissima*, en que por la distribución espacial agrupada y la fertilización cruzada (Valdez, 1979), se favorece un mayor intercambio genético entre los organismos. En moluscos como *Rumina decollata* que se autofertiliza, el estudio sobre 25 loci reveló una ausencia de variabilidad molecular (Selander y Kaufman, 1973). Es posible que los resultados obtenidos en *N. latissima* se deban al bajo número de loci examinados, en que por azar sean extremadamente variables con respecto a los no estudiados. Por lo tanto, se hace necesario analizar un mayor número de loci enzimáticos.

Las diferencias para ambos loci de *N. latissima* en cuanto al orden de magnitud en las frecuencias de alelos para las diferentes localidades, y sobre todo, la presencia de alelos únicos en algunas poblaciones y la ausencia de otros, así como la uniformidad de condiciones ambientales en que viven las poblaciones (Valdez, 1979) muestran que no existen efectos selectivos ambientales. Además, las frecuencias de alelos en ambos loci no se encuentran relacionadas con la variación fenotípica, notándose la ausencia de un mecanismo selectivo, sobre los alelos a través de la depredación diferencial sobre los morfos.

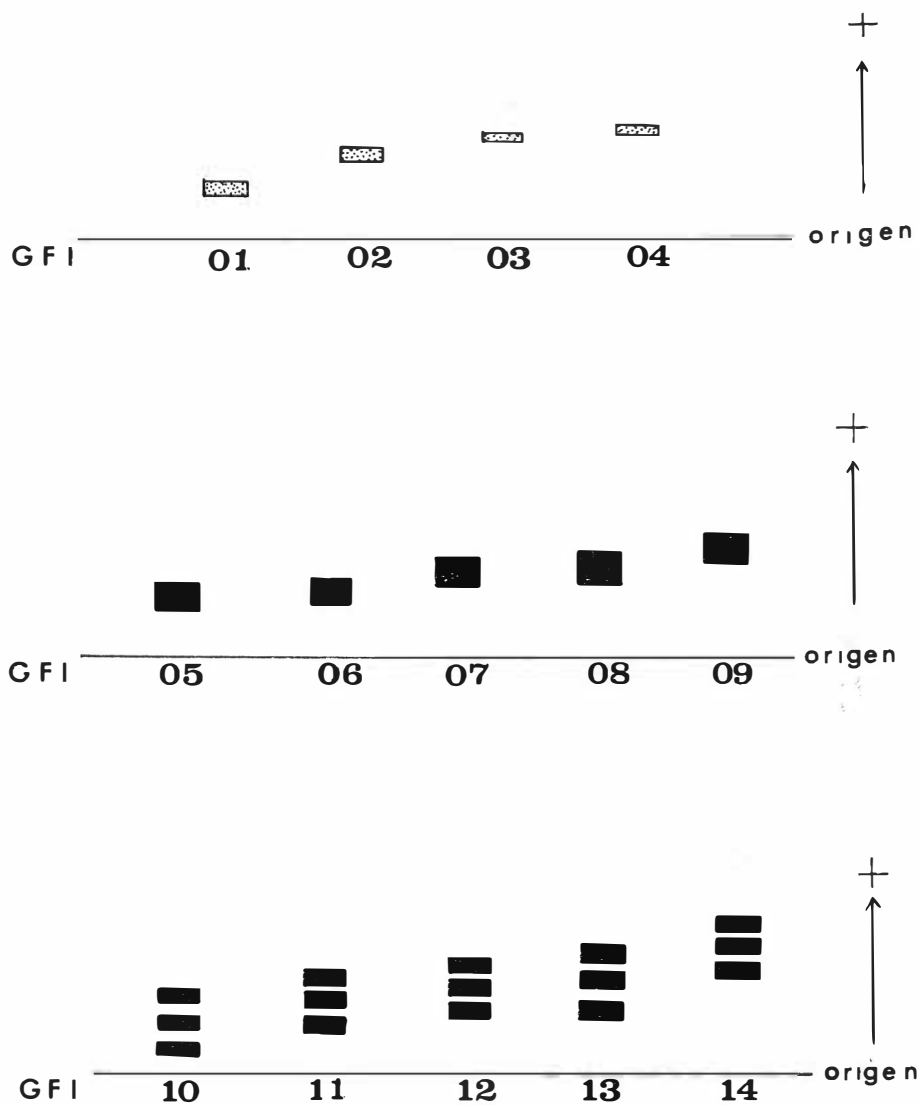


Fig. 4.

Diagrama de alozimas de glucosa fosfato isomerasa (GFI) en individuos de *Neritina latissima*, en las localidades de estudio.

CUADRO 3.

Frecuencia de alelos del locus glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G-6-FD) en *Neritina latissima* para cada una de las localidades de estudio. Provincia de Puntarenas, Costa Rica

		Quebrada Colorada	Río Pánica	Río Montezuma (desembocadura)	Río Montezuma (continental)
Locus G-6-FD	Alelos				
	A	0,1000	0,0333	0,2222	0,0000
	B	0,1300	0,1667	0,0000	0,0500
	A ⁻	0,2700	0,3667	0,2500	0,1500
	AA ⁻	0,1500	0,1667	0,3333	0,2500
	BA	0,2600	0,0333	0,1111	0,2000
	BA ⁻	0,0200	0,0833	0,0278	0,1000
	BAC	0,0700	0,1333	0,0000	0,0500
	DE	0,0000	0,0167	0,0556	0,2000
Heterocigosis (H)		0,8048	0,7827	0,7608	0,8200
Número de genomas muestreados		120	60	36	20
Número de Alelos		7	8	6	7

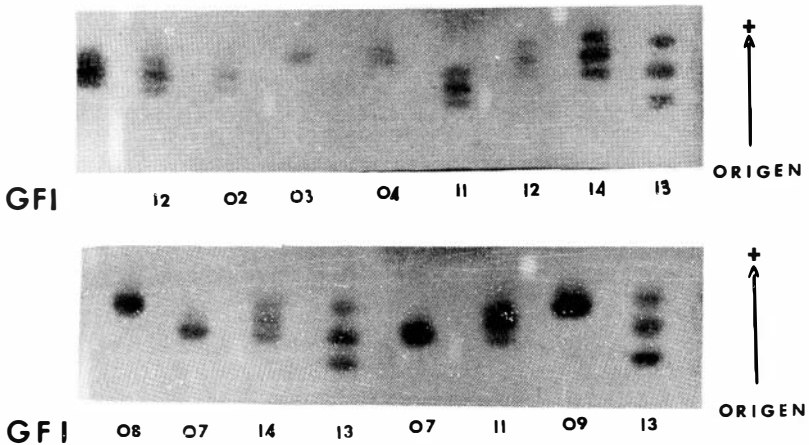


Fig. 5. Alozymas de glucosa fosfato isomerasa (GFI) en individuos de *Neritina latissima*, en las localidades de estudio.

CUADRO 4.

Frecuencia de alelos del locus glucosa fosfato isomerasa (GFI) en Neritina latissima para cada una de las localidades de estudio. Provincia de Puntarenas, Costa Rica.

Locus GFI	Alelos	Quebrada Colorada	Río Pánica	Río Montezuma (desembocadura)	Río Montezuma (continental)
	01	0,0000	0,0167	0,0000	0,0000
	02	0,0167	0,0500	0,0833	0,0000
	03	0,0000	0,0167	0,0278	0,0000
	04	0,0000	0,0167	0,0556	0,0000
	05	0,0917	0,0833	0,0000	0,0000
	06	0,1917	0,0833	0,0556	0,1000
	07	0,2583	0,0833	0,1667	0,3000
	08	0,3250	0,3333	0,1667	0,2000
	09	0,0083	0,1000	0,1667	0,2000
	10	0,0167	0,0000	0,0000	0,0000
	11	0,0750	0,0167	0,0000	0,0000
	12	0,0167	0,1833	0,1667	0,1500
	13	0,0000	0,0167	0,0556	0,0500
	14	0,0000	0,0000	0,0556	0,0000
Heterocigosis (H)		0,7760	0,8206	0,8688	0,7950
Número de genomas muestreados		120	60	36	20
Número de alelos		9	12	10	6

La población de Río Montezuma (sitio continental), a pesar de sus valores semejantes de heterocigosis a los de las otras poblaciones, muestra una reducción en el número de alelos para el locus de GFI, pero no para el de G-6-FD. Lo anterior, y relacionado con los resultados a nivel fenotípico, parece indicar un efecto de “cuello de botella”, característico de una población original numerosa, en donde un reducido número de individuos de este grupo del fenotipo menos depredado (verde), logran establecerse en nuevos ambientes. También ocurre una reducción al azar en el número de alelos, sobre todo en aquellos de menor frecuencia, sin que muestren una reducción en los valores de heterocigosis, siempre que se presenten nuevas mutaciones que restauren la disminución original en variabilidad genética (Nei *et al.*, 1975). El comportamiento aleatorio y diferente en algunos alelos de ambos loci, así como la alta heterocigosis de *N. latissima* en esta población, sugiere un fenómeno de este tipo.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al M.Sc. Carlos R. Villalobos, por su gran ayuda y apoyo en la realización del trabajo; a los doctores F. Gary Stiles y José Miguel Jiménez por la orientación, sugerencias y apoyo; al personal del Centro de Investigaciones en Biología Celular y Molecular de la Universidad de Costa Rica por la ayuda y facilidades en el uso de equipo e instalaciones, especialmente a los Drs. Rodrigo Gámez, Pedro León y Gabriel Macaya.

RESUMEN

En un estudio sobre la variación fenotípica en la coloración de las conchas y la variación molecular en los loci de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-FD) y glucosa fosfato isomerasa (GFI) en el gastrópodo estuarino *Neritina latissima* en 4 poblaciones de la Costa Pacífica de Puntarenas, Costa Rica, se encontró que la variación en las frecuencias de los diferentes morfos es regulada por depredación. No hay efectos aparentes de otros factores climáticos y ambientales. Fueron detectados 8 alelos polimórficos en G-6-FD y 14 en GFI utilizando electroforesis en geles de almidón. En ambos casos las frecuencias alélicas varían entre poblaciones pero existen variantes particulares en cada una de estas. La heterocigosis media por locus y por población es muy alta, oscilando entre 0,76 a 0,82 en G-6-FD y 0,78 a 0,87 en GFI. No fue encontrada ninguna asociación aparente entre la variación alozímica y los diferentes fenotipos.

REFERENCIAS

- Áyala, F.J.**
1975. Scientific hypotheses, natural selection and the neutrality theory of protein evolution, p. 14-42. In F.M. Salzano, the Role of Natural Selection in Human Evolution. North-Holland, Amsterdam.
- Brussard, P.F.**
1975. Geographic variation in North American colonies of *Cepaea nemoralis*. *Evolution*, 29: 402-410.
- Brussard, P. F., & G.F. McCracken**
1974. Allozymic variation in a North American colony of *Cepaea nemoralis*. *Heredity*, 33: 98-101.
- Cain, A.J., & P.M. Sheppard**
1954. Natural selection in *Cepaea*. *Genetics*, 39: 89-116.
- Clarke, A.**
1978. Polymorphism in marine mollusks in biome development. *Smithsonian Contributions to Zoology* 274. 14 p.
- Clarke, B.**
1975. The contribution of ecological genetics to evolutionary theory: detecting the direct effects of natural selection of particular polymorphic loci. *Genetics*, 79: 101-113.
- Dobzhansky, T., F.J. Ayala, G.L. Stebbins, & J.W. Valentine**
1977. *Evolution*. Freeman, San Francisco, 572 p.

- Ford, E.B.**
1971. Ecological Genetics. Chapman and Hall, London 410 p.
- Harris, H., & D.A. Hopkinson**
1976. Handbook of Enzyme Electrophoresis in Human Genetics. North-Holland, Amsterdam.
- Johnson, M.S.**
1976. Allozymes and area effects in *Cepaea nemoralis* on the Western Berkshire downs. Heredity, 36: 105-121.
- Johnson, M.S., B. Clarke, & J. Murray**
1977. Genetic variation and reproductiive isolation in *Partula*. Evolution, 31: 116-126.
- Keen, A.M.**
1971. Sea Shells of Tropical West America. Stanford University Press, Calif. 1064 p.
- Kimura, M.**
1968. Genetic variability maintained in a finite population due to mutational production of neutral and nearly neutral isoalleles. Genet. Res., 11: 247-269.
- Kimura, M., & Tomoko Ohta**
1974. On some principles governing molecular evolution. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71: 2848-2852.
- Koehn, R. K, R. Milkam, & J. Mitton**
1976. Populations genetics of marine pelecypods. IV Selection, migration and genetic differentiation in the blue mussel *Mytilus edulis*. Evolution, 30: 2-32.
- Levan, G., & K. Fredga**
1972. Isozyme polymorphism in three species of land snails. Hereditas, 71: 245-252.
- Lewontin, R.C.**
1974. The Genetic Basis of Evolutionary Change. Columbia University Press. 346 p.
- Lewontin, R.C., & J.L. Hubby**
1966. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. Genetics, 54: 595-609.
- Nei, M., T. Maruyama, & R. Chakraborty**
1975. The bottleneck effect and genetic variability in populations. Evolution, 29: 1-10.
- Nevo, E.**
1978. Genetic variation in natural populations: patterns and theory. Theor. Pop. Biol., 13 (1): 121-177.
- Selander, R.K.**
1976. Genic variation in natural populations, p. 21-45. In F.J. Ayala, Molecular Evolution. Sinauer, Mass. 277 p.
- Selander, R.K., & D. Kaufman**
1973. Self fertilization and genetic population structure in a colonizing land snail. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 70 (4): 1186-1190.
- Valdez, Marta**
1979. Variación en poblaciones naturales de *Neritina latissima* (Gastropoda: Neritidae) en Costa Rica. Tesis. Sistema de Estudios de Posgrado, Universidad de Costa Rica, 98 p.
- Valdez, Marta, & J.A. Briceño**
1980. Incorporación de manganeso en *Neritina latissima* (Gastropoda: Neritidae) en Costa Rica. Rev. Biol. Trop., 28: 175-180.