

# POLIMORFISMO DEL COLOR DE LAS CONCHAS EN POBLACIONES NATURALES DE LITTORINA FABALIS DEL MAR BLANCO (RUSIA)

González Conde, M., González-Lavín, N., Saura, M., Rivas Quenlle, M.J.,  
Gonchar, A.G.

e- mail: miriamgonzalezc@alumnos.uvigo.es

Trabajo Fin de Grado en

Biología

Tutores:

- Juan Galindo

- Emilio Rolán-Álvarez

Departamento de Bioquímica,

Genética e Inmunología

Facultad de Biología

Universidad de Vigo.

## Resumen

En el presente trabajo se estudiaron poblaciones de *Littorina fabalis* (Turton, 1825) de dos localidades del mar Blanco (Rusia). Se estudió el color de la concha, edad y sexo de los individuos a distintas escalas espaciales y entre microhábitats. Los análisis realizados sugieren que algún mecanismo selectivo está manteniendo el polimorfismo para el color en las poblaciones del mar Blanco y que las variaciones de edad a escala microgeográfica podría estar causadas por diferencias en su eficacia biológica.

## INTRODUCCIÓN

El polimorfismo para un carácter, es decir, la existencia de dos o más fenotipos con base genética en una población, evidencia la presencia de diversidad biológica en las especies. Esta variabilidad se ha utilizado como modelo para preguntarse y determinar los mecanismos evolutivos que contribuyen a su mantenimiento (Rodríguez & Vásquez, 2002; Forsman *et al.* 2008, Phifer-Rixey *et al.*, 2008).

La hipótesis nula de cualquier polimorfismo evolutivo es que es mantenido de forma neutra como consecuencia de un equilibrio entre la mutación y la deriva genética (Klug & Cummings, 1999; Hartl & Clark, 2007; Futuyma, 2013), pero salvo que el censo poblacional sea muy alto es difícil que un polimorfismo neutro mantenga una frecuencia estable en el tiempo, a no ser que actúe conjuntamente con otra fuerza evolutiva capaz de mantenerlo. Por lo tanto, cuando se observa un polimorfismo estable se suele atribuir a la acción de algún mecanismo selectivo (Punzalan *et al.*, 2005; Gray *et al.*, 2006; Forsman *et al.*, 2008; Hedrick, 2011).

*L. fabalis* se caracteriza por presentar un claro polimorfismo para el color de la concha (Sokolova *l. e al.*, 2000; Phifer-Rixey *et al.*, 2008; Rolán-Álvarez, *et al.*, 2012) aunque aún no existe un consenso sobre cuál es el mecanismo evolutivo que lo mantiene (Reid, 1996; Rolán-Álvarez, *et al.*, 2012 y 2015a). No obstante, ciertas evidencias sugieren que el polimorfismo en esta especie puede estar mantenido por selección natural ya que en las costas gallegas se ha demostrado que esta especie presenta apareamiento asociativo negativo para el color (Figura 1) (Rolán-Álvarez *et al.*, 1996; Rolán-Álvarez *et al.* 2012; Rolán-Álvarez *et al.*, 2015b).

Las poblaciones de *L. fabalis* del mar Blanco además del polimorfismo para el color se caracterizan por



**Figura 1:** Apareamiento asociativo negativo para el color. El macho es el espécimen de color amarillo, mientras que la hembra es la de color castaño (Rolán-Álvarez, 2012).

presentar anillos de crecimiento en la concha, las cuales permiten estudiar la edad de los individuos eficazmente. En este trabajo la hipótesis nula es que las diferencias de edad en los niveles de estudio (microáreas, transectos, localidades y microhábitats) son consecuencia del azar. En caso contrario nuestra hipótesis alternativa implica que alguna fuerza selectiva disminuye la eficacia de en alguna clase edad y determina la distribución de las cohortes.

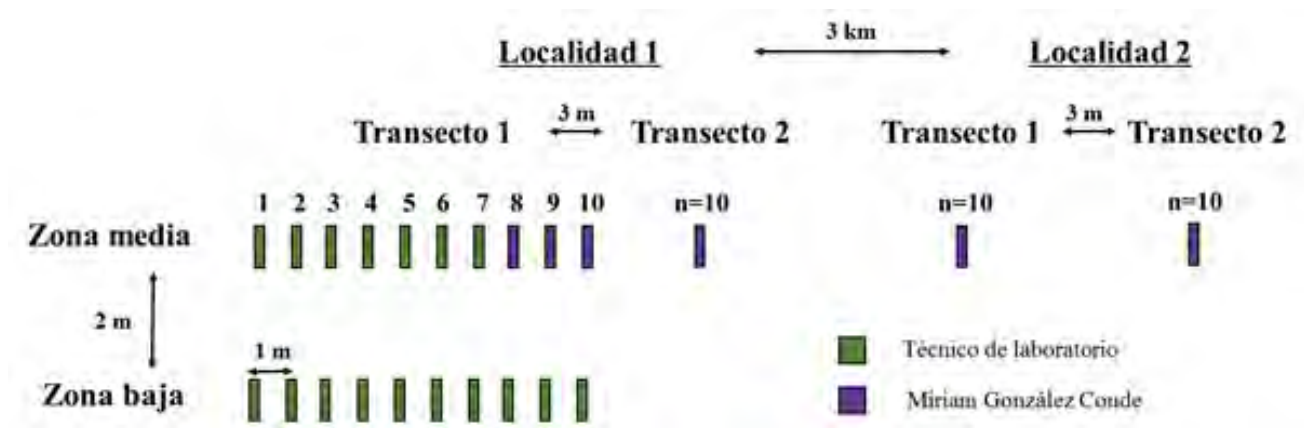
En el presente trabajo, se ha estudiado el color, sexo y edad en individuos de *L. fabalis* rusos a diferentes escalas espaciales, para:

1. Determinar si el patrón de variación del polimorfismo para el color de las conchas y la edad puede explicarse o no por azar.
2. Si se observa algún patrón de variación no aleatorio proponer mecanismos biológicos plausibles que puedan explicarlo.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Recolección de muestras

Las muestras de *Littorina fabalis* fueron recogidas en la zona intermareal de dos localidades de la República de Karelia en Agosto de 2011. El diseño experimental para cada localidad incluye dos transectos (Transecto 1 y Transecto 2) de la zona media del intermareal paralelos a la línea de costa. Además en la Localidad 1 se muestreó un transecto adicional pero en la zona baja del intermareal. A su vez cada transecto está compuesto por 10 microáreas (Figura 2). La recolección de los individuos de *L. fabalis* se realiza en cada una de las microáreas empleando un área circular de 30 cm de diámetro.



**Figura 2:** Esquema de las zonas muestreadas en las dos localidades estudiadas en el mar Blanco. En verde se muestran las microáreas analizadas por el técnico de laboratorio, mientras que en azul las analizadas por la autora del trabajo (el 66% de las muestras)

### Análisis de las muestras de *L. fabalis* en el laboratorio

En este estudio se analizó el color de la concha, el sexo y la edad de 403 individuos de *Littorina fabalis* pertenecientes a poblaciones de la zona costera del mar Blanco (Rusia). Un técnico de laboratorio del grupo de investigación del Dr. Emilio Rolán-Alvarez analizó en una etapa previa la mayoría de los especímenes de las zonas media y baja del Transecto 1 de la Localidad 1. El resto de las muestras las he analizado durante el transcurso de este trabajo (Figura 2).

El análisis de los caracteres anteriores se hizo mediante los criterios que se describen a continuación:

### + Caracterización fenotípica de la concha: color

Se determina el color de la concha empleando un patrón impreso (Figura 3) ya que al existir una correlación lineal entre los resultados obtenidos empleando este patrón y el espectro de reflectancia obtenido por un espectrómetro (Rolán-Alvarez, 2015b), se escoge el método más simple y económico.

El color y patrón de la concha se clasifican de acuerdo a 6 fenotipos: castaño y amarillo y las correspondientes formas bandeadas y moteadas. Los colores oliva y naranja se descartan de los análisis porque se encuentra a muy baja frecuencia en estas localidades.



Figura 3: Esquema de color empleado como referencia para determinar el color de los especímenes rusos (modificado de Rolán-Álvarez, 2012)

### + Determinación de la edad: análisis de los anillos de crecimiento de la concha

El prolongado período de congelación del mar Blanco junto con las bajas temperaturas provocan que los gasterópodos ralenticen su crecimiento y se formen líneas de interrupción del crecimiento en la concha, denominadas anillos de crecimiento, que permiten determinar con precisión la edad de los individuos y crear cohortes de edad para estimar cambios a lo largo del tiempo (Sukhotin, *et al.*, 2007; Granovitch *et al.* 2012; Rolán-Alvarez, *et al.*, 2015a).

Los anillos se cuentan desde la espiral hasta la abertura de la concha. Para que una línea de rotura se considere un anillo de crecimiento debe estar bien definida y cubrir la concha en su totalidad. Marcas muy próximas que comiencen y terminen en el mismo punto se consideran una sola. Del mismo modo, si la última marca se encuentra a una distancia menor o igual de 2 mm de la apertura no se tiene en cuenta porque no están claramente definidas.

### + Disección de los individuos: sexado y caracterización de la especie

Los individuos se diseccionan en el laboratorio para determinar el sexo y diferenciarlos de *L. obtusata* (Linnaeus, 1758) ya que son especies próximas y similares y el pene es la característica morfológica más fiable para diferenciar ambas especies (Williams, 1990; Reid, 1996; Carvalho, 2014). El pene de *L. fabalis* presenta un filamento largo y vermiforme con una única fila de 5-15 papilas, mientras que *L. obtusata* tiene un filamento corto y triangular con 2-3 filas de 16-65 glándulas papilares (Reid, 1996; Carvalho, J., 2014).

### Análisis estadísticos

Es necesario comprobar que la edad fue medida de manera similar en ambos grupos de datos ya que una diferencia de las variables color y sexo no es fácilmente objetivable. Esta comparación se realiza mediante el coeficiente de variación ( $CV = \text{Desviación Estandar} / \text{Media}$ ) que es una medida relativa de dispersión. En las medidas de edad tomadas por mí, también se pudo calcular el coeficiente de variación técnico estimado entre las medidas repetidas en los mismos individuos (Sokal & Rohlf, 1995; McDonald, 2014).

Por otro lado, con el software estadístico SPSS se realiza la prueba de proporción de verosimilitudes o prueba G para estudiar los cambios de frecuencia de color (castaño y amarillo), sexo (hembra y macho) y edad a las distintas escalas espaciales: entre microáreas, zonas, transectos y localidades bajo la hipótesis nula de que las diferencias son consecuencia del azar. A continuación es necesario aplicar un

método de corrección estadística para comprobar que un resultado significativo no es consecuencia del azar. Se utiliza la corrección de Bonferroni porque solo se pretende discutir los aspectos más relevantes de los datos. Mediante esta corrección la probabilidad de rechazo de cada test se divide por el número de pruebas semejantes realizadas (McDonald, 2014).

Por último si se detecta algún fenómeno biológico se aplica el método de Fisher para garantizar la credibilidad del resultado. Este método combina las probabilidades individuales de los test realizados para crear un test general (Sokal & Rohlf 1995; página 794). La significancia del resultado se comprueba mediante un test de independencia de chi cuadrado, siendo los grados de libertad  $2k$  ( $k$ = número de test independientes realizados) (Sokal & Rohlf, 1995).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Validación de la edad

La determinación de la edad está sujeta a ruido técnico debido a que los coeficientes de variación calculados ( $CV=55.8\%$  y  $CV=44.2\%$ ) para las personas que analizaron la edad de los especímenes son significativamente distintos ( $P<0.05$ ). Sin embargo, el coeficiente de variación técnico para mis datos fue muy bajo ( $8,8\%$ ), lo que indica que estos deben ser más fiables posiblemente por haber sido obtenidos mediante un promedio de tres medidas. Por otro lado la variable edad medida por el técnico en la zona media del T1&L1 no dio una correlación significativa con el tamaño ( $P\geq 0.05$ ), como si ocurre en las otras tres de las muestras analizadas por mí (Probabilidad<sub>T1&L1</sub>=0,359; Probabilidad<sub>T2&L1</sub>=0; Probabilidad<sub>T1&L2</sub>=0; Probabilidad<sub>T2&L2</sub>=0), lo que reafirma el hecho de que la edad no puede considerarse en este caso como una variable objetivamente comparable entre investigadores. Es conveniente que en un futuro se establezcan criterios para determinar la edad de una forma objetiva y de ese modo poder comparar resultados obtenidos por distintos investigadores.

### Análisis de frecuencias para el color, sexo y edad en muestras de la zona media

En primer lugar se estudia la variación de los caracteres entre las 10 microáreas de cada transecto (Tabla 1). En los caracteres color y sexo no se observan diferencias entre microáreas debido posiblemente a la existencia de poca variación microgeográfica. Por el contrario en el Transecto 2 de la Localidad 2 sí se encuentran diferencias de edad porque es el único transecto de la zona media en el que se encuentran individuos de entre 9 y 11 años. En el resto de transectos la cohorte de edad mayor es entre 7 y 9 años.

**Tabla 1** :Estudio de los cambios de frecuencia de color de la concha, sexo y edad entre microáreas de la zona media en los transectos de ambas localidades. El análisis se realizó mediante la prueba G de análisis de frecuencia, presentándose el valor del test (G), los grados de libertad (GL) y la probabilidad asociada al rechazo de la hipótesis nula (P). El conjunto de 12 test fue verificado por el método multitest de Bonferroni (los casos significativos después de la corrección se representan en negrita y subrayado; ver Material y Métodos).

Carácter	Localidad 1						Localidad 2					
	Transecto 1			Transecto 2			Transecto 1			Transecto 2		
	G	GL	P	G	GL	P	G	GL	P	G	GL	P
Color	5,8	9	0,759	10,4	9	0,319	20,2	9	0,017	11,0	9	0,277
Sexo	13,7	18	0,750	10,2	9	0,333	13,2	9	0,156	19,4	9	0,022
Edad	18,2	18	0,445	41,4	27	0,038	20,7	27	0,799	63,1	36	<b>0,003</b>



En el resultado del análisis de frecuencias a nivel de transectos tampoco se encuentran diferencias para el color de la concha ni para el sexo pero sí se detectan diferencias para la edad entre transectos de una misma localidad (Tabla 2. Figura 4). Una posible hipótesis es que estas diferencias estén causadas por depredación diferencial debido a una distribución desigual del depredador; blénido *Lipophrys pholis* (Linnaeus, 1758), el cual captura individuos de tamaño menor a 8 mm (Reid, 1996). Para confirmar esta hipótesis es necesario estudiar más transectos en estas y otras localidades y examinar la distribución y densidad de *Lipophrys pholis*, así como su capacidad de depredación sobre *L. fabalis* en la zona costera del mar Blanco (Rusia) mediante experimentos de comportamiento.

**Tabla 2 :** Estudio de los cambios de frecuencia de color de la concha, sexo y edad entre transectos de la zona media de ambas localidades. El análisis se realizó mediante la prueba G de análisis de frecuencia, presentándose el valor del test (G), los grados de libertad (GL) y la probabilidad asociada al rechazo de la hipótesis nula (P). El conjunto de 6 test fue verificado por el método multitest de Bonferroni (los casos significativos después de la corrección se representan en negrita y subrayado: ver Material y Métodos). .

Carácter	Localidad 1			Localidad 2		
	G	GL	P	G	GL	P
Color	0,6	1	0,446	1,7	1	0,198
Sexo	2,7	1	0,098	0,3	1	0,587
Edad	14,2	3	<b><u>0,003</u></b>	18	4	<b><u>0,001</u></b>

Por último en la comparación entre localidades (Tabla 3) se observan resultados diferentes a los anteriores. En este caso no se encuentran diferencias significativas para sexo o edad pero sí para color.

**Tabla 3 :** Estudio de los cambios de frecuencia de color de la concha, sexo y edad entre localidades. El análisis se realizó mediante la prueba G de análisis de frecuencia, presentándose el valor del test (G), los grados de libertad (GL) y la probabilidad asociada al rechazo de la hipótesis nula (P). El conjunto de 3 test fue verificado mediante el método multitest de Bonferroni (los casos significativos después de la corrección se representan en negrita y subrayado; ver Material y Métodos). .

Carácter	Entre localidades		
	G	GL	P
Color	27,1	1	<b><u>0</u></b>
Sexo	5,103	1	0,024
Edad	7,8	4	0,098

El carácter sexo se mantiene homogéneo en las tres escalas estudiadas (microárea, transecto y localidad) debido posiblemente a la escasa dispersión local de los individuos. Por consiguiente, los sexos se encuentran igualmente favorecidos/desfavorecidos en su contexto biológico es decir, ninguno es más eficaz que el otro (Johannesson, 2016). Todos los trabajos que han estudiado la distribución de sexos en esta especie se han encontrado con el mismo resultado (Rolán-Alvarez, *et al.*, 2015a)

No hay diferencias significativas para edad entre localidades pero si se encontraron a escala microgeográfica (entre microáreas y transectos; Figura 4). Sin embargo el efecto de microárea sólo se detectó en el Transecto 2 de la Localidad 2 por lo que parece una peculiaridad biológica o técnica de dicha muestra. La variación entre transectos parece más relevante biológicamente porque se detecta en ambas localidades (si bien en la Localidad 1 no puede descartarse que haya ruido técnico como consecuencia de haber sido dos investigadores los que tomaron las medidas de edad). La diferencia entre transectos se debe a que los individuos alcanzan una mayor edad en uno de los transectos de cada localidad. Una hipótesis de trabajo posible a verificar en el futuro es si la distribución espacial de los depredadores de esta especie podría estar contribuyendo a la variación de la edad.

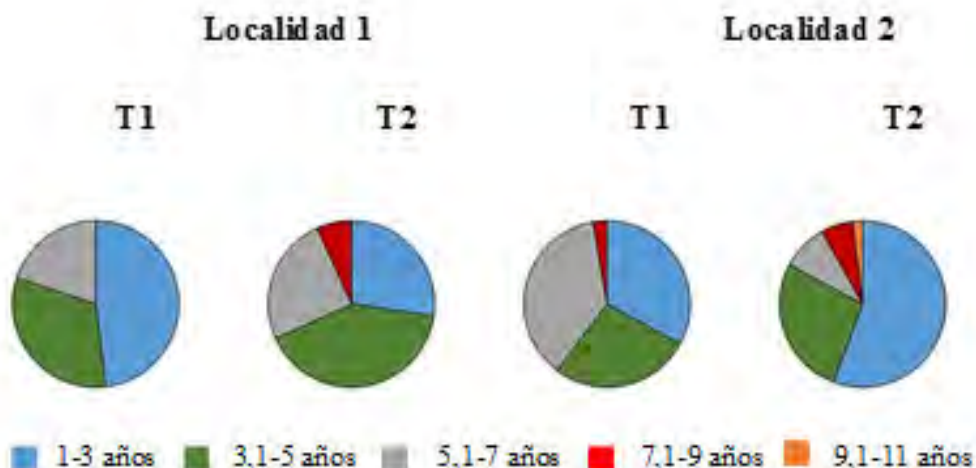


Figura 4: Porcentaje (%) de edad de cada uno de los individuos de la zona media en los transectos (T1 y T2) de cada localidad (L1 y L2). La edad se agrupa en 5 cohortes (González M., 2016).

Para el color de las conchas las diferencias solo se observan cuando se comparan ambas localidades (Tabla 3. Figura 5). Estas están separadas aproximadamente 3 km por lo que la variación de color puede ser causado por un mecanismo selectivo o por deriva genética. La hipótesis principal es que las diferencias de color son causadas por deriva ya que es probable que las poblaciones estén bajo la influencia de distintos factores bióticos o abióticos, lo que favorece en distinta medida uno u otro color. Es necesario repetir este análisis comparando más localidades para de ese modo asegurar que el resultado es el mismo y poder así determinar que fuerza es la causante de la diferencia de color entre localidades.

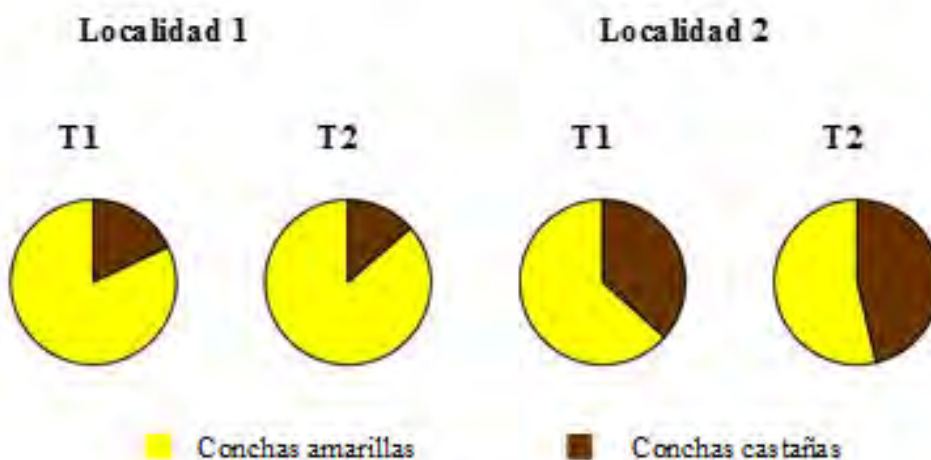


Figura 5: Porcentaje de color de concha en la zona media de los transectos (T1 y T2) de cada localidad (L1 y L2) (González M., 2016).

Según Sokolova & Berger (2000) el color de las conchas está muy influenciado por gradientes de temperatura, salinidad, insolación, oxígeno, oleaje, etc. En su estudio con *Littorina saxatilis* de poblaciones del mar Blanco no encontraron relación entre el color y el consumo de oxígeno, actividad a baja salinidad o comportamiento por cambios bruscos de salinidad por lo que se pueden descartar como factores causantes de la diferente distribución de color en las localidades de este estudio. Por otro lado, según Reid (1996) en algunas zonas como Galicia, Gran Bretaña o Bélgica las formas amarillas predominan en costas protegidas del oleaje mientras que las oscuras son más comunes en las expuestas.

#### Comparación entre niveles del intermareal: zona baja y media

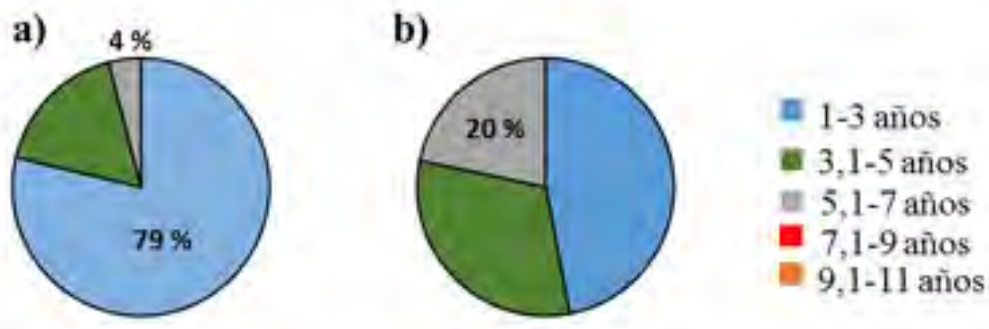
A continuación se determina la variación de los caracteres estudiados (color, sexo y edad) entre la zona media y baja del intermareal. En este caso las diferencias de los caracteres entre microhábitats solamente pudieron ser estudiados para el Transecto 1 de la Localidad 1 puesto que no se realizaron los muestreos para la zona baja en el resto de transectos. El objetivo es comprobar que a una escala menor se mantiene el patrón de color observado en la Localidad 1 para la zona media y de ese modo poder dilucidar qué mecanismo es el causante de dicha variación. En un primer momento no se espera encontrar ninguna diferencia porque son zonas que se encuentran próximas, separadas por uno o dos metros, por lo que están bajo la influencia de los mismos factores bióticos y abióticos. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.

**Tabla 4** :Estudio de los cambios de frecuencia de color de concha, sexo y edad de *L. fabalis* en las microáreas de cada hábitat y entre hábitats (zona baja y media del transecto 1 de la localidad 1). El análisis se realizó mediante la prueba G de análisis de frecuencia, presentándose el valor del test (G), los grados de libertad (GL) y la probabilidad asociada al rechazo de la hipótesis nula (P). El conjunto de 9 test fue verificado mediante el método multitest de Bonferroni (los casos significativos después de la corrección se representan en negrita y subrayado).

Carácter	Zona baja			Zona media			Entre microhábitats		
	G	GL	P	G	GL	P	G	GL	P
Color	11,1	9	0,270	5,8	9	0,759	17,0	1	<b><u>0</u></b>
Sexo	8,9	9	0,442	13,7	18	0,750	5,1	2	0,076
Edad	21,7	18	0,245	18,2	18	0,445	18,1	2	<b><u>0</u></b>

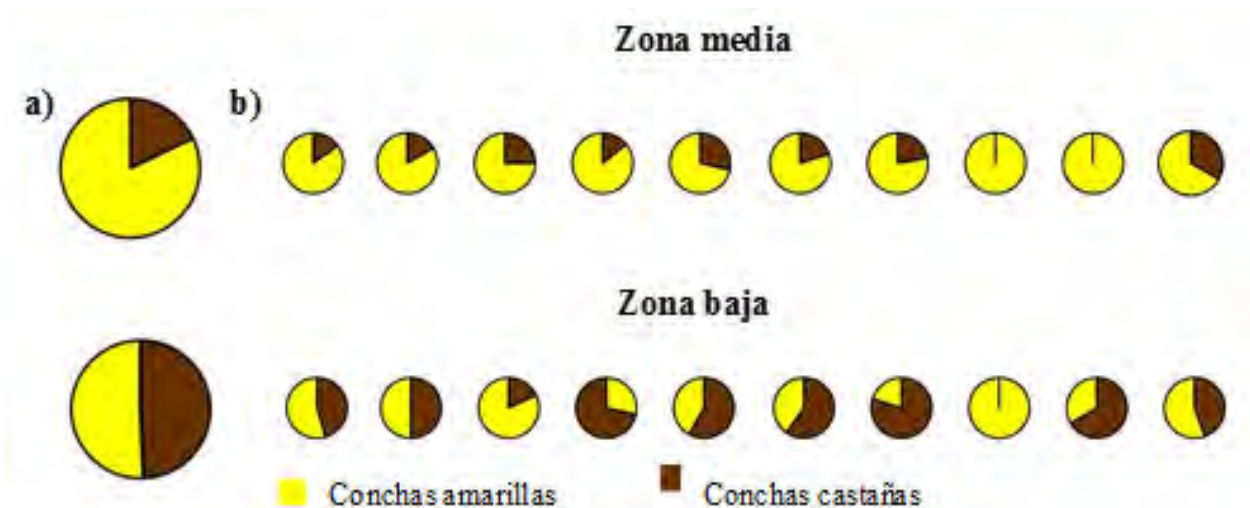
Ninguno de los caracteres presenta diferencias dentro de cada microhábitat. Dicha homogeneidad puede ser consecuencia de la poca o nula variación microgeográfica de los hábitats. Si se repite el análisis pero entre microhábitats no se encuentran diferencias para sexo, lo que concuerda con los resultados obtenidos en la zona media y por lo tanto se reafirma la hipótesis de que el sexo se distribuye aleatoriamente. Lo destacable y a diferencia de lo que se suponía en párrafos anteriores es que sí se encuentran diferencias para edad y color entre hábitats (Tabla 4). Reid (1996) ya observó en esta especie que ciertas diferencias morfológicas se mantenían en una misma costa, pero desconocía cuál era la influencia genética o del ambiente en el fenotipo.

La diferencia de edad observada entre los hábitats se debe a que en la zona baja predominan individuos de 1-3 años (78,7 %) encontrándose un porcentaje muy bajo de individuos con 5-7 años (4 %) al contrario que en la zona media donde casi un 20 % de los especímenes alcanzan esa edad. No se tiene ninguna hipótesis que pueda explicar los resultados obtenidos aunque es posible que esta diferencia sea consecuencia de la distribución del depredador (Figura 6).



**Figura 6:** Porcentaje (%) de individuos en cada cohorte de edad en la zona baja y media del Transecto 1 Localidad 1. La edad se agrupa en 5 cohortes (González M., 2016).

A una escala tan pequeña la diferencia de color no puede explicarse por azar ya que como se puede observar en la Figura 7 en cada una de las zonas del Transecto 1 de la Localidad 1 el color parece seguir una tendencia distinta; en la zona media hacia el amarillo y en la zona baja hacia el castaño. Si realmente las diferencias fueran fruto del remuestreo la tendencia tendría que ser aleatoria en ambas zonas. Para asegurarnos de ello se realiza un análisis estadístico cuya finalidad es combinar la probabilidad de todos los test independientes realizados (ver Material y Métodos).



**Figura 7:** a) Porcentaje (%) total de individuos con color de concha amarilla y castaña en la zona baja y media del Transecto 1, Localidad 1. b) Porcentaje (%) de individuos con color de concha amarilla y castaña en cada una de las 10 microáreas de la zona baja y media del Transecto 1 de la Localidad 1 (González M., 2016).

Al ser la suma de las probabilidades  $(-2 \sum \ln P = 37,54) > X^2_{0,05(18)}$  se rechaza la hipótesis nula ( $P = 0,05$ ) por lo que se reafirma que hay diferencias de color entre los hábitats debido a la acción de algún mecanismo no aleatorio. Una posible hipótesis, es que las poblaciones de cada hábitat estén siendo afectadas por regímenes ecológicos y de depredación diferentes, como resultado de la heterogeneidad ambiental, que condicionan la frecuencia de colores y edades (Phifer-Rixey *et al.*, 2008). En otros estudios, también se encontraron cambios de frecuencia para el color a escalas espaciales pequeñas. Phifer-Rixey *et al.* (2008) encontraron evidencias de un cambio en las frecuencias del color de la concha de *L. obtusata* por selección natural a causa de un gradiente térmico aunque suponen que otro factor, principalmente la selección apostática, tiene que estar contribuyendo al mantenimiento de este polimorfismo. Por otro lado Reimchen (1979) observó en varias localidades de Reino Unido un cambio



evidente en las frecuencias de color en conchas de *L. fabalis* entre 25 y 50 metros. En el género *Littorina*, también se han observado diferencias microgeográficas en otros tipos de genes debido a mecanismos selectivos por ejemplo, se encontró una fuerte variación en la frecuencia de los alelos de la aspartato aminotransferasa en *L. saxatilis* y arginina quinasa en *L. fabalis*, en dos puntos de una misma zona como consecuencia de selección diferencial (Reid, 1996; Lehjall, 1998; Tatarenkov & Johannesson, 1998; Johannesson & Mikhailova, 2004; Johannesson, 2016). Por lo tanto no es descabellado pensar que las diferencias de color entre nuestros microhábitats puedan estar causadas por algún mecanismo selectivo.

## CONCLUSIÓN

Nuestro análisis sobre el patrón de variación de color y edad en poblaciones naturales del mar Blanco de *L. fabalis* nos permite concluir que:

1. La variación de color concuerda con un polimorfismo selectivo entre microhábitats pero no a una escala mayor.
2. La existencia de variación para edad entre transectos y microhábitats puede estar causado por efectos de depredación, aunque no se puede descartar la influencia de ruido técnico.

Al tratarse de una evidencia indirecta se requiere de experimentos independientes y de manipulación para probar que un mecanismo selectivo provoca la variación observada en el color y edad así como su acción específica, directa o indirecta, sobre dichos caracteres.

## BIBLIOGRAFÍA

- Carvalho J. G. (2014). Study on the diversification of flat priwinkles (*Littorina fabalis* and *L. obtusata*): insights from genetics and geometric morphometrics. Tesis Doctoral. Universidad de Lisboa
- Forsman A., Ahnesjö J., Caesar S., Karlsson M. (2008). A model of ecological and evolutionary consequences of color polymorphism. *Ecol Soc Am.* 89: 34-40.
- Futuyma, D.J., (2013). *Evolution*. 3 edición. Sunderland, Massachusetts, USA Sinauer associates, INC..
- Granovitch A.I., Maximovich A.N., (2013). Long-term population dynamics of *Littorina obtusata*: the spatil structura and impact of trematodes. *Hydrobiologia* 706: 91-101.
- Gray, S.M., McKinnon J.S., (2006). Linking color polymorphism maintenance and speciation. *Trends Ecol.Evol.* 22: 71-79
- Hartl D.L., Clark., A.G.. (2007). *Principles of Population Genetic*. 4 edición. Sunderland, Massachusetts, USA. Sinauer associates, INC.
- Ibm.com. (2016). IBM Knowledge Center. Recuperado el 9 de Mayo de 2016 de [http://www.ibm.com/support/knowledgecenter/SSLVMB\\_22.0.0/com.ibm.spss.statistics.help/spss/base/idh\\_corr.htm?lang=es](http://www.ibm.com/support/knowledgecenter/SSLVMB_22.0.0/com.ibm.spss.statistics.help/spss/base/idh_corr.htm?lang=es)
- Johannesson, K., (2016). What can be learnt from a snail?. *Evolutionary applications* 9: 153-165.
- Johannesson, K., Saltin, S.H., Duranovic, I., Havenhand J.N., Jonsson P.R. (2010). Indiscriminate males: mating behaviour of marina snail compromised by a sexual conflict?. *PLoS ONE* 5: 1-7

- Johannesson, K., Mikhailova, N. (2004). Habitat-related genetic substructuring in a marine snail (*Littorina fabalis*) involving a tight link between an allozyme and a DNA locus. *Biol J Linnean Soc.* 81: 301-306.
- Klug W.S., Cummings, M.R., (1999). *Conceptos de genética*. 5ª edición. Madrid, España. Prentice hall.
- McDonald, J.H., (2014). *Handbook of Biological Statistics*. 3 edición. Baltimore, Maryland. Sparky House Publishing,. Recuperado el 9 de Mayo de 2016 de <http://www.biostat handbook.com/#print>
- Phifer-Rixey M., Heckman M., Trussell G.C., Schmidt P.S. (2008), Maintenance of clinal variation for shell colour phenotype in the flat periwinkle *Littorina obtusata*. *ESEB* 21: 966-978.
- Punzalan D., Rodd F.H., Hughes K.A., (2005). Perceptual processes and the maintenance of polymorphism through frequency-dependent predation. *Evol. Ecol.* 19: 303-320.
- Reid, D.G. (1996). *Systematics and evolution of Littorina*. London: The Ray Society.
- Reimchen T.E. (1979). Substratum heterogeneity, crypsis, and colour polymorphism in an intertidal snail (*Littorina mariae*). *Can. J. Zool.* 57: 1070-1085.
- Rolán-Alvarez E., Ekendahl A., (1996). Sexual selection and non-random mating for shell colour in a natural population of the marine snail *Littorina mariae* (Gastropoda: Prosobranchia). *Genética* 97: 39-46.
- Rolán-Alvarez E., Caballero A., (2000). Estimating sexual selection and sexual isolation effects from mating frequencies. *Evolution* 54: 30-36.
- Rolán-Alvarez E., Saura M., Diz A.P., Rivas M.J., Alvarez M., Cortés B., Coó A., Estévez D., Iglesias L. (2012). Can sexual selection and disassortative mating contribute to the maintenance of a shell color polymorphism in an intertidal merine snail?. *Curr Zool.* 69: 1845-1857.
- Rolán-Alvarez E., Austin C.J., Boulding E.G., (2015a). The contribution of the genus *Littorina* to the field of evolutionary ecology. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 53: 157-214.
- Rolán-Alvarez E., Carvajal-Rodríguez A., Coó A., Cortés B., Estévez D., Ferreira M., González R., Briscoe A.D., (2015b). The scale of choice effect and how estimates of assortative mating in the wild can be biased due to the heterogeneous samples. *Evolution* 58: 463-474.
- Sokal R.R., Rohlf F.J., (1995). *Biometry*. 3 edición. New York, USA. W.H. Freeman and company.
- Sokolova I.M., Berger V.Ja. (2000). Physiological variation related to shell colour polymorphism in White Sea *Littorina saxatilis*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 245: 1-23.
- Sukhotin, A. A., Strelkov, P. P., Maximovich, N. V., Hummel, H., 2007. Growth and longevity of *Mytilus edulis* (L.) from northeast Europe. *Mar. Biol. Res.* 3: 155-167.
- Tatarenkov, A., Johannesson, K. (1999). Micro- and macrogeographic allozyme variation in *Littorina fabalis*; do sheltered and exposed form hybridize?. *Biol J Linnean Soc.* 67: 199-212.
- Williams, G.A., 1990. The comparative ecology of the flat periwinkles *Littorina obtusata* (L.) and *L. mariae* (Sacchi et Rastelli). *Field studies* 7: 469-482.