

RELACIONES ENTRE VARIABLES FISIOLÓGICAS, HETEROCIGOSIDAD Y EFICIENCIA DE CRECIMIENTO EN *Tiostrea chilensis*, (Philippi 1845).^(*)

Trabajo presentado en las XII Jornadas de Ciencias del Mar, Santiago, mayo 1992.

ANA M. VERGARA¹, JORGE E. TORO¹ y KURT A. PASCHKE¹

Ana M. Vergara¹, Jorge E. Toro¹ y Kurt A. Paschke¹: Relationship among physiological variables, heterozygosity and growth efficiency in *Tiostrea chilensis* (Philippi 1845).

Oysters (*Tiostrea chilensis*), from a three year old cohort which came from the natural population of the Quempillén River Estuary (Southern Chile) were used for the determination of physiological variables (ingestion rate, absorption, excretion, oxygen consumption) and individual heterozygosity. The filtration rate, ingestion rate and net absorption efficiency increases with individual size, explaining the size differences found within the same cohort. The oxygen consumption and excretion rates shows also an increase in large size individuals, however, the tendency was less than the reported in the literature. The slopes of the plots for standardized filtration and respiration rate against heterozygosity were not statistically significant. However, standardized organic ingestion rate, excretion rate and absorption rate have a significant ($p < 0.05$) decrease with an increase in the heterozygosity. The results indicate that large individuals with higher ingestion and absorption rate are homozygous. The population studied is under Hardy Weinberg equilibrium ($P > 0.05$) with a negative index of heterozygosity ($D = -0.43$), which indicates an heterozygous deficiency.

Key words: Heterozygosity, growth rate, *Tiostrea chilensis*.

1) Instituto de Biología Marina, Universidad Austral de Chile, Casilla 567, Valdivia, Chile.

*) El contenido de esta publicación es parte de los resultados considerados en el proyecto Fondecyt 91,0897.

INTRODUCCION

En una clase anual de una población natural de bivalvos marinos pueden encontrarse tasas de crecimiento diferenciadas. Se ha comprobado que esta tasa de crecimiento diferencial está regida al menos en parte por una componente de tipo genético al encontrarse correlaciones positivas entre caracteres relacionados con la aptitud biológica y el grado de heterocigosidad individual en una serie de loci. Es así como se ha encontrado relaciones positivas entre tasa de creci-

miento y heterocigosidad en especies como la ostra americana *Crassostrea virginica* (Singh & Zouros, 1978; Singh, 1982; Foltz *et al.*, 1983), en *Mytilus edulis* (Koehn & Gaffney, 1984; Hawkins *et al.*, 1986; Gentili & Beaumont, 1988), *Mulinia lateralis* (Garton *et al.*, 1984) entre otros. Sin embargo, esta correlación no constituye una situación generalizada. En individuos cultivados en hatchery esta relación no fue detectada (Foltz & Chatry, 1986; Beaumont *et al.*, 1983; Adamkewicz *et al.*, 1984). Una explicación para el fracaso en encontrar esta relación en indivi-

duos producidos en hatchery es el limitado número de genomas parentales que participan, resultado del cruce dirigido.

Por otra parte, varios estudios han relacionado parámetros metabólicos (fisiológicos) con la heterocigosidad. Koehn & Shumway (1982) trabajando con *C. virginica* encontraron que los individuos más heterocigotos consumían menos oxígeno que los homocigotos y esta diferencia se veía acentuada en condiciones de estrés. En esta misma especie se encontró un significativo efecto de la heterocigosidad sobre individuos ayunados, decreciendo la tasa de pérdida de peso con el incremento en la heterocigosidad (Rodhouse & Gaffney, 1984). Garton *et al.* (1984), en un estudio que incluyó varios parámetros metabólicos en *M. lateralis*, encontraron una correlación positiva entre heterocigosidad y "potencial para actividad".

En base a todos los antecedentes mencionados, el mayor crecimiento experimentado por los individuos más heterocigotos debería ser el reflejo de una mayor eficiencia en la utilización de la energía consumida (Koehn *et al.* 1988). Un mayor entendimiento entre la relación heterocigosidad-crecimiento podría entonces ser encontrada a través del estudio de la distribución de energía (balance energético) hecha por los individuos según su grado de heterocigosidad.

Por tal motivo, se postula que individuos heterocigotos de *Tiostrea chilensis* alcanzarían un mayor tamaño debido a un mejor uso de la energía disponible logrando un mayor potencial de crecimiento (scope for growth) que los homocigotos.

MATERIAL Y METODOS

ANIMALES EXPERIMENTALES: Los individuos de *Tiostrea chilensis* utilizados en el presente estudio fueron capturados en planchas de plástico en la temporada 87-88 desde el banco de dicha especie presente en el estuario del río Quempillén, Chiloé (41° 52' S y 73° 46' W). A los tres años de edad se evaluó en ellos su comportamiento fisio-energético a través de la medición de las tasas de ingestión, absorción, excreción y consumo de oxígeno, obteniéndose a partir de ellas el "scope for growth", todo lo cual fue relacionado con el genotipo a 4 loci enzimáticos.

Para ello, se eligió en base al peso vivo 100 ejemplares representativos de toda la distribución de peso vivo de la cohorte (N= 5.030), los cuales fueron marcados individualmente.

Los individuos fueron mantenidos en el hatchery de la Estación Experimental Quempillén a 13°C y 28 ppm de temperatura y salinidad respectivamente, con recambio de agua cada dos días y alimentación continua consistente en cultivo puro de *Isochrysis aff galbana* (T-Iso). En dicho laboratorio se realizaron los experimentos tendientes a determinar la tasa de filtración, ingestión y eficiencia de asimilación. Luego fueron trasladados al Laboratorio de Genética Aplicada del Instituto de Biología Marina en Valdivia donde se les determinó la tasa de respiración y excreción.

Una vez obtenidas dos réplicas de cada tasa fisiológica por individuo, estos fueron congelados a -30°C y posteriormente enviados al laboratorio Biotecmar (Talcahuano) para el análisis electroforé-

tico. Las enzimas polimórficas fueron leucina aminopeptidasa (LAP), fosfoglucoasa mutasa (PGM), fosfoglucoasa isomerasa (PGI) y anhidrasa carbonica (CA) (Guiñez *et al.*, 1986).

Debido a los análisis no se pudo obtener los valores de peso seco de la carne, por lo cual se construyó, con otro grupo de individuos, una curva peso seco/peso vivo y se estimó el peso seco en base al peso vivo de los individuos experimentales: P.SECO CARNE = (PESO VIVO-5.112)/21.228 ($r=0.925$; $n=131$; $p<0.05$). Lo anterior se llevó a cabo con el fin de correlacionar las tasas fisiológicas con el peso seco.

TASAS DE FILTRACION, INGESTION Y EFICIENCIA DE ABSORCION: Para la determinación de estas tasas se cuantificó la cantidad de materia orgánica e inorgánica tanto del alimento ofrecido como de las fecas producidas. Con ese propósito, se llevaron a cabo experimentos de alimentación durante 20 horas en una batea de 450 l de agua de mar filtrada (1 μm) con adición continua de cultivo puro de T-Iso a una concentración constante de 15×10^6 cel/l. Las ostras fueron colocadas en la batea dentro de colectores de fecas individuales, cuyo principio se basa en la retención de las fecas por un tamiz de 100 μm . La resuspensión de las fecas se evita al generar una corriente de agua desde la abertura superior, a través del tamiz por medio de un sistema de sifón producido por aire (Fig. 1). La concentración inicial del alimento ofrecido, así como su constancia durante el experimento fueron medidos con un Contador de Partículas ELZONE 180XY. Después de las 20 hrs. de alimentación, se colectaron las fecas y se secaron a 90°C hasta peso constante, previo lavado con for-

miato de amonio 3 %. La fracción inorgánica de las fecas se cuantificó combus-tionando la muestra a 450°C por 4 horas, y por diferencia del peso seco se obtuvo la materia orgánica.

El mismo tratamiento se realizó con el alimento suministrado, obtenién-dose los siguientes valores para 1×10^6 células T-Iso: Peso seco = 0.0293 mg; Ceniza = 0.0033 mg; Materia orgánica = 0.026 mg.

Las tasas fisiológicas fueron de-terminadas en base a Conover (1966) cuyo método supone básicamente que sólo la materia orgánica del alimento es afectada por los procesos de absorción. Los resultados son expresados en litros \times hora⁻¹ para tasa de filtración; en mg mat. org. T-Iso \times hora⁻¹ para tasa de ingestión y absorción y en % para eficiencia de absorción.

Las transformaciones a energía se hicieron utilizando el equivalente 1 mg mat. org. T-Iso = 18.75 joules (Whyte, 1987).

TASA DE EXCRECION: La tasa de excreción del amonio-N se determinó por el método de fenolhipoclorito de Solorzano (1969), incubando cada ostra por 3 horas en agua de mar filtrada (0.45 μm) en frascos de vidrio previamente lavados con HCL diluido y enjuagados con agua destilada.

Los resultados son expresados en μg de $\text{NH}_4\text{-N} \times \text{hora}^{-1}$ y las transformaciones a energía se realizaron utilizando la equivalencia de 1 mg $\text{NH}_4\text{-N} = 24.8$ joules (Elliot & Davison, 1975).

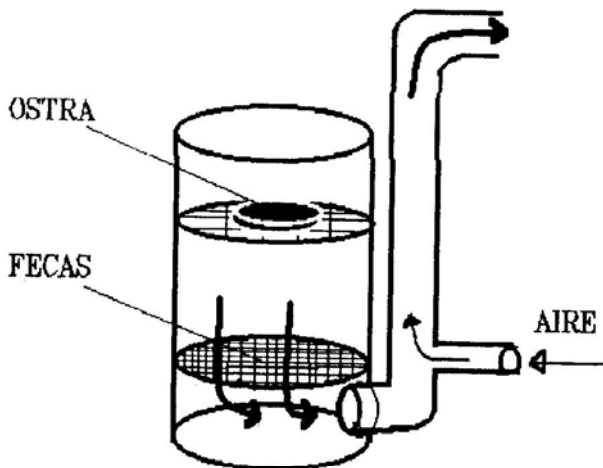


Fig. 1. Esquema del sistema diseñado por los autores para determinar la tasa de filtración, tasa de ingestión y tasa de absorción en ejemplares de *Tiostraea chilensis*. Las flechas indican la circulación del agua en el sistema.

TASA DE RESPIRACION: Esta tasa fue medida utilizando un analizador polarográfico descrito por Ríos (1979). Este consta básicamente de cámaras experimentales de 1 litro; un electrodo, que capta la tensión de oxígeno, cuya señal es amplificada y registrada automáticamente en función del tiempo. Las tasas de respiración se calcularon en base al tiempo que demoró en consumir cada ostra el 10% del oxígeno dentro de la cámara. Los resultados fueron expresados en $\text{ml O}_2 \times \text{hora}^{-1}$ y se hicieron las transformaciones a energía utilizando la equivalencia de $1 \text{ ml O}_2 = 19.88 \text{ joules}$ (Thompson & Bayne, 1974).

POTENCIAL DE CRECIMIENTO Y EFICIENCIA NETA DE CRECIMIENTO: El potencial de crecimiento (P) se obtuvo al sustraer de la energía absorbida las "pérdidas" energéticas por concepto de respiración y excreción. "P" equivale a la energía que el organismo es capaz de destinar para crecimiento y reproducción por unidad de tiempo.

La eficiencia neta de crecimiento (K_2), expresada en porcentaje, se estimó al dividir P por la energía absorbida. El K_2 representa el porcentaje de la energía absorbida que el organismo destina a crecimiento y reproducción.

GRADO DE HETEROCIGOSIDAD INDIVIDUAL: De los resultados electroforéticos se obtuvo el grado de heterocigosidad (H) para cada individuo. Para ello, se contó el número de loci para los cuales el individuo era heterocigoto, obteniéndose valores entre 0 y 4. Para cada valor de H se obtuvo el promedio y desviación estándar de peso seco y de las tasas fisiológicas estandarizadas a una ostra estándar promedio (peso promedio=0.819 gr p. seco), según el índice dado por Bayne & Newell, 1983 y Hawkins *et al.*, 1986.

De este modo se correlacionó el tamaño (p. seco) y las tasas fisiológicas corregidas versus el número de loci heterocigotos.

EQUILIBRIO HARDY-WEINBERG E INDICE DE DESVIACION DE HETEROCIGOTOS: Con la información obtenida de los análisis electroforéticos, se obtuvo las frecuencias alélicas para cada loci y en base a ellas se determinó si la población estudiada estaba en equilibrio de Hardy-

Weinberg (Falconer, 1981). El test de χ^2 fue usado para determinar desviaciones significativas entre las frecuencias observadas y esperadas.

El índice relativo de desviación de heterocigotos del valor esperado bajo equilibrio de Hardy-Weinberg, D, se obtuvo de: (Hobs-Hesp)/Hesp, donde Hobs es la heterocigosidad observada y Hesp es la heterocigosidad esperada bajo equilibrio de Hardy-Weinberg.

RESULTADOS Y DISCUSION

La tabla 1 muestra que las frecuencias genotípicas están en equilibrio Hardy-Weinberg excepto para CA. En esta tabla también están incluidos los valores de D para cada loci, encontrándose una mayor proporción de valores negativos, con un promedio de -0.43, siendo el loci CA el más deficiente de heterocigotos, lo que explicaría su alejamiento del equilibrio Hardy-Weinberg.

Tabla 1. *Tiostrea chilensis*. Heterocigosidad observada (Ho) para 4 loci. 2N = Número total de genes en la muestra. D = Índice relativo de desviación de heterocigotos del valor esperado. χ^2 = Test de chi-cuadrado de la bondad de ajuste con el equilibrio Hardy-Weinberg (H-W) esperado. HW (p) = Probabilidad del test de χ^2 .

LOCUS	N	Ho	D	χ^2	HW (p)
LAP	71	0.447	0.007	0.004	NS
PGI	71	0.268	0.014	0.016	NS
PGM	71	0.155	0.072	0.320	NS
CA	71	0.408	0.352	20.35	**

El hallazgo de una deficiencia de heterocigotos corresponde a un hecho común en moluscos. En efecto, Zouros & Foltz (1984), en una amplia revisión dan

cuenta de 24 especies de bivalvos marinos en las cuales se ha encontrado esta deficiencia. Estos mismos autores dan como posibles causas la selección dife-

rencial en estados larvales o un desove genotipo dependiente. Otras posibles causas pueden ser el efecto Wahlund o consanguinidad (Singh & Green, 1984). También se ha encontrado que las poblaciones con marcada deficiencia de heterocigotos corresponden a aquellas donde se ha podido establecer una clara relación entre heterocigosidad y crecimiento (Zouros, 1987 citado por Volckaert & Zouros, 1989). Al respecto mayor información debe ser obtenida en nuestra población para establecer sus causas.

Con respecto a las variables fisiológicas, la tasa de filtración (T.F) representa el volumen de agua que es filtrado y liberado de partículas por unidad de tiempo y varía según la concentración de alimento y el tamaño corporal. Los resultados obtenidos son expresados por la siguiente regresión:

T.F. = 1.789 P.S.E.^{0.298}. En esta ecuación se observa que la tasa de filtración incrementa con el tamaño corporal expresado como peso seco (P.S.E.). Los valores obtenidos son mayores a los reportados por Winter *et al.* (1984) para la misma especie y para una concentración de 20×10^6 cel/l de *Dunaliella marina*.

La tasa de ingestión se obtuvo a partir de la tasa de filtración y el peso seco del alimento presente. A la concentración trabajada no hubo producción de pseudofecas por lo que la cantidad de alimento filtrado es igual a la cantidad de alimento ingerido. Como el método Conover involucra solo la utilización de la materia orgánica, se obtuvo la tasa de ingestión orgánica neta (T.I.O.) (Fig. 2a). En esta figura se aprecia que los individuos de mayor tamaño ingirieron una mayor cantidad de materia orgánica por día ($r=0.65$; $p<0.05$).

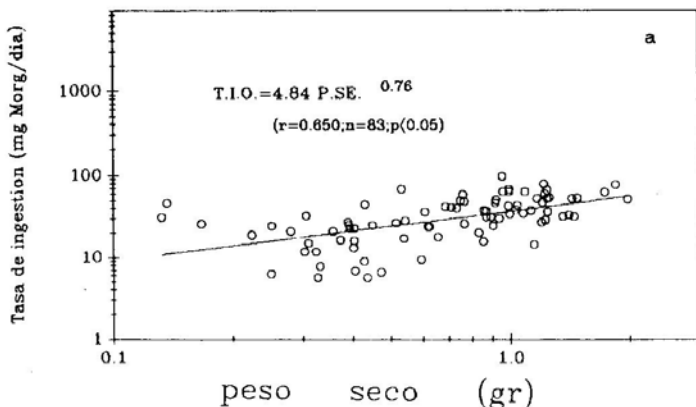


Fig. 2. *Tiostrea chilensis*. a) Ración de materia orgánica ingerida por día (T.I.O) según el tamaño corporal (peso seco carne = P.S.E.), a una concentración de alimento de 15×10^6 cel. T-Iso/1

La eficiencia de absorción (Ef. A.) (Fig. 2b), que corresponde a la cantidad de materia orgánica absorbida expresada como porcentaje de la materia orgánica ingerida, mostró dependencia del tamaño corporal, a diferencia de lo encontrado por Winter *et al.* (1984) y Navarro & Winter (1982).

Al igual que lo reportado en la literatura, a medida que aumentó el tamaño

corporal, el consumo de oxígeno (VO_2) también incrementó (Fig. 3b). Los valores de consumo de oxígeno encontrados son similares a los reportados por Winter *et al.* (1984), aunque la pendiente es ligeramente inferior.

Similar tendencia fue encontrada para la tasa de excreción de Amonio-N (VNH_4) (Fig. 3a).

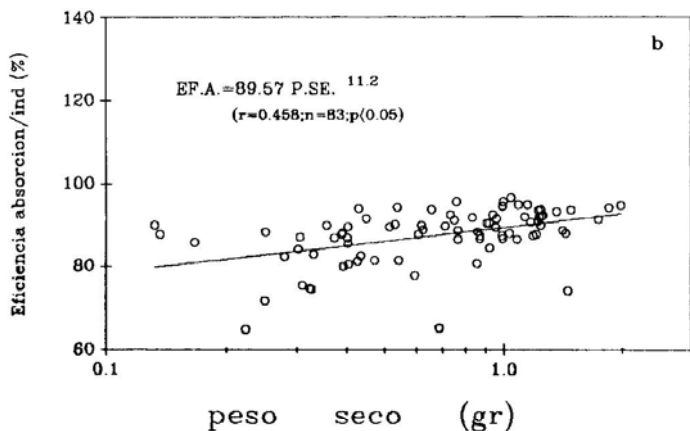


Fig. 2. *Tiostrea chilensis*. b) Eficiencia de absorción (%) en relación al tamaño corporal (P.S.E.) bajo condiciones de laboratorio. ($13^{\circ}C$, 23.5% y 15×10^6) cel T-Iso/l).

Al expresar todas las variables fisiológicas antes mencionadas en unidades de energía (joules), se estimó el potencial de crecimiento (P) (Fig. 4a). Esta relación indica que las ostras grandes fueron capaces de destinar mayor energía para crecimiento y reproducción en comparación con las mas pequeñas.

Dentro del potencial de creci-

miento las "ganancias de energía" representada por la eficiencia de absorción es la variable que determina en mayor grado dicho potencial debido a que las pérdidas de energía constituida por las tasas de respiración y excreción tienen una baja incidencia constituyendo un 6% y 0.8% de la energía ingerida respectivamente, lo cual es menor a lo reportado para la misma especie Winter *et al.*

(1984). De este modo, la eficiencia de absorción sería la variable que mejor explicaría la diferencia en tamaño encontrada para individuos de la misma edad. Los individuos más grandes han alcanzado

ese mayor tamaño debido a que son capaces de absorber con mayor eficiencia la energía ingerida en comparación a los individuos pequeños de la cohorte.

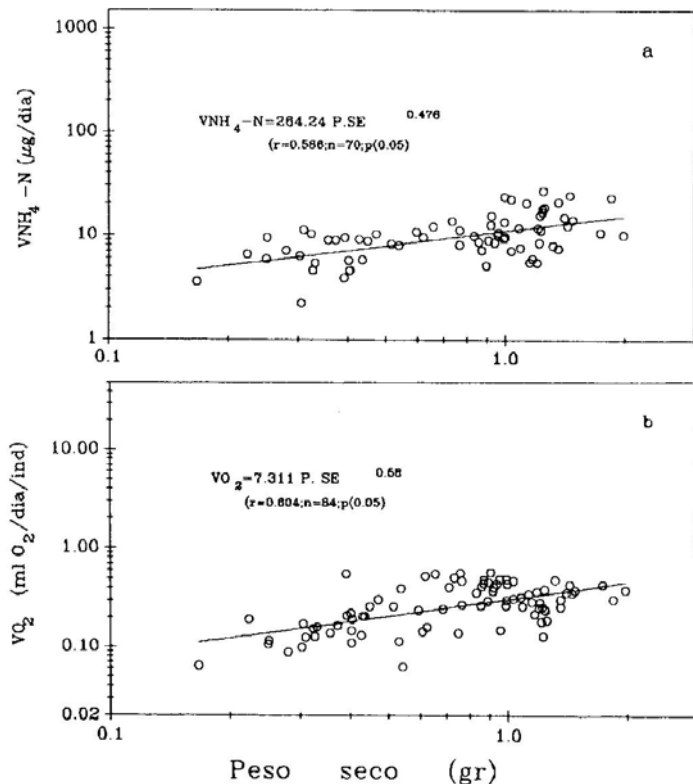


Fig. 3. *Tiostraea chilensis*. a) Tasa de excreción ($V \text{NH}_4\text{-N}$) medida en μg de Amonio-Nitrogeno excretado por día/individuo, en relación con el tamaño corporal (P.S.E.), medida a 13°C de temperatura. b) Tasa respiratoria (VO_2) medida en ml de O_2 consumidos por día/individuo en relación al tamaño corporal (P.S.E.), bajo condiciones de 13°C y 23.5‰ de salinidad.

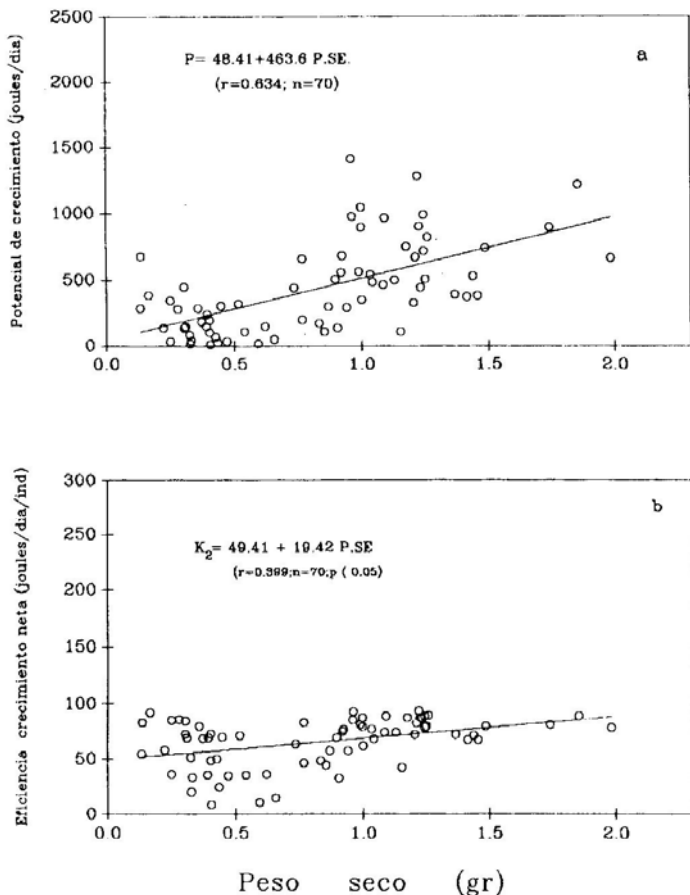


Fig. 4. *Tiostrea chilensis*. a) Potencial de crecimiento (P), que expresa la energía (joules) disponible para crecimiento y reproducción por día/individuo, en relación con el tamaño corporal (P.S.E.) bajo condiciones controladas de laboratorio. b) Eficiencia de crecimiento neto (K_2), que expresa la energía (joules) disponible para crecimiento por unidad de tiempo (día) como porcentaje del material orgánico absorbido, en relación al tamaño corporal expresado (P.S.E.).

En la Fig. 4b se observa que los individuos de mayor tamaño poseen una eficiencia de crecimiento neta (K_2) mayor, o sea, son más eficientes en la conversión del alimento en tejido corporal.

No se encontró una relación significativa entre tamaño corporal, expresado como peso seco de la carne y el número de loci heterocigotos por individuo (fig. 5) lo cual difiere de lo ampliamente reportado. En la tabla 2 se encuentra que similar tendencia fue encontrada al relacionar la tasa filtración estandarizada

($p > 0.05$) y la tasa respiratoria estandarizada con la heterocigosidad multi locus encontrándose un valor de b con tendencia positiva y una relación no significativa. Esto último difiere bastante de lo reportado por Koehn & Shunway (1982) para *C. virginica*. Sin embargo, las pendientes encontradas para las relaciones tasa de excreción, tasa de ingestión y tasa de absorción estandar versus heterocigosidad (tabla 2) son negativas ($p < 0.05$), lo que indica que los individuos más heterocigotos tendrían menores valores para estas tasas.

Tabla 2. *Tiostrea chilensis*. Regresiones del tamaño corporal (peso seco) y tasas fisiológicas estandarizadas sobre la heterocigosidad multi locus (H). $N = 71$; a es el intercepto y b es la pendiente de la ecuación de regresión. ** $p < 0.05$.

PARAMETRO	a	b	r	p
Peso seco carne (gr)	0,814	0,01	0,193	NS
Tasa Filtración (l/día)	3,657	0,306	0,554	NS
Tasa Ingestión (mg m. o./día)	42,74	-5,044	0,966	**
Tasa Absorción (mg m. o./día)	38,8	-4,696	0,976	**
Ef. Absorción (%)	89,703	-0,201	0,254	NS
Potencial crec. (joules/día)	549,026	-98,238	0,933	**
Ef. crec. neto	0,82	-0,103	0,914	**
GANANCIAS ENERG. (joules/día)	771,079	-102,567	0,974	**
PERDIDAS ENERG. (joules/día)	108,273	28,934	0,823	NS

Al expresar las tasas fisiológicas en términos de energía (fig. 6 y tabla 2) se observa que los individuos heterocigotos tienen menores valores de ganancias energéticas ($p < 0.05$) y una tendencia, aunque no significativa, a mayores valores de pérdidas ($VO_2 + VNH_4$) en comparación con los homocigotos. Esto indicaría que los individuos homocigotos de esta cohorte de ostras estarían haciendo

un mejor uso de la energía absorbida. Por lo mismo, las ostras homocigotas alcanzan valores más altos de potencial de crecimiento (P) y eficiencia neta de crecimiento (K_2) (fig. 7a y 7b). Sin embargo, no se puede afirmar a que tallas corresponden los individuos homocigotos o heterocigotos, debido a que no existe una relación significativa entre tamaño corporal y heterocigosidad.

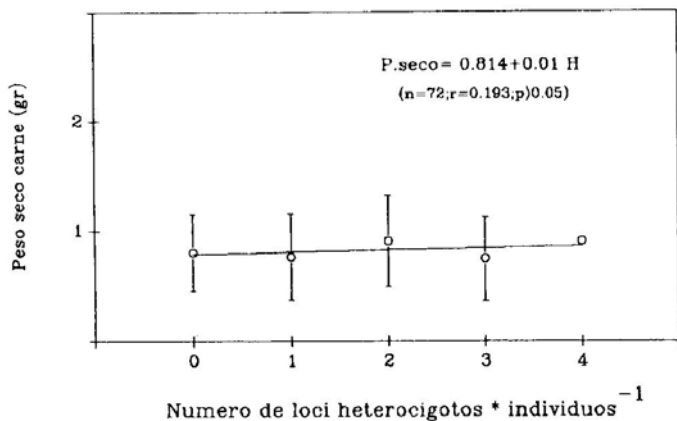


Fig. 5. *Tiostrea chilensis*. Tamaño corporal expresado como peso seco de la carne (g) en relación al número de loci heterocigotos (H).

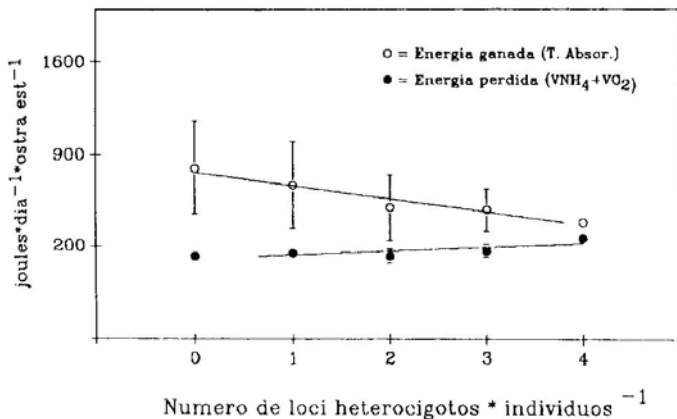


Fig. 6. *Tiostrea chilensis*. Uso de la energía en relación al número de loci heterocigotos. La energía ganada representa la tasa de absorción expresada en joules y la energía perdida la constituyen la suma de las energías gastadas en respiración y excreción.

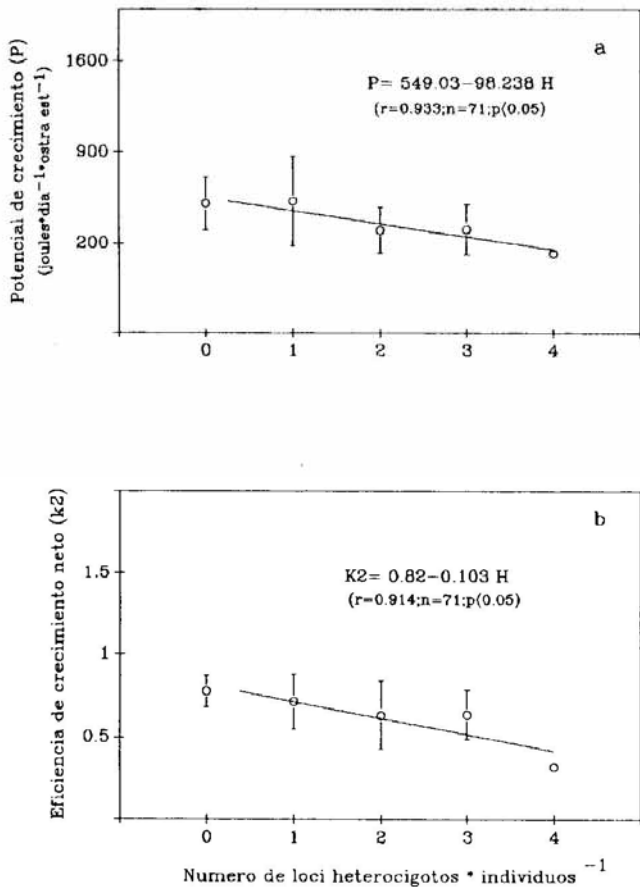


Fig. 7. *Tiostraea chilensis*. a) Potencial de crecimiento (P) en relación al número de loci heterocigotos (H) b) Eficiencia de crecimiento neta (K₂) en relación a los loci heterocigotos (H).

Por otro lado, si se consideran los resultados obtenidos para las tasas de excreción, ingestión, absorción, P y K₂, las cuales aumentan con el tamaño del individuo y por otra parte los resultados de estas mismas tasas estandarizadas en relación a la heterocigosidad, se podría deducir que los individuos más grandes, corresponden a los individuos homocigotos.

Estos resultados se sumarían a los varios reportes que no han encontrado una relación positiva entre heterocigosidad y crecimiento (Volckaert & Zouros, 1989; Gaffney & Scott, 1984 entre otros). Sin embargo, esta ausencia de relación puede deberse a la edad de los individuos experimentales. Mitton & Grant

(1984) mencionan que la correlación entre crecimiento y heterocigosidad puede perderse con la edad debido a que individuos adultos destinan gran parte de la energía disponible a reproducción (crecimiento gonadal), a diferencia de los estados juveniles que solo destina energía para crecimiento somático. Esta interpretación también es ofrecida por Rodhouse *et al.* (1986) al encontrar, con el incremento en edad, una disminución de la relación heterocigosidad y crecimiento y la subsecuente aparición de una correlación heterocigosidad/gónada en *Mytilus edulis*. Por lo tanto, datos sobre el comportamiento energético de individuos juveniles de la población estudiada, deberán ser obtenidos para reunir mayor evidencia que apoye la hipótesis anterior.

AGRADECIMIENTOS

Deseamos agradecer a todo el personal del laboratorio Quempillén, Ancud, y al Dr. Ricardo Galleguillos y técnicos que realizaron los análisis de electroforesis, en la Universidad Católica de la Santísima Concepción.

LITERATURA CITADA

- Adamkewicz, L., Taub, S.R. & J.R. Wall, 1984. Genetics of the clam *Mercenaria mercenaria*. II. Size and genotype. *Malacología*, 15: 833-846.
- Bayne, B.L. & C. Newell, 1983. The Mollusca. Physiological Energetics of Marine Molluscs: Vol. 4 Physiology Part 1. C. 9, 407-499. Karl M. Wilbur. Department of Zoology. Duke University, Durham, North Carolina. Academic Press.
- Beaumont, A.R., Beveridge, C.M. & M.D. Budd, 1983. Selection and heterozygosity within single families of the mussel, *Mytilus edulis* (L). *Marine Biology Letters*, 4: 151-161.
- Conover, R.J. 1966. Assimilation of organic matter by zooplankton. *Limnology and Oceanography*, 11: 338-354.
- Elliot, J.M. & W. Davison, 1975. Energy equivalents of oxygen consumption in animal energetics. *Oecologia* 19: 195-201.

- Falconer D.S. 1981. Introduction to Quantitative Genetics. Second edition. Longman Group Limited, San Francisco, 340 p.
- Foltz, D.W., Newkirk, G.F. & E. Zouros, 1983. Genetics of growth rate in the American oyster: Absence of interactions among the enzyme loci. *Aquaculture* 33: 157-165.
- Foltz, D.W. & M. Chatry. 1986. Genetic heterozygosity and growth rate in Louisiana oyster (*Crassostrea virginica*). *Aquaculture*, 57: 261-269.
- Gaffney, P.M. & T.M. Scott. 1984. Genetic heterozygosity and production traits in natural and hatchery population of bivalves. *Aquaculture*, 42: 289-302.
- Gentili M.R. & A.R. Beaumont. 1988. Environmental stress, heterozygosity, and growth rate in *Mytilus edulis* L. *Journal Experimental Marine Biology and Ecology*, 120: 145-153.
- Garton, D.W., Koehn, R.K. & T.M. Scott. 1984. Multiple-locus heterozygosity and the physiological energetics of growth in the coot clam, *Mulinia lateralis*, from a natural population. *Genetics*, 108: 445-455.
- Guiñez, R., Monsalve, A. & R. Galleguillos. 1986. Correlaciones genético-morfológicas en la ostra chilena, *Tiostrea chilensis* (Philippi, 1845) Chanley y Dinami, 1980, del banco Pullinque (Ancud, Chiloé). *Biología Pesquera*, 15: 17-25.
- Hawkins, A.J.S., Bayne, B.L. & A. J. Day. 1986. Protein turnover, physiological energetics and heterozygosity in the blue mussel, *Mytilus edulis*: the basis of variable age-specific growth. *Proc. R. Soc. London Ser. B*, 229: 161-176.
- Koehn, R.K. & S.E. Shumway. 1982. A genetic/physiological explanation for differential growth rate among individuals of the American oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Marine Biology Letters*, 3: 35-42.
- Koehn, R.K. & P.M. Gaffney. 1984. Genetic heterozygosity and growth rate in *Mytilus edulis*. *Marine Biology*, 82: 1-7.
- Koehn, R. K., W. Diehl, J. & T. M. Scott. 1988. The differential contribution by individual enzymes of glycolysis and protein catabolism to the relationship between heterozygosity and growth rate in the coot clam, *Mulinia lateralis*. *Genetics* 118: 121-130.
- Mitton, J.B. & M.C. Grant. 1984. Associations among protein heterozygosity, growth and developmental homeostasis. *Annual Review on Ecology and Systematics*, 15, 479-499.
- Navarro J.M. & J.E. Winter. 1982. Ingestion rate, assimilation efficiency and energy balance in *Mytilus chilensis* in relation to body size and different algal concentrations. *Marine Biology*, 67: 255-266.
- Ríos, C.F. 1979. Balance energético en poblaciones de *Galaxias maculatus* Jenyns (Salmoniformes: Galaxiidae). *Medio Ambiente*, 4: 24-39.
- Rodhouse, P.G. & P.M. Gaffney. 1984. Effect of heterozygosity on metabolism during starvation in the American oyster *Crassostrea virginica*. *Marine Biology*, 80: 179-187.
- Rodhouse, P.G., MacDonald, J.H., Newell, R.I.E. & R.K. Koehn. 1986. Gametic production, somatic growth and multiple-locus enzyme heterozygosity in *Mytilus edulis*, *Marine Biology*, 90:209-214.

- Singh, S.M. 1982. Enzyme heterozygosity associated with growth at different developmental stages in oyster. *Canadian Journal of Genetic and Cytology*, **24**:451-458.
- Singh, S.M. & R.H. Green. 1984. Excess of allozyme homozygosity in marine molluscs and its possible biological significance. *Malacologia*, **25**(2):569-581.
- Singh, S.M. & E. Zouros. 1978. Genetic variation associated with growth rate in the American oyster (*Crassostrea virginica*). *Evolution*, **32**:342-353.
- Solórzano, L. 1969. Determination of ammonia in natural waters by the phenol-hypochlorite method. *Limnology and Oceanography*, **14**:799-801.
- Thompson, R.J. & B.L. Bayne. 1974. Some relationship between growth, metabolism and food in the mussel *Mytilus edulis*. *Marine Biology*, **27**:317-326.
- Volckaert, F. & E. Zouros. 1989. Allozyme and physiological variation in the scallop *Placopecten magellanicus* and a general model for the effects of heterozygosity on fitness in marine molluscs. *Marine Biology*, **103**:51-61.
- Whyte, J.N.C. 1987. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in Mariculture of bivalves. *Aquaculture*, **60**:231-241.
- Winter, J.E., Acevedo, M.A. & J.M. Navarro. 1984. Quempillén estuary, an experimental oyster cultivation station in southern Chile. Energy balance in *Ostrea chilensis*. *Marine Ecology Progress Series*, **20**: 151-164.
- Zouros, E. & D.W. Foltz. 1984. Possible explanations of heterozygote deficiency in bivalve molluscs. *Malacologia*, **25**:583-591.