



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

CONTRIBUCIÓN A LA CARACTERIZACIÓN MOLECULAR,
CITOGENÉTICA, MORFOMÉTRICA Y BIOQUÍMICA DEL CAMARÓN
DE SALMUERA *ARTEMIA* DE CUBA Y SUR DE MÉXICO

TESIS

Para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, manejo y preservación de los recursos naturales

(Orientación Acuicultura)

Presenta

Rafael Antonio Tizol Correa

La Paz, B.C.S., mayo del 2006

COMITÉ TUTORIAL.

Co-director Dr. Alejandro M. Maeda Martínez
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-director Dr. Gopal Murugan
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-tutor Dra. Norma Hernández Saavedra
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-tutor Dra. Bertha Arredondo Vega
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-tutor Dr. Rafael Campos Ramos
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

COMITÉ REVISOR DE TESIS.

Dr. Alejandro M. Maeda Martínez
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Dr. Gopal Murugan
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Dra. Norma Hernández Saavedra
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Dra. Bertha Arredondo Vega
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Dr. Rafael Campos Ramos
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

JURADO EXAMEN DE GRADO.

Dr. Alejandro M. Maeda Martínez
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Dr. Gopal Murugan
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Dra. Norma Hernández Saavedra
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Dra. Bertha Arredondo Vega
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Dr. Rafael Campos Ramos
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Dr. Eduardo Balart Páez (suplente)
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

DEDICATORIA:

A la memoria de mi Madre que estaría muy feliz

A mi esposa e hijos por su apoyo permanente

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) de México por su apoyo financiero mediante la beca otorgada para la realización de este proyecto de doctorado. Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. por la oportunidad de realizar la investigación de tesis como parte del proyecto de investigación de CONACYT (C01-42335).

Al Centro de Investigaciones Pesqueras (CIP) y al Ministerio de la Industria Pesquera de Cuba y al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) de México por el soporte técnico y logístico al trabajo que hizo posible esta tesis.

A los integrantes del Comité Tutorial Dr. Alejandro M. Maeda Martínez, Dr. Gopal Murugan, Dra. Norma Hernández Saavedra, Dra. Bertha Arredondo Vega y Dr. Rafael Campos Ramos, por sus valiosas orientaciones y en particular a los Co-Directores de Tesis por su excelente ayuda técnica y por su apoyo personal.

A la M. en C. Laura Carreón por el apoyo y asesoría brindados en los trabajos en el laboratorio de cromatografía.

A la M. en C. Hortencia Obregón por el apoyo y colaboración brindados durante el proceso de ejecución de la presente tesis.

A la Dra. Laura Torrentera y a la M. en C. Teresita DNJ Maldonado-Montiel por proporcionar muestras de quistes de *Artemia* procedentes de los estados de Yucatán y Campeche respectivamente.

A la Dirección de Posgrado del CIBNOR y su personal por su cooperación.

A los amigos y compañeros del CIP y en particular de la Subdirección de Cultivos
Marinos por su apoyo y estímulo en todo momento.

ÍNDICE GENERAL

Lista de tablas.....	i
Lista de figuras.....	ii
Relación de anexos.....	iii
Resumen.....	iv
Abstract.....	v
CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Introducción.....	1
1.1.1 Sistemática de <i>Artemia</i>	1
1.1.2 Distribución geográfica de <i>Artemia</i>	4
1.1.3 Importancia de <i>Artemia</i> en la acuicultura.....	5
1.2 Antecedentes.....	9
1.3 Hipótesis.....	11
1.4 Objetivos generales.....	11
1.5 Objetivos específicos.....	11
CAPITULO 2: METODOLOGÍA.....	12
2.1 Poblaciones de estudio.....	12
2.1.1 Clasificación de las muestras.....	12
2.1.2 Características generales de las zonas de muestreo.....	13
2.2 Estudios moleculares.....	17
2.2.1 Decapsulación de quistes.....	17

2.2.2 Extracción y amplificación de ADN.....	17
2.2.3 Obtención de las secuencias parciales.....	19
2.2.4 Alineación de las secuencias.....	19
2.2.5 Análisis filogenético de las poblaciones.....	22
2.3 Estudios citogenéticos.....	24
2.3.1 Obtención de cromocentros.....	24
2.4 Estudios morfológicos.....	25
2.5 Determinación de la composición de ácidos grasos.....	27
2.5.1 Muestreo y conservación de quistes.....	27
2.5.2 Preparación del material para extracción de ácidos grasos.....	28
2.5.3 Aplicación de la técnica de transesterificación directa.....	28
2.5.4 Cromatografía de gases espectrometría de masas.....	28
2.5.5 Procesamiento de los cromatogramas.....	29
CAPITULO 3: RESULTADOS.....	31
3.1 Estudios moleculares.....	31
3.1.1 Características de las secuencias y alineación de los fragmentos de ADN mitocondrial 16S y citocromo oxidasa I.....	31
3.1.2 Distancias genéticas.....	37
3.1.3 Análisis filogenético.....	40
3.2 Estudios citogenéticos.....	45
3.3 Estudios morfológicos.....	51
3.4 Perfil de ácidos grasos.....	57

CAPITULO 4: DISCUSION.....	61
4.1 Estudios moleculares.....	61
4.2 Estudios citogenéticos.....	64
4.3 Estudios morfológicos.....	72
4.4 Perfil de ácidos grasos.....	75
4.5 Consideraciones generales.....	79
CAPITULO 5: CONCLUSIONES.....	81
CAPITULO 6: REFERENCIAS.....	83
ANEXOS.....	99
Anexo 1. Nombre sistemático, nombre abreviado y rango de concentración para 51 ácidos grasos identificados de quistes de <i>Artemia</i>	100
Anexo 2. Comunicación de aceptación de artículo en el Journal of Crustacean Biology.....	103
Anexo 3. Comunicación de artículo sometido al Journal of Biogeography.....	120

Lista de tablas

Tabla 1. Clasificación de las muestras y localidades de procedencia.

Tabla 2. Composición de la mezcla para PCR para cada fragmento (16S ARNr y COI) (en μL).

Tabla 3. Códigos de identificación, origen geográfico, tipo de hábitat y números de acceso del GenBank de las secuencias de los genes 16S ARNr y COI, de las especies utilizadas en este estudio.

Tabla 4. Números de acceso del GenBank asignados a los genes 16S ARNr y COI de las poblaciones de Cuba y el sur de México obtenidos en este estudio.

Tabla 5. Composición relativa de bases A,T,G,C (%), contenido de G+C y T+A, relación (T+A/G+C) y longitud de los fragmentos (número de bases) del gen mitocondrial 16S de poblaciones de *Artemia* de Cuba, el sur de México y de los grupos externos.

Tabla 6. Composición relativa de bases A,T,G,C (%), contenido de G+C y T+A, relación (T+A/G+C) y longitud de los fragmentos (número de bases) del gen mitocondrial COI de poblaciones de *Artemia* de Cuba, el sur de México y de los grupos externos.

Tabla 7. Sitios variables en el gen mitocondrial 16S ARNr en poblaciones de *Artemia* del sur de México y Cuba.

Tabla 8. Sitios variables en el gen mitocondrial COI en poblaciones de *Artemia* del sur de México y Cuba.

Tabla 9. Matriz de diferencias totales de nucleótidos (sobre la diagonal) y distancias genéticas (por debajo de la diagonal) para los fragmentos 16S + COI de poblaciones de *Artemia* de Cuba, sur de México y del grupo externo.

Tabla 10. Número promedio de cromocentros, desviación estándar (ds) y abreviaturas de referencia de las poblaciones de estudio y de poblaciones de América obtenidos por diferentes autores (en paréntesis abreviaturas utilizadas en el análisis discriminante) (*Valores de error estándar).

Tabla 11. Diámetro de quistes (enteros y decapsulados) y largo total de nauplios de las poblaciones de Cuba (\pm ds) y otras localidades de América (en μ m).

Tabla 12. Comparación de diferentes características morfológicas en adultos de *Artemia* (hembras y machos) de las salinas El Real (Camagüey) y Frank País (Guantánamo) ($P>0.05$).

Tabla 13. Valores morfométricos promedio de las poblaciones de Cuba y otras localidades de América (valores en mm., excepto sf que es un valor absoluto, (n) = ds).

Tabla 14. Concentraciones de ácidos grasos determinados en las poblaciones de Cuba, Mexico y Estados Unidos (μ g/mg dw). Los datos representan las medias \pm SD (n =3).

Letras diferentes indican diferencias significativas ($P<0.05$).

Tabla 15. Comparación de la proporciones (% del total) de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados obtenidos en este estudio y reportados diferentes autores.

Lista de figuras

Figura 1. Localidades de muestreo de Cuba y el sur de México. Cuba, Frank País, Guantánamo (CM) (1); El Real, Santa Lucía, Camagüey (CGA) (2). México: San Crisanto (YSC) (3), Xtampú (YX) (4), Chuburna (YC) (5), Celestún (YCE) (6), Yucatán; Real de Salinas, Campeche (CP) (7); La Colorada, Oaxaca (OX) (8).

Figura 2. Mediciones morfológicas en *Artemia*: diámetro ocular (doc), distancia entre los ojos (do), ancho de la cabeza (ac), longitud de la primera antena (la), longitud abdominal (lab), ancho abdominal (aa), longitud de la furca (lf), número de setas en la furca (sf), ancho del saco ovífero (aso) y largo total (lt).

Fig. 3. Filograma de consenso a partir de ADN mitocondrial (fragmentos combinados de 16S ARNr y CO I) con los parámetros de del modelo TIM+I+G para los análisis NJ, MP, ML y Mr. Bayes (los números en ese orden).

Figura 4. Secciones de cladogramas de las poblaciones de Cuba y México a partir de ADN (fragmentos combinados de 16S ARNr y COI) con los parámetros del modelo TIM+I+G para los análisis NJ, MP, ML y Mr. Bayes.

Figura 5. Cromocentros en células interfásicas de *Artemia* de Frank País, Caimanera (CM) (alrededor de 17 cromocentros) (40x – 2x) (a), y El Real, Camagüey (CGA) (> 20 cromocentros) (100x – 2x) (b).

Figura 6. Cromocentros en células interfásicas de *Artemia* de Campeche (CP) (alrededor de 10 cromocentros) (100x – 2x) (c) y Oaxaca (OX) (alrededor de 14 cromocentros) (100x – 2x) (d).

Figura 7. Cromocentros en células interfásicas de *Artemia* de San Crisanto (YSC) (alrededor de 14 cromocentros) (100x – 2x) (e) y Bahía de San Francisco (SFB) (EU) (*A. franciscana*, alrededor de 17 cromocentros) (100x – 2x) (f).

Figura 8. Cromocentros en células interfásicas de *Artemia* de Puerto Rico (PR2) (alrededor de 5 cromocentros) (100x – 2x) (g).

Figura 9. Análisis discriminante (distancias Euclidianas) entre el número promedio de cromocentros de poblaciones de *A. franciscana* y *A. persimilis* de diferentes localidades de América.

Figura 10. Análisis de cluster (distancias Euclidianas) entre diferentes poblaciones de América a partir de medidas morfométricas.

Relación de anexos

Anexo 1. Nombre sistemático, nombre abreviado y rango de concentración ($\mu\text{g}/\text{mg dw}$) de 51 ácidos grasos identificados en quistes decapsulados de *Artemia* de 8 localidades de clima tropical de Cuba, el sur de México y una de clima templado.

Anexo 2. Comunicación de aceptación de artículo “Fatty acid composition of *Artemia* (Branchiopoda: Anostraca) cysts from tropical salterns of southern México and Cuba”, en el Journal of Crustacean Biology.

Anexo 3. Comunicación de artículo sometido “Phylogenetic relationships of *Artemia* populations from tropical salterns of southern México and Cuba inferred from mitochondrial 16S rRNA and cytochrome oxidase I genes” al Journal of Biogeography.

Resumen

Poblaciones de *Artemia* de salinas tropicales de América Central y el Caribe, provenientes de ocho localidades de México [Celestún (YCE), San Crisanto (YSC), Xtampú (YX) y Chuburna (YC), en Yucatán, Laguna La Colorada en Oaxaca (OX) y Real de Salinas en Campeche (CP)] y dos sitios de Cuba [salina El Real, Camagüey (CM) y Frank País, Guantánamo (CGA)], fueron evaluadas para determinar su posición sistemática y relaciones filogenéticas. Para ello se utilizaron análisis moleculares (secuencias de los genes 16S ribosomal ARN (16S ARNr) y citocromo oxidasa I (COI)), citogenéticos (número de cromocentros) y morfológicos. Además, se evaluaron características nutricionales de las poblaciones mencionadas a partir de estudios de la composición de ácidos grasos de los quistes y aspectos biométricos de quistes, nauplios y adultos de las poblaciones de Cuba de interés para la acuicultura.

A partir del ADN total extraído de quistes decapsulados se amplificaron y secuenciaron los genes en estudio. Las secuencias se evaluaron usando los algoritmos de parsimonia máxima, máxima similitud, vecino más cercano, y análisis Bayesiano con el modelo TIM+I+G obtenido del Modeltest. En los análisis se incluyeron secuencias de los anostracos *Artemia franciscana*, *A. persimilis*, *A. sinica*, *Parartemia contracta*, *P. cylindifera*, *Thamnocephalus platyurus*, *Streptocephalus dorotheae*, *Artemiopsis stefanssoni*, *Eubranchipus* sp., *Polyartemiella hazeni* y *Branchinecta paludosa*. obtenidas del GenBank. Los análisis de vecino más cercano con evaluación de las distancias en máxima similitud, máxima parsimonia con búsqueda heurística, máxima similitud y el análisis Bayesiano indican que las poblaciones de *Artemia* forman un grupo monofilético (BS = 100%). Las

poblaciones de *Artemia* de Cuba junto con *A. franciscana* forman un grupo hermano (BS = 100%) con las poblaciones de *Artemia* de México.

Se reporta por primera vez la obtención de cromocentros a partir de quistes. Se evaluaron dos poblaciones de Cuba, tres poblaciones del sur de México [San Crisanto, Yucatán, (YSC), Lagunas La Colorada en Oaxaca (OX) y Real de Salinas en Campeche (CP)] y dos poblaciones de referencia: Puerto Rico y Estados Unidos. Se compararon las medias obtenidas con otras provenientes de la bibliografía pertenecientes a 19 poblaciones de *Artemia franciscana* y *A. persimilis* de diferentes localidades de América a través del análisis discriminante con relación completa y distancias euclidianas. Entre las poblaciones estudiadas, las de Cuba presentaron los mayores promedios en el número de cromocentros (CM, 17.4 ± 3.8 y CGA > 20). De las poblaciones de México, CP presentó el valor menor con un promedio de 10.13 ± 1.8 cromocentros mientras que OX y YSC mostraron promedios de 13.81 ± 1.5 y 14.09 ± 2.1 respectivamente. En la muestra de la Bahía de San Francisco (SFB) se observaron 17 ± 1.1 cromocentros como promedio, mientras que la de Puerto Rico (PR 2) se encontró una media de 5.1 ± 1.1 .

Se determinó el diámetro de quistes hidratados, decapsulados, el grosor promedio del corion así como el largo total de nauplios recién eclosionados de las dos poblaciones de Cuba. Se determinaron 10 parámetros morfométricos a 100 machos y 100 hembras adultas. Se compararon las medias con otras provenientes de la bibliografía pertenecientes a seis poblaciones de *A. franciscana* y *A. persimilis* de diferentes localidades de América a través del análisis discriminante con relación completa y distancias euclidianas. Los nauplios provenientes de las poblaciones de Cuba presentan un largo total entre 401 y 421 μm lo que

es un indicador positivo para su empleo en la acuicultura. En el análisis de la biometría de adultos se encontró que estas poblaciones presentan diferencias significativas en sus proporciones morfológicas, las cuales pueden estar dadas por las diferencias en las condiciones ambientales de las dos localidades.

A partir de los resultados moleculares, citogenéticos y morfológicos se concluye que las poblaciones de *Artemia* de Cuba y México, corresponden a la superspecie *A. franciscana*. Las diferencias moleculares, citogenéticas y morfológicas entre las poblaciones de México soportan el concepto, que las poblaciones del sur de México pueden representar especies diferentes.

De los 51 ácidos grasos identificados, los compuestos C16:0, C16:1 n5, C18:1 n9, C18:1 n7 y C18:2 n6 fueron presentaron la más alta concentración. La muestra SFB proveniente de un área templada mostró diferencias significativas con el resto de las muestras de zonas tropicales, con una alta concentración de los ácidos grasos 18:2 n5, 18:3 n3 y 18:4 n3. La cepa SFB presentó la menor proporción de ácidos grasos monoinsaturados. Basados en el perfil de ácidos grasos las cepas de *Artemia* estudiadas pueden ser clasificadas como del tipo de “agua dulce”, excepto la de Oaxaca que tiene un perfil de “tipo marino” caracterizado por un contenido del 3 al 4% del total de ácidos grasos de C20:5 n3.

Abstract

Geographically separated *Artemia* populations from tropical salterns of Central America and the Caribbean, four sites in the Yucatán Peninsula [Celestún (YCE), San Crisanto (YSC), Xtampú (YX), and Chuburna YC)], one site each in the states of Oaxaca (Laguna La Colorada) (OX) and Campeche (Real de Salinas) (CP), México, and two sites Camagüey (El Real) (CM) and Guantánamo (Frank País) (CGA) in Cuba, were examined to determine their phylogenetic relationships and systematic position, using molecular (sequences of the 16S ribosomal RNA (16S rRNA) and cytochrome oxidase I (COI) genes), cytogenetic (number of chromocenter) and morphologic analysis. Aspects like fatty acid profile and biometrics (cyst, nauplii and adults) that are interesting for aquaculture were also analyzed.

From the total DNA extracted from decapsulated cysts of *Artemia*, fragments of the mitochondrial genes 16S rRNA and cytochrome oxidase I were amplified and sequenced. These sequences were phylogenetically analysed using the Maximum Parsimony, Maximum Likelihood, Neighbour Joining, and Bayesian algorithms with the DNA evolution model obtained by Modeltest. Additional GenBank sequences of the anostracans *Artemia franciscana*, *A. persimilis*, *A. sinica*, *Parartemia contracta*, *P. cylindifera*, *Thamnocephalus platyurus*, *Streptocephalus dorotheae*, *Artemiopsis stefanssoni*, *Eubranchipus* sp., *Polyartemiella hazeni* and *Branchinecta paludosa* were included in the analyses. The Neighbour Joining analysis with distance measurement set to maximum likelihood, Maximum Parsimony analysis with heuristic search, Maximum likelihood analysis, and Bayesian inference analyses revealed the *Artemia* populations as a

monophyletic group (BS = 100%). However, *Artemia* populations from Cuba together with *A. franciscana* formed a sister group to Mexican *Artemia* (BS = 100%).

For cytogenetic analysis decapsulated cyst were used for two Cuban populations, three Mexican populations [San Crisanto, Yucatan (YSC), Laguna La Colorada, Oaxaca (OX) and Real de Salinas en Campeche (CP)] and one locality each from United States and Puerto Rico as reference. Average chromocenter numbers were compared with information from 19 populations of *Artemia franciscana* and *A. persimilis* using complete linkage and Euclidean distances. Cuban populations showed the highest average chromocenter number (CM, 17.4 ± 3.8 y $CGA > 20$), while values of 13.81 ± 1.5 and 14.09 ± 2.1 respectively were found for Mexican populations OX and YSC. CP presented lowest chromocenter number (10.13 ± 1.8). San Francisco Bay sample (SFB) had a mean number of chromocenters of 17 ± 1.1 while 5.1 ± 1.1 was found for the sample from Puerto Rico (PR 2).

Size of hydrated and decapsulated cyst, average corion width, nauplii size as well as morfometric measurements in male and females were determined for each populations. Results were compared with information from 6 populations of *Artemia* using complete linkage and Euclidean distances. Nauplii from Cuban populations had a small body size, between 401 and 421 μm which is suitable for aquaculture purposes.

It is possible to conclude from phylogenetic, cytogenetic and morphometric results that *Artemia* populations from Cuba and Mexico belong to the superspecies *A. franciscana*. Results also support the concept that Mexican populations might be of different species. Of 51 fatty acids identified from the fatty acid profile, C16:0, C16:1 n5, C18:1 n9, C18:1 n7 and C18:2 n6 were found in higher concentration. The SFB strain from a temperate area

showed significant differences with samples of tropical origin, having a greater concentration in the 18:2 n5, 18:3 n3 and 18:4 n3. The SFB strain showed the lowest proportion of mono-unsaturated fatty acids. Based on the fatty acid composition, the *Artemia* strains studied can be assessed as “freshwater” type, except for the one from Oaxaca that had a “marine” type profile characterized by 3% to 4% of the fatty acid C20:5 n3.

CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción

1.1.1 Sistemática de *Artemia*

El género *Artemia* (Crustacea: Branchiopoda: Anostraca) está conformado por un complejo de especies partenogenéticas y bisexuales (zigogenéticos) con una sistemática y taxonomía que aún no ha sido establecida completamente (Browne y Bowen, 1991). Estas formas diversas han sido influenciadas por procesos adaptativos a cuerpos de agua hipersalinos en zonas secas alrededor del mundo (Hontoria y Amat, 1992; Vanhaecke *et al.*, 1997; Triantaphyllidis *et al.*, 1998).

En la actualidad son reconocidas las formas partenogenéticas del Viejo Mundo (con diferentes niveles de ploidía) *A. partenogenetica* Bowen y Sterling, 1978 que son encontradas también en Asia y Australia y las bisexuales *Artemia salina* Linnaeus, 1758 (mar Mediterraneo), *A. urmiana* Gunther, 1899 (Irán), *A. sinica* Cai, 1989 (RP China), *Artemia* sp. Pilla y Beardmore, 1994, (Kazajastan) y *A. tibetiana* Abatzopoulos 1998 (Tibet) de Asia y Europa y *A. franciscana* Kellogg, 1906 (Norte, Centro y Suramérica), *A. monica* Verril, 1869 (Canadá) y *A. persimilis* Picinelli y Prosdocimi, 1968 (Argentina y Chile) (Gajardo *et al.*, 2002). Poblaciones del género *Artemia* han sido reportadas en más de 600 localidades costeras y de aguas interiores en todo el mundo (Triantaphyllidis y Sorgeloos, 1998; Van Stapen, 2002). Aunque se han realizado estudios morfológicos (Hontoria y Amat, 1992; Torrentera y Dodson 1995; Gajardo *et al.*, 1998), citogenéticos (Abreu-Grobois y Beardmore, 1989; Colihueque y Gajardo, 1996; Gajardo *et al.*, 2001; Torrentera y Abreu-Grobois, 2002) y moleculares (Camargo *et al.*, 2002; Bossier *et al.*,

2004; Gajardo *et al.*, 2004), más de la mitad de ellas están aún sin determinación sistemática y taxonómica.

Los estudios morfológicos, han sido utilizados desde hace más de dos siglos para establecer las diferencias entre especies, y constituyen la base de la actual clasificación taxonómica de los organismos vivos. La inclusión en los estudios taxonómicos de nuevos métodos (bioquímicos, citogenéticos y moleculares), ha perfeccionado este sistema, aunque los aspectos morfológicos siguen manteniendo una gran importancia en el desarrollo de estos trabajos. Por otra parte, las características biométricas de quistes, nauplios y adultos de *Artemia* son importantes para determinar la calidad de este producto para su empleo en la acuicultura (Sorgeloos *et al.*, 1986).

Los cromocentros son paquetes de heterocromatina que se observan en núcleos interfásicos de *Artemia* (Barigozzi *et al.*, 1987). Estos paquetes corresponden a elementos nucleares cortos del tipo *Alu* I, interdispersos en el genoma que transcriben ARN no funcional. Se piensa que el fragmento *Alu* se originó a partir de una transcripción en reversa accidental del gen 7SL ARN, el cual está involucrado en el movimiento de proteínas alrededor de la célula y que integró una copia del fragmento en el genoma, mediante el cual proliferó repetitivamente (Brown, 1999). En el caso de *Artemia franciscana* de Estados Unidos, *Alu* se encuentra en fragmentos de 113 bp repetidos en 6×10^5 copias por cada genoma haploide (Barigozzi *et al.*, 1987). Al observar cromosomas mitóticos en profase temprana, se reconocen acumulaciones heterocromáticas en forma de masas en ambas regiones teloméricas de la gran mayoría de los cromosomas (Barigozzi *et al.*, 1987), lo que da a lugar a que cuando la célula se encuentra en interfase, queden a la vista agregaciones cromáticas conspicuas, relativamente fácil de contar. De esta manera, el número de

cromocentros observados en esta especie, está correlacionado con la acumulación evolutiva de este ADN repetitivo (Barigozzi *et al.*, 1987). Cabe señalar que las poblaciones zigogénicas y partenogénicas del Viejo Mundo no presentan cromocentros, mientras que en las poblaciones del Nuevo Mundo su contenido es variable entre y dentro de las especies (Badaracco *et al.*, 1987), lo que hace una herramienta útil en el estudio de los mecanismos de la dinámica del genoma (Tarés *et al.*, 1993) y en particular para estudios de filogenia y especiación en *Artemia* (Abreu-Grobois y Beardmore, 1982; Colihueque y Gajardo, 1996; Gajardo *et al.*, 2001). La función del ADN repetitivo asociado con los cromocentros no está claramente establecida aunque se ha sugerido una relación en la organización estructural del núcleo (Gajardo, 2001). Algunos autores consideran que la heterocromatina es un elemento dinámico en la especiación (Barigozzi *et al.*, 1987) e incluso directamente adaptativo a ciertos tipos de hábitat y nichos ecológicos (White, 1978).

Una variedad de técnicas que usan las propiedades particulares del ADN han sido utilizadas para describir la diversidad del género *Artemia*: RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Badaracco *et al.*, 1995; Sun *et al.*, 1999; Camargo *et al.*, 2002), AFLP (Amplified Fragment Length polymorphism) (Triantaphyllidis *et al.*, 1997 a, b, c) digestión del ADN genómico con EcoRI y Alu I (Badaracco *et al.*, 1991) y análisis del 5S ARNr nuclear (Cruces *et al.*, 1989). La ocurrencia de genes específicos y la herencia materna que excluye la recombinación ha hecho del ADN mitocondrial un adecuado marcador genético (Avisé *et al.*, 1987).

La presente investigación de tesis se relaciona con los esfuerzos realizados por diferentes autores (Espinosa *et al.*, 1995; Navarro *et al.*, 1997; Gajardo *et al.*, 1998;

Camargo *et al.*, 2002; Campos-Ramos *et al.*, 2003), en la caracterización de poblaciones de *Artemia* de América y el Caribe, y complementa las investigaciones llevadas a cabo por el Programa Iberoamericano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología (CYTED) en su Programa II.2.: Localización, caracterización y evaluación del potencial extractivo de *Artemia*, para la acuicultura en Iberoamérica (1996 - 1999).

En el caso particular de Cuba y México, el proceso de desarrollo de la acuicultura ha sufrido los mismos problemas, pasando por la búsqueda de nuevas fuentes de quistes de *Artemia* a partir de organismos autóctonos o de inoculaciones. Esto hace necesario un ordenamiento, para conocer en primer lugar la situación actual de las especies presentes en cada país y sus características y potencialidades para un uso futuro racional y sustentable.

Los objetivos de este estudio tratan de la integración de aspectos moleculares, citogenéticos, morfológicos y bioquímicos de poblaciones de *Artemia* del sur de México y Cuba, para el establecimiento de su filogenia y con el fin de contribuir al uso racional de las fuentes de quistes de *Artemia* aún no explotadas.

1.1.2 Distribución geográfica de *Artemia*

En América se encuentran tres especies, todas de reproducción sexual, *A. persimilis*, *A. monica* y *A. franciscana*, cada una de ellas con una diferente distribución dentro del continente. *A. monica* se encuentra solamente en Mono Lake, en California, E.U.A. (Gajardo *et al.*, 2004), mientras que *A. persimilis* está restringida a zonas del cono sur (Chile y Argentina) (Gajardo *et al.*, 1995, 1998). Por su parte *A. franciscana*, considerada una superespecie (Browne y Bowen, 1991), es una entidad predominante en América y el Caribe (Mayer, 2000; Camargo, *et al.*, 2003; Gajardo *et al.*, 1998; Tizol *et al.*, 2006) y

constituye un complejo de poblaciones aisladas ecológicamente y fisiológicamente distintas, algunas de las cuales se encuentran reproductivamente aisladas en la naturaleza (Bowen *et al.*, 1985).

En los años 70, *Artemia* fue introducida en cinco salinas comerciales en Cuba, donde no se había reportado previamente esta especie (Gelabert y Solis, 1994). En la actualidad solo en dos de ellas es posible encontrar poblaciones estables de esta especie, "Frank País" (provincia de Guantánamo) y Santa Lucía (provincia de Camagüey) (Espinosa *et al.*, 1995). Estas poblaciones estaban consideradas como pertenecientes a la especie *A. franciscana* aunque hasta el momento no existe una caracterización conclusiva.

En México, se han reportado poblaciones de *Artemia* en al menos 29 localidades, distribuidas en 11 estados, sin embargo, 23 de ellas aún no han sido clasificadas hasta el nivel de especie (Maeda-Martínez *et al.*, 2002), aunque se han desarrollado estudios de diferenciación genética (Abreu-Grobois y Beardmore, 1989; Torrentera y Abreu-Grobois, 2002), variación isozimática (Abreu-Grobois y Beardmore, 1980; Correa-Sandoval y De la Rosa-Velez, 1996) y morfología (Correa y Bückle, 1993; Hontoria y Amat, 1992; Torrentera y Dodson, 1995).

1.1.3 Importancia de *Artemia* en la acuicultura

El cultivo exitoso de los estadios larvales de organismos acuáticos, es uno de los retos más importantes que ha tenido que enfrentar el desarrollo de la acuicultura a nivel comercial. Dentro de la larvicultura, uno de los problemas más difíciles, y que aún se encuentra sin solución, es el relacionado con la alimentación (Leger *et al.*, 1986). Existe un grupo importante de candidatos acorde a su aceptabilidad, digestibilidad y características

nutricionales más adecuadas para alimento de larvas, sin embargo, a una escala de acuicultura comercial la disponibilidad de ese alimento en las cantidades necesarias se vuelve un problema de primera magnitud. Solo un grupo limitado de organismos presentan, además de las propiedades nutricionales necesarias, la posibilidad de ser producidos con la misma calidad y en las cantidades que cubran las necesidades de un centro comercial de alevines de peces o postlarvas de camarón de forma repetitiva, convirtiéndose de esta forma en un criterio determinante del éxito.

Las propiedades del branquiópodo *Artemia*, de poseer un estadio de huevos con un desarrollo embrional en latencia que pueden ser eclosionados en el momento deseado, la disponibilidad de estos quistes durante todo el año en las cantidades necesarias, el tamaño adecuado de los nauplios para la boca de las larvas, así como sus características nutricionales, han hecho de éste un organismo hasta ahora insustituible como alimento larval. A partir de los resultados obtenidos por Seale (1933) en la alimentación de larvas de peces, se inició un proceso acelerado en la utilización de *Artemia* con fines del cultivo de organismos acuáticos. En la actualidad, la *Artemia* utilizada en diferentes estadios ha sido empleada con éxito como alimento de peces, crustáceos y moluscos como los cefalópodos, entre otros y en actividades tan variadas como la cría de animales de laboratorio, investigación, acuariofilia y acuicultura.

El Gran Lago Salado de Utah (Estados Unidos), es hasta el momento el principal suministrador de quistes para el mercado mundial. Sin embargo, la progresiva demanda de quistes a nivel mundial y la degradación ecológica de las principales fuentes de suministros, ha generado una fuerte dependencia del mercado, además de un notable incremento de los precios (Amat 1980), lo que unido a cosechas pobres del 1990 al 1996

(Lavens y Sorgeloos, 2000), han hecho que actualmente se exploren sitios alternativos en todo el mundo; especialmente en Asia continental varias localidades se encuentran en explotación.

La reanimación de las cosechas en el Gran Lago Salado desde inicios del milenio (9000 toneladas en la estación de 2000-2001) (Dhont y Sorgeloos, 2002), han aliviado temporalmente la necesidad de buscar sitios alternativos, no obstante, desde mediados de los años 90 otras especies que no son *A. franciscana*, han sido introducidas en el mercado mundial de quistes. Algunas de estas cepas, difieren marcadamente de las del Gran Lago Salado lo que afecta a los usuarios y suministradores. Estas diferencias se observan entre otras en las características de la diapausa, color del corion, biometría de quistes y nauplios, perfil de ácidos grasos, flotabilidad, requerimientos y comportamiento en la decapsulación, porcentaje y tasa de eclosión, separación del instar I en los tanques de eclosión y requerimientos para el enriquecimiento.

Adicionalmente, las especies conocidas y estudiadas de *Artemia* como *A. franciscana* de la Bahía de San Francisco (California, USA) y del Gran Lago Salado, así como la explotación de biotopos hipersalinos en áreas de Centro y Suramérica o la inoculación y cosecha en salinas con o sin *Artemia* autóctona, han contribuido también a la disponibilidad comercial de “nuevas” cepas de *A. franciscana* (Bossier *et al.*, 2004). Dada esta situación, el conocimiento y caracterización biológica de las cepas nacionales así como el esclarecimiento de su posición taxonómica, ha alcanzado particular importancia, teniendo en cuenta que algunas de ellas presentan cualidades especiales como tamaño del nauplio o un contenido particularmente interesante de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA por sus siglas en inglés).

Independientemente de su utilidad en diferentes cultivos, se ha comprobado que *Artemia* no siempre resulta adecuada en la alimentación de organismos, y su valor nutritivo se encuentra relacionado con determinadas condiciones geográficas y temporales en las que se desarrolla (Sorgeloos *et al.*, 1998). El porcentaje de proteínas y carbohidratos presente en los nauplios de diferentes cepas no difieren considerablemente (Leger *et al.*, 1986; Fernández-Reiriz *et al.*, 1991); las diferencias nutrimentales están dadas en primer lugar debido al contenido de ácidos grasos poliinsaturados presente y su variabilidad entre diferentes cepas (Leger *et al.*, 1986). Estas deficiencias han sido resueltas en parte, teniendo en cuenta la procedencia geográfica de las cepas y a partir de la aplicación de técnicas de enriquecimiento desarrolladas por Watanabe y colaboradores (1982 y 1983), aplicadas en la actualidad para la manipulación de las características nutricionales (Estévez y Kanazawa, 1996; McEvoy *et al.*, 1996; Tocher *et al.*, 1997; Gelabert, 2002) y como vector para llevar a los organismos depredadores determinadas sustancias, como hormonas, medicamentos y vitaminas entre otros (Chair *et al.*, 1996; Gapasin *et al.*, 1996). La composición de ácidos grasos de *Artemia*, es uno de los componentes más estudiados en esta especie, al observarse que se obtenían diferentes resultados en el cultivo de organismos acuícolas en función de la cepa de *Artemia* utilizada, particularmente relacionado con el contenido de estos componentes. Posteriormente, se encontró que los ácidos grasos C20:5 n3 y C22:6 n3 presentan una marcada relación con la supervivencia en la etapa larval de peces y otros organismos. En general, se plantea que un contenido de C20:5 n3 entre 3 y 4 % permite considerar a una cepa de *Artemia* como de buena calidad (Leger *et al.*, 1986). Watanabe y colaboradores (1978), a partir del estudio de perfiles de ácidos grasos de diferentes cepas de *Artemia*, obtuvieron diferencias significativas en el contenido de ácidos

grasos altamente insaturados del tipo n3 y propusieron una clasificación entre *Artemia* del tipo “marino” ricas en C20:5 n3, con excelentes resultados en el cultivo de peces de mar y del tipo de “agua dulce” con pobre contenido de este compuesto con bajas supervivencias en larvas de peces marinos. También se ha demostrado la importancia en el contenido de C22:6 n3 en el cultivo de la fase larval en peces y crustáceos, y aún más que el contenido individual de cada uno de estos ácidos grasos la presencia de un balance adecuado entre ellos (Gelabert, 2002; Camargo, 2002). Por otra parte, en los últimos años se ha demostrado que las deficiencias nutricionales en *Artemia*, pueden ser cubiertas a través de diferentes técnicas de bioencapsulación para lo cual existen actualmente numerosos productos en el mercado (Leger *et al.*, 1996; Gelabert, 2002). No obstante, es necesario conocer previamente el perfil de ácidos grasos de la cepa que estamos utilizando, para evaluar lo que es necesario aportar en dependencia de los requerimientos de la especie en cultivo.

1.2 Antecedentes

Los ensayos de inoculación de *Artemia* en Cuba, se realizaron desde finales de la década del 70, y hasta ese momento no se había realizado ningún reporte de la presencia poblaciones naturales de esa especie en el país; las inoculaciones se llevaron a cabo en 5 salinas (Gelabert y Solis, 1994). Actualmente sólo en la salina “Frank País” de Caimanera (provincia de Guantánamo) y Santa Lucia (provincia de Camagüey) se pueden encontrar poblaciones estables de este organismo; también se han observado poblaciones temporales en la salina “Bidos” en Matanzas (Espinosa *et al.*, 1995) pero estas no tienen perspectivas de explotación por sus pequeñas cantidades y su presencia estacional. Por otra parte,

aunque se considera que esta especie está relacionada con *A. franciscana* no existe un estudio definitivo en este sentido.

Cuba produce anualmente 400 000 ton de sal de mar por evaporación en 4 650 ha de salinas, repartidas en 12 unidades de producción (Menú, 1988), estas son potencialmente importantes para el desarrollo de producciones de *Artemia* a partir de la cepa existente en el país. La presencia de esta especie, al cabo de 23 años de su inoculación, nos indica la efectiva adaptación de ésta a las condiciones de Cuba y las potencialidades de su empleo en la acuicultura nacional, para esto se hace necesaria su caracterización para determinar si es adecuada o presenta limitaciones de algún tipo para este uso.

En la acuicultura mexicana el empleo de los recursos nacionales de *Artemia*, es pobre y generalmente se realiza a nivel local sin un conocimiento sobre sus características nutricionales y biométricas que permitirían un uso racional de la misma. En Cuba y México, el proceso de desarrollo de la acuicultura ha sufrido los mismos problemas, pasando por la búsqueda de nuevas fuentes de quistes de *Artemia* a partir de organismos autóctonos o de inoculaciones por lo que se hace necesario un ordenamiento, para conocer en primer lugar la situación actual de las especies presentes en cada país que pueden ser únicas en sus características y potencialidades.

1.3 Hipótesis

El camarón de salmuera *Artemia* de Cuba y el sur de México por sus características biológicas y filogenéticas está estrechamente relacionado con la especie *Artemia franciscana*.

1.4 Objetivo general

Determinar las características moleculares, citogenéticas, morfométricas y bioquímicas del camarón de salmuera *Artemia* de Cuba y el sur de México.

1.5 Objetivos específicos

Obtener las secuencias parciales de los genes 16S ARNr y citocromo oxidasa I, de las poblaciones de estudio, determinando la posición filogenética de las poblaciones.

Determinación del número promedio de cromocentros de las poblaciones de estudio y su relación con *A. franciscana*.

Realizar el análisis morfométrico de las poblaciones de estudio y su relación con *A. franciscana*.

Determinar el perfil de ácidos grasos de las poblaciones de estudio y su comparación con *A. franciscana*.

CAPITULO 2: METODOLOGÍA

2.1 Poblaciones de estudio

2.1.1 Clasificación de las muestras

Tabla 1. Clasificación de las muestras y localidades de procedencia.

País	Siglas	Localidad
Cuba	CGA	Salina el Real, Santa Lucia, Provincia de Camagüey
	CM	Salina Frank País, Caimanera, Provincia de Guantánamo
México	CP	Real de Salinas, Campeche
	OX	Laguna Las Coloradas, Oaxaca
	YC	Chuburna, Yucatán
	YCE	Celestún, Yucatán
	YX	Xtampú, Yucatán
	YSC	San Crisanto, Yucatán
Estados Unidos	SFB	Bahía de San Francisco, California

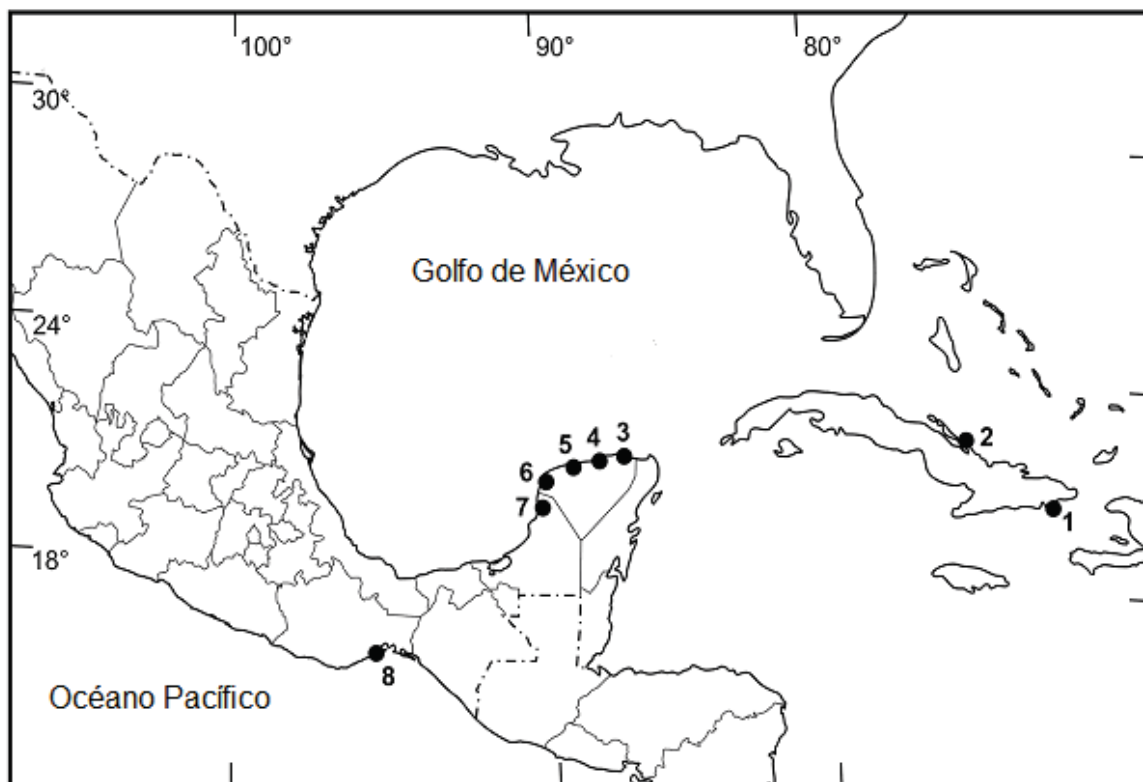


Figura 1. Localidades de muestreo de Cuba y el sur de México. Cuba, Frank País, Guantánamo (CM) (1); El Real, Santa Lucía, Camagüey (CGA) (2). México: San Crisanto (YSC) (3), Xtampú (YX) (4), Chuburna (YC) (5), Celestún (YCE) (6), Yucatán; Real de Salinas, Campeche (CP) (7); La Colorada, Oaxaca (OX) (8).

2.1.2 Características generales de las zonas de muestreo

CUBA

Provincia de Guantánamo

La salina comercial Frank País (CM), es un sistema hipersalino permanente de aproximadamente 772 ha en una costa de manglar, situada a los 21°23'N y 88°53'W. Esta es una zona semiárida con una media anual de precipitación de 450 mm (Fig. 1).

Provincia de Camagüey

La salina comercial El Real (CGA), está situada en el poblado de Santa Lucía en una costa de manglar. Por su régimen de lluvias constituye una salina estacional con una superficie de

814 ha, situada a los 20°52'N, 90°22'W. La precipitación anual media es de 1070 mm. En esta zona ocurren 2 periodos de seca, uno de diciembre a mayo y uno corto desde julio a mediados de septiembre. La temporada de lluvias ocurre en los meses de octubre y noviembre (Menú, 1988).

MÉXICO

Estado de Campeche

Real de Salinas (CP), es una salina comercial de 60 ha, situada en una costa de manglar ubicada a los 20°02'N, 90°14'W. El clima se caracteriza por un verano lluvioso y un invierno seco con un promedio de lluvias anual de 760 mm y una temperatura media de 26.4°C; el fitoplancton en la salina presenta a *Dunaliella* sp. como la especie dominante.

Estado de Oaxaca

La Colorada (OX), es una salina comercial, situada en una laguna costera hipersalina rodeada de manglares con una superficie de 132 ha. Su ubicación geográfica se encuentra a los 15°58'N y los 95°34'W. El clima en esta zona se caracteriza por un verano lluvioso y un invierno seco. El promedio de precipitaciones anuales es de 820 mm, mientras que la temperatura varía entre 12 y 42°C.; el fitoplancton de la salina tiene como especie predominante *Dunaliella* sp.

Estado de Yucatán

Los sitios de muestreo se localizan en la costa norte de la península, están definidos por lagunas hipersalinas alcalinas, salinas comerciales y temporales (Weidie, 1984; Lesser, 1974; Stringfield y Legrand, 1974). Estas áreas presentan rangos de salinidad que van desde la propia del agua de mar (35 psu) hasta 150 psu y mayores. El clima de la península de Yucatán está representado por tres estaciones; lluvias desde finales junio hasta octubre,

una temporada fría desde octubre a marzo y la estación seca de marzo a junio. El promedio anual de precipitaciones es de 1050 mm, mientras que la temperatura es de 26°C (Stringfield y Legrand, 1974; Lesser, 1974). El fitoplancton de la laguna presenta como especies dominantes a las microalgas *Dunaliella* sp., *Rhodomonas* sp., y bacterias sulfurosas halofíticas púrpuras y cianobacterias (Torrentera, datos no publicados).

Celestún (YCE), está conformado por estanques naturales temporales de poca profundidad, altamente alcalinos, situados a los 20°52'N, 90°22'W. Los estanques se secan totalmente durante la estación de seca y presentan los rangos mínimos y máximos de temperatura (20 a 37.5°C), salinidad (32 a 400 psu) y pH (6.5 a 9.5) observados en la región (Torrentera y Dodson, 2004).

Chuburna (YC), formado por grandes piscinas semipermanentes en una salina natural, está situada en un área costera estuarina, con una posición geográfica en los 21°15'N, 89°48'W. El sitio se caracteriza por una salinidad moderada y relativamente estable (45 a 151 psu) y presenta el menor valor medio de este parámetro en la región (94 psu) (Torrentera y Dodson, 2004).

San Crisanto (YSC), es un área experimental de cultivo de *Artemia* en una salina abandonada situada a los 21°20'N, 89°10'W. El clima es caliente y semiárido con una precipitación media anual de 540 mm, y un rango de temperaturas desde 15 a 33°C.

Xtampú (YX), esta conformado por estanques naturales temporales alcalinos de poca profundidad situados a los 21°23'N, 88°53'W. Los estanques se secan parcialmente durante la estación seca y alcanza los máximos valores medios de temperatura (32.2°C) y salinidad (224 psu), así como los más bajos promedios de pH (7.9) observados en esta región (Torrentera y Dodson, 2004).

ESTADOS UNIDOS DE NORTEAMERICA

Estado de California

Bahía de San Francisco (SFB), estanques de cultivo de *Artemia* comercial (*A. franciscana* Kellogg, 1906) (Argentemia, estanque No. 4, lote BP03051, San Francisco Bay National Wildlife Refuge) situado a los 37°28'N, 122°30'W. La precipitación media anual es de 530 mm (Tsai *et al.*, 2001), la temperatura oscila entre 6 y 29°C, la salinidad de 25 a 130 psu y el pH de 8 a 9 (Miles *et al.*, 2004).

2.2 Estudios moleculares

2.2.1 Decapsulación de quistes

A las muestras de quistes colocadas en placas de Petri, se le agregaron 5 mL de agua destilada para lograr una total recuperación de la forma esférica de los quistes a través de su hidratación por un periodo de 2 horas. Una vez hidratados, se extrajo la mitad del volumen de agua y se agregaron 5 mL de hipoclorito de sodio, durante 5 min, hasta alcanzar la total dilución del corion. Posteriormente, los quistes se lavaron con agua destilada y se colocó 1 quiste en cada vial (Eppendorf 1.7 mL) previamente rotulado para la extracción de ADN (ácido desoxiribonucleico).

2.2.2 Extracción y amplificación de ADN

El ADNt, fue aislado adicionando a cada muestra 65 µL de Chelex al 5%, manteniendo las muestras por 8 min a 100°C y centrifugadas por un pulso a 1500 g. Posteriormente, se adicionaron 0.8 µL de proteinasa K, se mezcló en vórtex y se incubó en baño de María 55°C por 30 min y seguidamente a 100°C por 4 min; finalmente se centrifugó por 3 min a 9300 g.

Los fragmentos de los genes mitocondriales 16S ARNr y COI, se amplificaron con el uso de los siguientes primers: 16S (16Sar (5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3') y 16Sbr (5'-ACGTGATCTGAGTTCAGACCGG-3') (Palumbi, 1996); Citocromo oxidasa I: 22F (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') (diseñado por el Dr. Gopal Murugan, CIBNOR) y HCO (5'-TGATTTTTTGGTCACCCTGAAGTTTA-3') (Folmer *et al.*, 1994). La composición de la mezcla para reacción en cadena de la polimerasa (PCR - por sus siglas en ingles) (50 µL) para cada fragmento se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Composición de la mezcla para PCR para cada fragmento (16S ARNr y COI) (en μL).

	16S ARNr	CO I
Agua destilada*	32.2	28.0
10 X PCR buffer*	5.0	5.0
DNTP*	0.6	0.8
Primer 3' 16Sar*	1.0 (100 pMol)	-
Primer 5' 16Sbr*	1.0 (100 pMol)	-
Primer 22F*	-	3.0 (20 pMol)
Primer HCO*	-	3.0 (20 pMol)
Taq DNA polimerasa*	0.2 (1 unidad de RTS)	0.2 (1 unidad de RTS)
Muestra de ADN	10.0 (40 a 60 ng de ADNt)	10.0 (40 a 60 ng de ADNt)
Volumen total para amplificación	50.0	50.0

*Componentes de la mezcla para PCR, volumen total 40.0 μL

Los ciclos de PCR aplicados para el gen 16S ARNr fueron los siguientes: desnaturalización preliminar del ADN a 95°C/ 5 min (1 ciclo); 40 ciclos de desnaturalización (94°C/ 30 s), alineación (50°C/ 30 s), extensión (72°C/ 1 min) y una extensión final (72°C/ 5 min) (Murugan *et al.*, 2002). Para el COI se aplicó el siguiente proceso: desnaturalización preliminar del ADN a 95°C/ 5 min; desnaturalización a 94°C/ 1 min; alineación a 45°C/ 1.5 min; extensión a 72°C/ 1.5 min (5 ciclos); desnaturalización a

94°C/ 30 min; alineación a 50°C/ 45 s; extensión a 72°C/ 1.25 min (35 ciclos) y finalmente una extensión a 72°C/ 10 min.

2.2.3 Obtención de las secuencias parciales

Los productos del PCR fueron verificados mediante electroforesis en agarosa-TAE al 1 % a 75 volts por 45 min y purificados usando el kit GFX PCR DNA (Amersham Biosciences) con columna MicroSpin preempacadas con una matriz de fibra (Marko *et al.*, 1982) o mediante el método tradicional con gel (Ausubel *et al.*, 1999). Una vez purificados los productos del ADN fueron verificados mediante electroforesis, cuantificados usando un biofotómetro Eppendorf y posteriormente secuenciados (75 ng de ADN/ μ L de muestra) en un ABI Genetic Analyzer (Laboratorio del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste) o 377 DNA Sequencer (Instituto de Biotecnología, Cuernavaca, México).

2.2.4 Alineación de las secuencias

Las secuencias obtenidas se evaluaron mediante el programa Chromas 1,45 (McCarthy, 1998), verificadas manualmente con el software ESEE (Eye Ball Sequence Editor) (Cabot, 1998) y alineadas automáticamente con Clustal X versión 1.8 (Thomson *et al.*, 1997). Finalmente fueron comprobadas manualmente con el programa GenDoc (Nicholas y Nicholas, 1997). Las secuencias de los fragmentos 16S ARNr y COI fueron combinadas formando un grupo de datos único.

Adicionalmente a las secuencias de estudio, se emplearon fragmentos de los genes 16S ARNr y COI obtenidos del GenBank correspondientes a los anostracos *A. franciscana*, *A. persimilis*, *A. sinica* (Artemiidae), *Parartemia contracta*, *P. cylindifera* (Parartemiidae), *Thamnocephalus platyurus* (Thamnocephalidae), *Streptocephalus dorothae* (Streptocephalidae), *Artemiopsis stefanssoni*, *Eubbranchipus* sp. (Chirocephalidae),

Polyartemiella hazeni (Polyartemiidae) y *Branchinecta paludosa* (Branchinectidae) (Tabla 3). Los fragmentos 16S ARNr y COI de las muestras de Cuba y México, junto con las secuencias de *A. franciscana* obtenidas del GenBank se emplearon para formar el grupo interno mientras que los genes de las regiones correspondientes del resto de las especies fueron utilizados para conformar del grupo externo.

Tabla 3. Códigos de identificación, origen geográfico, tipo de hábitat y números de acceso del GenBank de las secuencias de los genes 16S ARNr y COI, de las especies utilizadas en este estudio.

Especies	Origen geográfico	Condiciones ambientales	Gen	Número de acceso al GenBank	Referencias
<i>Branchinecta paludosa</i> (Bp)	Canadá	No reportado	COI 16S ARNr	AF209064 AF209055	Remigio y Hebert, 2000
<i>Polyartemiella hazeni</i> (Ph)	América del Norte	No reportado	COI 16S ARNr	AF209063 AF209054	Remigio y Hebert, 2000
<i>Eubranchipus sp</i> (Es)	Canadá	No reportado	COI 16S ARNr	AF209061 AF209052	Remigio y Hebert, 2000
<i>Artemiopsis stefanssoni</i> (As)	Canadá	No reportado	COI 16S ARNr	AF209062 AF209053	Remigio y Hebert, 2000
<i>Streptocephalus dorotheae</i> (Sd)	Triops, Florida	No reportado	COI 16S ARNr	AF209065 AF209056	Remigio y Hebert, 2000
<i>Thamnocephalus platyurus</i> (Tp)	Triops, Florida	No reportado	COI 16S ARNr	AF209066 AF209057	Remigio y Hebert, 2000
<i>Parartemia contracta</i> (Pcon)	Australia	No reportado	COI 16S ARNr	AF209059 AF209048	Remigio y Hebert, 2000
<i>Parartemia cylindifera</i> (Pcyl)	Australia	Lago Carmody	COI 16S ARNr	AF209050 AF308954	Remigio <i>et al.</i> , 2001 Remigio <i>et al.</i> , 2001
<i>Artemia persimilis</i> (Aper)	Argentina	No reportado	COI	DQ119647	Hou <i>et al.</i> , 2005 (no pub.)
	Argentina	La Pampa, Puelches	16S ARNr	AF202766	Bowen <i>et al.</i> , 2001 (no pub.)

Tabla 3. Continuación...

<i>Artemia sinica</i> (Asin)	China: Shanxi,	Lago Yuncheng	COI 16S ARNr	DQ119648 AF202754	Hou <i>et al.</i> , 2005 (no pub.) Bowen <i>et al.</i> , 2001 (no pub.)
<i>Artemia franciscana</i> (SFB)	Utah, Estados Unidos	Great Salt Lake	COI 16S ARNr	X69067 X69067	Pérez <i>et al.</i> , 1994 Pérez <i>et al.</i> , 1994
<i>Artemia</i> sp. (CM)	Frank País, Guantánamo, Cuba	Salina comercial Área costera de manglar	COI 16S ARNr	DQ401270 DQ401260	Este estudio
<i>Artemia</i> sp. (CGA)	El Real, Santa Lucia, Camagüey, Cuba	Salina comercial Área costera de manglar.	COI 16S ARNr	DQ401269 DQ401259	Este estudio
<i>Artemia</i> sp. (YX1)	Xtampú, Yucatán, México	Estanques hipersalinos naturales	COI 16S ARNr	DQ401276 DQ401266	Este estudio
<i>Artemia</i> sp. (YX2)	Xtampú, Yucatán, México	Estanques hipersalinos naturales	COI 16S ARNr	DQ401277 DQ401267	Este estudio
<i>Artemia</i> sp. (YCE)	Celestún, Yucatán, México	Estanques hipersalinos naturales	COI 16S ARNr	DQ401273 DQ401263	Este estudio
<i>Artemia</i> sp. (YSC1)	San Crisanto, Yucatán, México	Salina comercial abandonada	COI 16S ARNr	DQ401274 DQ401264	Este estudio
<i>Artemia</i> sp. (YSC2)	San Crisanto, Yucatán, México	Salina comercial abandonada	COI 16S ARNr	DQ401275 DQ401265	Este estudio
<i>Artemia</i> sp. (YC)	Chuburna, Yucatán, México	Estanques hipersalinos naturales	COI 16S ARNr	DQ401272 DQ401262	Este estudio
<i>Artemia</i> sp. (OX)	Laguna Las Coloradas, Oaxaca, México	Salina comercial	COI 16S ARNr	DQ401278 DQ401268	Este estudio
<i>Artemia</i> sp. (CP)	Real de Salinas, Campeche, México.	Salina comercial Área costera de manglar.	COI 16S ARNr	DQ401271 DQ401261	Este estudio

2.2.5 Análisis filogenético de las poblaciones

Para seleccionar el modelo substitutivo apropiado de la evolución del ADN mitocondrial se utilizó el Criterio Informativo de Akaike (AIC- por sus siglas en inglés) en el programa MODELTEST 3.6 (Posada y Crandall, 1998; Posada y Buckley, 2004). Las frecuencias de nucleótidos, los grados y tipos de sustitución, y los niveles de la relación transiciones–transversiones (Ti/Tv) se determinaron con el programa MEGA version 2.1 (Kumar *et al.*, 2001), mientras que para determinar las relaciones filogenéticas se emplearon los algoritmos Vecino más cercano (NJ por sus siglas en inglés), Máxima Parsimonia (MP por sus siglas en inglés) y Máxima Similitud (ML por sus siglas en inglés) en el programa PAUP 4.0b10 (Swofford, 2003) y MrBayes 2.01 (Huelsenbeck y Ronquist, 2001).

Las divergencias pareadas entre las secuencias, se evaluaron para el grupo de datos de los fragmentos 16S ARNr y COI combinados. Los valores de distancias y distancias absolutas se calcularon basados en la matriz de distancias de ML [PAUP 4.0b10 (Swofford, 2003)] con los parámetros más apropiados del modelo evolutivo del ADN (MrBayes 2.01 - Huelsenbeck y Ronquist, 2001).

Después de la selección del modelo substitutivo de evolución de ADN apropiado con los parámetros que mejor se ajustaban a nuestros datos, se llevó a cabo el análisis de ML en PAUP con una búsqueda heurística paso a paso, y rearrreglo limitado a 10000. Para establecer la confiabilidad de las ramas individuales de los árboles filogenéticos obtenidos mediante la búsqueda heurística con la adición de secuencias paso a paso, se llevó a cabo un análisis no paramétrico de bootstrap con 100 réplicas (Felsenstein, 1985).

El examen de la Evolución Mínima se realizó en PAUP con la aplicación del modelo substitutivo de ML al algoritmo NJ, para el análisis no paramétrico de bootstrap, se

emplearon 10000 réplicas para determinar la confiabilidad de las ramas individuales en los árboles filogenéticos.

El análisis de MP compensado se ejecutó con PAUP con los siguientes parámetros heurísticos: adición de taxas paso a paso, retención de múltiples árboles, re-arreglo limitado a 100000 con el tratamiento de los espacios como datos perdidos para poder comparar este análisis (MP) directamente con los resultados alcanzado en el de ML. Un análisis no-paramétrico de bootstrap con 1000 réplicas se empleó para determinar la confiabilidad de las ramas individuales en los árboles filogenéticos obtenidos en la búsqueda heurística con adición de secuencias paso a paso (Felsenstein, 1985).

Los parámetros para ML en MrBayes fueron determinados en MODELTEST. El análisis Bayesiano se llevó a cabo con el programa MrBayes versión 2.01 (Huelsenbeck y Ronquist, 2001) iniciando el proceso por un punto de inicio aleatorio. Cuatro cadenas se corrieron simultáneamente para 1000000 de generaciones con muestreos de árboles cada 100 generaciones para un total de 10000 árboles en la muestra inicial. Las variaciones en los resultados de ML en las muestras, fueron examinadas mediante inspección del logfile de MrBayes determinando las posiciones donde la curva del análisis alcanza un estadio de meseta. La porción antes de esa posición (número de árboles) que solo fluctúa sobre la meseta fue eliminada. La probabilidad posterior de la filogenia y sus ramas fue determinada para todos los árboles en la fase de meseta con los mejores resultados de ML. Los estimados Bayesianos de posteriores probabilidades y el análisis bootstrap, fueron incluidos para apoyar las determinaciones. Los árboles se evaluaron con el uso del programa TREEVIEW 1.6.6 (Page, 1996) y editados con Corel Draw 11.

2.3 Estudios citogenéticos

2.3.1 Obtención de cromocentros

A partir de los resultados negativos en la obtención de células interfásicas de nauplios para el análisis de cromocentros, se reporta por primera vez la obtención de cromocentros a partir de quistes. Para la preparación citológica se emplearon variaciones de los métodos de Barigozzi y Baratelli (1981) y Barigozzi *et al.* (1984) para el trabajo con quistes. Muestras de 150 µg de quistes fueron hidratados durante 2 h en agua de mar y decapsulados (metodología acápite 2.2.1) colocados en viales de 1.5 ml y sometidos a un choque hipotónico en agua destilada por 30 min. Finalmente, fueron fijados con dos cambios de metanol:ácido acético (3:1) y conservados a -20°C. Posteriormente el fijador se decantó y se agregó ácido acético al 50%. Los viales se introdujeron en agua caliente por periodos de 2 min y su contenido fue fraccionado con el pistilo repitiendo este procedimiento 3 veces, dejando sedimentar la muestra por 5 min después de concluido este proceso. Posteriormente, las células se gotearon en un portaobjetos precalentado aproximadamente a 50°C, a través del impacto de la gota y la inmediata absorción del fijador. Las laminillas fueron teñidas con una solución de orceina al 1% en solución de ácido acético al 45 % por 2 min, enjuagados con agua corriente y destilada y, posteriormente, secadas al aire. Los cromocentros fueron identificados con el uso de un microscopio Olympus BX41, equipado con cámara de fotografía digital Hitachi KP-D50 y el programa computacional para la captura de imágenes Image Pro plus 4.5.1. De cada población estudiada se observaron 100 células y se contó el número de cromocentros. Los mejores preparados fueron seleccionados, cuantificados y digitalizados.

Los datos de cromocentros se analizaron para determinar la media y el error típico para cada población. Posteriormente, se compararon las medias obtenidas con otras provenientes de la bibliografía pertenecientes a 19 poblaciones de *A. franciscana* y *A. persimilis* de diferentes localidades de América, a través del análisis discriminante con relación completa y distancias euclidianas (STATISTICA, versión 7).

2.4 Estudios morfológicos

Los quistes de las salinas de Cuba, se tomaron directamente de los estanques de las salinas y fueron mezclados con sal bruta para su traslado al laboratorio. Una vez en el laboratorio, se limpiaron mediante variaciones del gradiente de salinidad (Sorgeloos *et al.*, 1986) y posteriormente secados a 37°C en una estufa durante 24 h hasta alcanzar una humedad inferior al 8 %. Posteriormente fueron conservados en un recipiente a 2 a 4°C, hasta el momento del análisis.

Quistes de cada una de las poblaciones se hidrataron en agua destilada por 2 h. Una vez hidratados se midió el diámetro de 100 quistes de cada población con la ayuda de un microscopio biológico OLYMPUS BH2 (ocular 7X, objetivo 20X) equipado con un ocular micrómetro (1u = 5.5 µm). Una parte de estos quistes hidratados, se colocaron en una placa Petri se les extrajo el agua y se agregó 5 mL de hipoclorito de sodio durante 5 min hasta alcanzar la total dilución del corion, posteriormente se lavaron con agua destilada hasta eliminar toda traza de cloro, posteriormente fueron medidos con el mismo procedimiento aplicado a los quistes hidratados. De la misma forma fue determinado el largo total de 100 nauplios recién eclosionados (Instar I) desde el extremo de la cabeza hasta el extremo de la región post mandibular. Se determinó la media de los valores obtenidos de diámetro de

quistes enteros y decapsulados y el grosor promedio del corion a partir de la diferencia entre estos.

Los adultos de los estanques de la salina se colectaron con una malla plástica de 2 mm y fijados en una solución de formaldehído al 3%, y se conservaron a temperatura ambiente.

A 100 machos y 100 hembras adultas de cada población se les determinaron los siguientes parámetros: diámetro ocular (doc), distancia entre los ojos (do), ancho de la cabeza (ac), longitud de la primera antena (la), longitud abdominal (lab), ancho abdominal (aa), longitud de la furca (lf), número de setas en la furca (sf), ancho del saco ovígero (aso) y largo total (lt) (Fig. 2). Los animales para las mediciones se colocaron en una placa Petri con agua destilada y se empleó un microscopio biológico OLYMPUS BH2 (ocular 7X, objetivo 4X) equipado con un ocular micrómetro ($1u = 26.2 \mu\text{m}$).

Los datos correspondientes a cada población y sexo fueron procesados para hallar el valor promedio y la desviación estándar, así como la comprobación de la homogeneidad de varianza. Se realizó un análisis comparativo entre las medias de cada uno de los indicadores morfométricos de cada sexo, en las dos poblaciones, utilizando un análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) ($P < 0.05$).

Posteriormente, se compararon las medias obtenidas con otras provenientes de la bibliografía pertenecientes a 6 poblaciones de *A. franciscana* y *A. persimilis* de diferentes localidades de América a través del análisis discriminante con relación completa y distancias euclidianas (STATISTICA, versión 7).

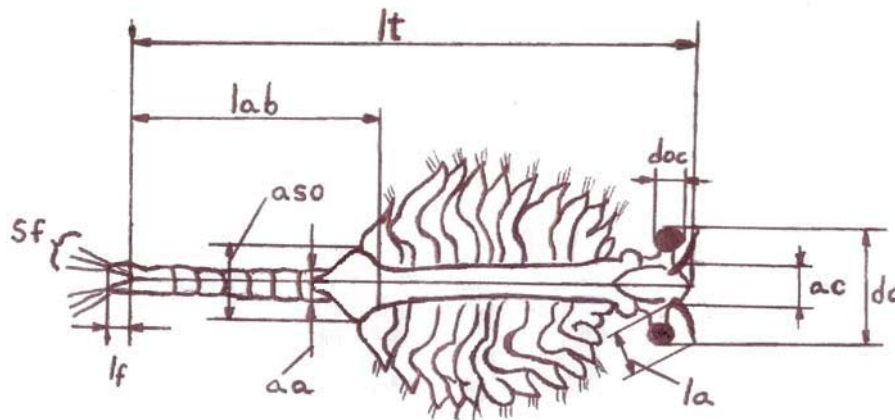


Figura 2. Mediciones morfológicas en *Artemia*: diámetro ocular (doc), distancia entre los ojos (do), ancho de la cabeza (ac), longitud de la primera antena (la), longitud abdominal (lab), ancho abdominal (aa), longitud de la furca (lf), número de setas en la furca (sf), ancho del saco ovífero (aso) y largo total (It).

2.5 Determinación de la composición de ácidos grasos

2.5.1 Muestreo y conservación de quistes

Las muestras de campo fueron separadas de las partículas gruesas utilizando una malla de nylon de 1000 μm y colectadas finalmente con una malla de 125 μm . Los quistes se colocaron en un contenedor cónico invertido con agua dulce durante 5 min, los quistes depositados en el fondo del recipiente se separaron y colocaron en un contenedor con salmuera (200 psu). Por último, se secaron en un horno a 35°C por 3 días y se almacenaron en frascos sellados y conservados a una temperatura entre 2 y 4°C hasta su análisis.

2.5.2 Preparación del material para extracción de ácidos grasos

Se tomaron por triplicado muestras de 50 mg de quistes los cuales fueron decapsulados mediante la metodología descrita en el acápite 2.2.1 y posteriormente liofilizados (Virtis, SL Gardiner NY).

2.5.3 Aplicación de la técnica de transesterificación directa

La extracción y la metanolisis de los ácidos grasos se llevo a cabo mediante transesterificación directa (Lepage y Roy, 1984, 1986; Barnung y Grahl-Nielsen, 1987).

Una solución metanol (500 μ L) con HCl (Supelco Bellefonte, PA) fue adicionada a las muestras (de 20 a 38 mg) y sonicados 3 veces durante 7 min. Las muestras en tubos de vidrio cerrados con tapas hermetizadas con cinta de teflón se calentaron 2 h a 90°C; el exceso de ácido clorhídrico fue eliminado mediante una corriente de nitrógeno.

Los residuos se disolvieron en 4 mL de hexano y 0.5 mL de agua destilada aplicándole vortex durante 1 min y posteriormente centrifugados a 1500 g durante 5 min a 10°C. La fase superior (hexano con ácidos grasos) fue separada agregándole 10 μ L de butilhidroxiltolueno (1%) para evitar la oxidación. Posteriormente las muestras fueron lavadas 3 veces y aplicándole vortex en cada una de ellas.

La fase inferior fue extraída y centrifugada a 1500 g durante 5 min a 10°C agregando varios gránulos de NaSO₄ para eliminar el exceso de agua; el líquido residual fue conservado a -20°C hasta su inyección en el cromatógrafo de gases espectrómetro de masas.

2.5.4 Cromatografía de gases espectrometría de masas

Las muestras se procesaron en un cromatógrafo de gases espectrómetro de masas GCD Plus System Hewlett Packard G1800B de inyección automática, acondicionada con una columna

capilar Omegawax 250 de 30 m de longitud, 25 mm de diámetro y 0.25 μm de fase líquida. La temperatura inicial de horno es 110°C. Después de un tiempo de retraso del solvente de (3.3 min), la rampa de temperatura fue incrementada a una tasa de 30°C/min hasta alcanzar 165°C donde permanece 2 min, incrementándose posteriormente a 14°C/min hasta alcanzar 220°C donde permanece 10 min. El gas de traslado fue helio de alta pureza a un flujo constante de 0.9 mL/min. Como resultado se obtuvieron cromatogramas con los tiempos de retención de cada compuesto y su relación con la abundancia relativa de los compuestos a través del área bajo los picos.

2.5.5 Procesamiento de los cromatogramas

Los cromatogramas obtenidos se procesaron con el programa GCD de Extra ChemStation, G1074B, Versión A.01.00, identificando cada uno de los ácidos grasos presentes a partir de las bibliotecas NBS75K y NIST98, así como una base de 30 estándares de ácidos grasos (PUFA-CIBNOR) incluidas en el programa; se valoró cada uno de los compuestos mediante su posición en el tiempo (tiempo de retención), el peso molecular y detección de iones característicos de cada compuesto en los cromatogramas.

Una vez identificados, los compuestos se relacionaron con los tiempos de retención y el reporte porcentual final de las áreas correspondientes a cada compuesto bajo los picos para el análisis cuantitativo. A partir del reporte de áreas por cada compuesto se calcularon la concentración ($\mu\text{g}/\text{mg}$) en peso seco, basados en la interpolación con una curva de calibración y el valor porcentual correspondiente de cada una de las réplicas. Estos valores porcentuales se transformaron (arcoseno de la raíz cuadrada del porcentaje dividido entre 100) para posibilitar la obtención de valores promedio de las 3 muestras y su desviación

estándar. Los datos compuestos por las medias de las 3 réplicas se evaluaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y el test de rango múltiple de Tukey's para detectar diferencias significativas entre las medias ($P \leq 0.05$).

CAPITULO 3: RESULTADOS

3.1 Estudios moleculares

3.1.1 Características de las secuencias y alineación de los fragmentos

Se obtuvieron secuencias parciales de los genes mitocondriales 16S ARNr y COI de ocho poblaciones de *Artemia* de Cuba y el sur de México, las cuales se encuentran depositadas en el GenBank (Tabla 4).

Tabla 4. Números de acceso del GenBank asignados a las secuencias parciales de los genes 16S ARNr y COI de las poblaciones de Cuba y el sur de México de este estudio.

Poblaciones	16S ARNr	COI
CGA	DQ401259	DQ401269
CM	DQ401260	DQ401270
CP	DQ401261	DQ401271
OX	DQ401268	DQ401278
YC	DQ401262	DQ401272
YCE	DQ401263	DQ401273
YSC1	DQ401264	DQ401274
YSC2	DQ401265	DQ401275
YX1	DQ401266	DQ401276
YX2	DQ401267	DQ401277

La longitud del fragmento 16S ARNr fue de 483 pb mientras que para el COI fue de 656 pb. En la Tabla 5 se muestra que en todas las secuencias se encuentran mayores valores en las bases A y T para ambos genes en comparación con las bases G y C. Para el 16S

ARNr la frecuencia de A (30.4% – 30.6%) fueron mayores que la de T (28.4% – 29.2%), mientras que para el COI se identificó un comportamiento inverso con rangos de 35.7% a 36.1% para T y del 22.6% a 22.9% para A.

El contenido de la suma de las bases G+C en los fragmentos del 16S ARNr presentó una variación entre 40.4% (población OX) y 41% (poblaciones CGA y CM), mientras que para el COI los valores se encuentran entre el 41% (poblaciones OX, YC y YSC2) y 41.8% (poblaciones CGA y CM). En ambos genes el contenido de la suma de las bases T+A presenta una variación del 0.6% y es mayor que el de G+C.

Las secuencias del GenBank del fragmento 16S ARNr de las especies *A. franciscana*, *A. persimilis* y *A. sinica* presentan mayores valores de A que de T mientras que para el COI se encuentran de forma inversa. Sin embargo la suma de T+A fue mayor en ambos casos que G+C con rangos entre 58.4% y 60.6% para 16S ARNr y desde 59% hasta 60.1% para COI. La relaciones T+A/G+C fueron de 1.43, 1.53 y 1.54 respectivamente para el fragmento 16S ARNr y 1.44, 1.40 y 1.51 para COI (Tabla 5 y 6).

Tabla 5. Composición relativa de bases A,T,G,C (%), contenido de G+C y T+A, relación (T+A/G+C) y longitud de los fragmentos (número de bases) del gen mitocondrial 16S ARNr de poblaciones de *Artemia* de Cuba, el sur de México y de los grupos externos.

Gen	Origen	Población	No. de bases	T	C	A	G	G+C	T+A	T+A/G+C
16S	Grupo	Bp	483	32.5	15.5	30.8	21.1	36.6	63.3	1.73
ARNr	Externo	Ph	480	35.8	15.2	29.0	20.0	35.2	64.8	1.84
		Es	480	34.2	14.8	28.5	22.5	37.3	62.7	1.68
		As	482	30.1	19.1	27.8	23.0	42.1	57.9	1.38
		Sd	482	35.5	15.8	28.0	20.7	36.5	63.5	1.74
		Tp	483	34.6	13.9	30.0	21.5	35.4	64.6	1.82
		Pcon	481	27.9	20.4	27.0	24.7	45.1	54.9	1.22
		Pcyl	480	27.3	21.0	27.7	24.0	45	55	1.22
		Asin	429	28.2	17.5	32.4	21.9	39.4	60.6	1.54
		Aper	427	28.3	16.6	32.1	23.0	39.6	60.4	1.53
		SFB	485	28.5	17.5	30.3	23.7	41.2	58.8	1.43
	Poblaciones de Cuba	CGA	483	28.4	17.4	30.6	23.6	41	59	1.44
		CM	483	28.4	17.4	30.6	23.6	41	59	1.44
	Poblaciones de México	CP	483	29.0	16.8	30.4	23.8	40.6	59.4	1.46
		OX	483	28.8	17.0	30.4	23.8	40.8	59.2	1.45
		YC	483	28.8	17.0	30.4	23.8	40.8	59.2	1.45
		YCE	483	29.2	16.6	30.4	23.8	40.4	59.6	1.48
		YSC1	483	29.0	16.8	30.4	23.8	40.6	59.4	1.46
		YSC2	483	29.0	17.0	30.4	23.6	40.6	59.4	1.46
		YX1	483	28.8	17.0	30.4	23.8	40.8	59.2	1.45
		YX2	483	28.8	17.0	30.4	23.8	40.8	59.2	1.45

Tabla 6. Composición relativa de bases A,T,G,C (%), contenido de G+C y T+A, relación (T+A/G+C) y longitud de los fragmentos (número de bases) del gen mitocondrial COI de poblaciones de *Artemia* de Cuba, el sur de México y de los grupos externos.

Gen	Origen	Población	No. de bases	T	C	A	G	G+C	T+A	T+A/G+C
COI	Grupo externo	Bp	656	33.2	23.3	23.3	20.1	43.4	56.5	1.30
		Ph	656	37.8	20.1	25.8	16.3	36.4	63.6	1.75
		Es	656	37.0	19.1	26.8	17.1	36.2	63.8	1.76
		As	656	32.2	22.7	24.7	20.4	43.1	56.9	1.32
		Sd	656	34.8	22.9	23.2	19.2	42.1	58	1.38
		Tp	656	39.5	18.4	23.2	18.9	37.3	62.7	1.68
		Pcon	656	31.7	25.2	20.9	22.3	47.5	52.6	1.11
		Pcyl	656	31.7	25.8	20.7	21.8	47.6	52.4	1.10
		Asin	656	36.0	22.1	24.1	17.8	39.9	60.1	1.51
		Aper	656	36.6	21.8	21.8	19.8	41.6	58.4	1.40
	SFB	656	35.8	21.8	23.2	19.2	41	59	1.44	
	Poblaciones de Cuba y Poblaciones de México	CGA	656	35.7	22.0	22.6	19.8	41.8	58.3	1.39
		CM	656	35.7	22.0	22.6	19.8	41.8	58.3	1.39
		CP	656	36.0	21.6	22.9	19.5	41.1	58.9	1.43
		OX	656	36.1	21.5	22.9	19.5	41	59	1.44
		YC	656	36.1	21.5	22.9	19.5	41	59	1.44
		YCE	656	36.0	21.6	22.9	19.5	41.1	58.9	1.43
		YSC1	656	36.1	21.5	22.7	19.7	41.2	58.8	1.43
		YSC2	656	36.1	21.5	22.9	19.5	41	59	1.44
		YX1	656	36.0	21.6	22.7	19.7	41.3	58.7	1.42
YX2		656	36.0	21.6	22.9	19.5	41.1	58.9	1.43	

El fragmento 16S ARNr del grupo interno de *Artemia* (poblaciones de Cuba y México más *A. franciscana*) y el grupo externo presentaron 232 sitios variables (48%) de los cuales 169 son informativos (73%) (no mostrados en tablas). Las poblaciones de Cuba y de México contienen 9 sitios variables (1.9%), de los cuales 5 son informativos (1%) (que poseen al menos 2 estados para los que se cumple que cada uno es compartido por al menos 2 de los taxa en estudio) (Tabla 7).

Tabla 7. Sitios variables en el gen mitocondrial 16S ARNr en poblaciones de *Artemia* del sur de México y Cuba (* sitios informativos).

Población	Posición de las bases								
	152	227*	252*	254*	275	297	360*	324	432*
CP	T	C	T	T	G	C	G	T	T
YCE
YSC1	C	T	.	.	.
YSC2	C	.	.	.	T	T	.	.	.
OX	C
YX1	C
YX2	C	.
YC	C
CGA	C	T	A	C	.	.	C	.	C
CM	C	T	A	C	.	.	C	.	C

Por otra parte, para el fragmento de COI se encontraron 271 sitios variables (41%) de los cuales 240 fueron informativos (88%). Las poblaciones de *Artemia* de Cuba y México incluyeron 25 sitios variables (3.8%) de los cuales 22 son informativos (3.5%) (Tabla 8).

Las transiciones (Ts) predominaron sobre las transversiones (Tv) para el fragmento 16S ARNr (relación Ts/Tv = 4), mientras que el COI no presentó transversiones. La transición C-T fue la más común en al 16S ARNr (80%), mientras que para el COI la

presencia de la transición A-G (52%) fue relativamente mayor que la C-T (48%). Para los fragmentos 16S ARNr y COI se observó que la mayoría de las transiciones ocurren entre las poblaciones de Cuba y México con valores de 56% y 87% respectivamente.

Tabla 8. Sitios variables en el gen mitocondrial COI en poblaciones de *Artemia* del sur de México y Cuba (* sitios informativos).

	CP	YCE	YSC1	YSC2	OX	YX1	YX2	YC	CGA	CM
29*	G	A	A
38*	T	C	C
68*	A	G	G
167*	G	A	A
182*	G	A	A
195*	T	C	C
212*	A	G	G
236*	T	C	C
239*	A	G	G
266*	C	T	T
275	C	.	T	T	T	.	.	T	.	.
317	A	G
338*	C	T	T
362*	T	C	C
437*	G	A	A
470*	T	C	C
476*	A	G	G
492	A	.	G
515*	G	A	A
528*	A	G	G
540*	C	T	T
542*	A	G	G
572*	C	T	T
620*	A	G	G
638*	T	C	C

3.1.2 Distancias genéticas

Con el empleo de los parámetros correspondientes al modelo TIM con la corrección de gamma para la variación entre sitios y la corrección para sitios variables significativos (TIM+G+I) para ML y el cálculo de las distancias, se obtuvo la variación de los nucleótidos y la comparación pareada de las secuencias para la combinación de ambos genes (Tabla 9). Dentro del grupo integrado por las poblaciones de *Artemia* se observa la formación de 2 grupos bien definidos, el primero contiene todas las poblaciones de *Artemia* de México mientras que el segundo está formado por las poblaciones de Cuba más *A. franciscana*. No se observaron diferencias entre las 2 poblaciones de Cuba, pero cada una difiere de *A. franciscana* en 7 pb (distancia ML de 0.0061). Dentro de las poblaciones mexicanas las diferencias se encuentran entre 0 y 5 pb (0.0000 y 0.0043), y entre 23 y 28 pb (0.0212 y 0.0263) cuando son comparadas con las poblaciones cubanas y *A. franciscana*.

Las poblaciones de Cuba y México mostraron diferencias entre 147 y 152 pb (0.2638 y 0.2793) al ser comparadas con *A. sinica* mientras que con *A. persimilis* las diferencias fueron desde 186 a 190 pb (0.4370 y 0.4512). En el caso de *Parartemia contracta* y *P. cylindifera* los valores alcanzaron entre 227 y 252 pb (0.7102 y 0.8104), mientras que para el resto de los anostracos los valores presentaron un rango entre 217 y 268 pb (distancia ML: 0.6526-1.2049) (Tabla 9).

Tabla 9. Matriz de diferencias totales de nucleótidos (sobre la diagonal) y distancias genéticas (por debajo de la diagonal) para los fragmentos 16S + COI de poblaciones de *Artemia* de Cuba, sur de México y el grupo externo.

	Bp	Ph	Es	As	Sd	Tp	Pcon	Pcyl
Bp		229	227	242	236	237	263	264
Ph	0.6944		167	194	237	226	272	287
Es	0.6839	0.3737		168	229	223	268	280
As	0.7086	0.4950	0.3438		254	254	261	273
Sd	0.8200	0.7794	0.7489	0.8976		194	249	239
Tp	0.7157	0.6824	0.7241	0.8947	0.4741		239	255
Pcon	1.1608	1.1799	1.2049	1.0610	0.8306	0.7900		169
Pcyl	1.2054	1.2919	1.3480	1.1026	0.7821	0.9377	0.3086	
Asin	0.8147	0.8619	0.8137	0.9396	0.6597	0.7148	0.8401	0.7689
Aper	0.8386	0.9039	0.8161	0.9253	0.6237	0.6640	0.8550	0.7881
SFB	0.7971	0.9503	0.8062	0.9808	0.7571	0.6804	0.7139	0.8046
CGA	0.8026	0.9762	0.8234	1.0020	0.7675	0.6923	0.7070	0.8104
CM	0.8026	0.9762	0.8234	1.0020	0.7675	0.6923	0.7070	0.8104
CP	0.8116	0.9276	0.8023	1.0012	0.7285	0.6627	0.7193	0.7632
OX	0.8116	0.9276	0.8046	1.0039	0.7206	0.6627	0.7193	0.7654
YC	0.8116	0.9276	0.8046	1.0039	0.7206	0.6627	0.7193	0.7654
YCE	0.8077	0.9292	0.8023	1.0064	0.7248	0.6612	0.7155	0.7594
YSC1	0.8131	0.9355	0.8102	1.0156	0.7219	0.6660	0.7102	0.7561
YSC2	0.8051	0.9196	0.7980	0.9954	0.7099	0.6526	0.7308	0.7774
YX1	0.8059	0.9343	0.8119	1.0122	0.7293	0.6612	0.7124	0.7614
YX2	0.8133	0.9294	0.8040	1.0030	0.7301	0.6663	0.7230	0.7670

Tabla 9. Continuación...

	Asin	Aper	SFB	CGA	CM	CP	OX	YC
Bp	221	224	240	241	241	244	244	244
Ph	234	242	257	261	261	252	252	252
Es	223	221	242	245	245	240	241	241
As	241	231	263	266	266	266	267	267
Sd	210	206	238	240	240	233	231	231
Tp	220	217	224	226	226	218	218	218
Pcon	236	241	229	228	228	229	229	229
Pcyl	232	226	251	252	252	243	244	244
Asin		159	144	147	147	152	150	150
Aper	0.3289		187	186	186	188	188	188
SFB	0.2560	0.4370		7	7	23	23	23
CGA	0.2638	0.4370	0.0061		0	26	26	26
CM	0.2638	0.4370	0.0061	0.0000		26	26	26
CP	0.2793	0.4444	0.0212	0.0242	0.0242		2	2
OX	0.2748	0.4444	0.0212	0.0242	0.0242	0.0017		0
YC	0.2748	0.4444	0.0212	0.0242	0.0242	0.0017	0.0000	
YCE	0.2803	0.4475	0.0221	0.0252	0.0252	0.0009	0.0026	0.0026
YSC1	0.2785	0.4512	0.0232	0.0263	0.0263	0.0035	0.0017	0.0017
YSC2	0.2760	0.4518	0.0223	0.0254	0.0254	0.0026	0.0009	0.0009
YX1	0.2761	0.4461	0.0212	0.0243	0.0243	0.0017	0.0017	0.0017
YX2	0.2815	0.4456	0.0221	0.0252	0.0252	0.0009	0.0026	0.0026

Tabla 9. Continuación...

	YCE	YSC1	YSC2	YX1	YX2
Bp	243	244	244	243	244
Ph	252	253	252	253	252
Es	240	242	241	242	240
As	267	269	267	268	266
Sd	232	231	230	233	233
Tp	218	219	217	218	219
Pcon	228	227	230	228	230
Pcyl	242	242	245	243	244
Asin	152	151	150	151	153
Aper	189	190	189	189	188
SFB	24	25	24	23	24
CGA	27	28	27	26	27
CM	27	28	27	26	27
CP	1	4	3	2	1
OX	3	2	1	2	3
YC	3	2	1	2	3
YCE		3	4	3	2
YSC1	0.0026		3	4	5
YSC2	0.0035	0.0026		3	4
YX1	0.0026	0.0035	0.0026		3
YX2	0.0017	0.0043	0.0035	0.0026	

3.1.2 Análisis filogenético

La alineación de los grupos internos y externos para ambos genes (16S ARNr+COI), presentó 1180 posiciones. Los taxa de Cuba y México mostraron 34 sitios variables de los cuales 28 fueron filogenéticamente informativos. Se encontraron 10 haplotipos para la

combinación de los fragmentos 16S ARNr y COI, mientras que 8 y 5 haplotipos (respectivamente) se encontraron cuando se analizaron los genes separadamente (Tablas 7 y 8).

El Modelo de Transición (TIM), con la corrección de gamma para la variación entre sitios y la corrección para sitios variables significativos (TIM+G+I), fue determinado por el análisis de Modeltest con las evaluaciones de AIC como el modelo de mejor ajuste a nuestros datos. Los parámetros del modelo presentan los siguientes valores: $R = (1.000, 9.5673, 2.5952, 2.5952, 15.3282)$, corrección para sitios variables significativos $P_{inv} = 0.4197$ y la corrección de gamma para la variación entre sitios 0.5159.

Considerando las similitudes entre los árboles resultantes para NJ, MP, ML y Mr. Bayes se elaboró un solo árbol de consenso que contiene los datos de los diferentes análisis (Fig. 3). El análisis NJ con la determinación de las distancias con ML usando TIM+G+I, con los valores mencionados anteriormente demostró que las poblaciones de *Artemia* son monofileticas (BS = 92.5%) y que las poblaciones de Cuba y México forman dos clados diferentes (BS = 100%). El análisis de ML con el uso de TIM+G+I mostró un alto valor del ML bootstrap para el clado de *Artemia* (BS = 88% búsqueda heurística). Nuevamente se encontró a las poblaciones de Cuba y México separadas en diferentes clados (BS = 99%).

El análisis de MP con búsqueda heurística y TIM+G+I, resultó en los 3 árboles más parsimoniosos de 1465 pasos (CI = 0.5679, RI = 0.5937, RC = 0.5105). De estos el árbol de consenso (bootstrap 50% majority-rule consensus tree), presentó una topología similar a los árboles de NJ y ML, mostrando a *Artemia* como un grupo monofiletico (BS = 74% búsqueda heurística) y a las poblaciones de Cuba y México como dos clados diferentes (BS = 100%).

El análisis con la combinación de los dos genes muestra una división de los anostracos evaluados en 3 grupos monofiléticos distintos. Un clado integrado por todos los taxa de *Artemia* el cual incluye las poblaciones de México y las de Cuba con *A. franciscana*, *A. persimilis* y *A. sinica* (Artemiidae) mientras que los otros están formados por *Polyartemiella hazeni* (Polyartemiidae) con *Artemiopsis stefanssoni*, *Eubbranchipus* sp. (Chirocephalidae) y *Streptocephalus dorotheae* (Streptocephalidae); *Thamnocephalus platyurus* (Thamnocephalidae) con *Parartemia contracta* y *P. cylindifera* (Parartemiidae) y finalmente *Branchinecta paludosa* (Branchinectidae). Una topología diferente se observó en el análisis MP para el grupo Parartemia/Streptocephalus/Thamnocephalus incluyendolos en un solo clado mientras que en los análisis NJ, ML y Mr Bayes se presentaron separados (Fig. 3).

El análisis Bayesiano, comparación ML usando Markov-chain y el Método Monte Carlo (MCMC) resultó en un árbol filogenético que presenta una clara separación entre las familias de anostracos: Parartemiidae (dos especies de *Parartemia*), Streptocephalidae (*Streptocephalus dorotheae*), Thamnocephalidae (*Thamnocephalus platyurus*), Chirocephalidae (*Artemiopsis stefanssoni* y *Eubbranchipus* sp.), Branchinectidae (*Branchinecta paludosa*), Polyartemiidae (*Polyartemiella hazeni*) y Artemiidae. Todo el grupo de *Artemia* es monofilético (BSP = 100%), pero *Artemia sinica* y *A. persimilis* no forman un solo cluster mientras que *A. sinica* forma un grupo junto con las poblaciones de Cuba y México que están a su vez separados en clados diferentes (BS = 100%), con *Artemia franciscana* junto a las poblaciones de Cuba (Fig. 3).

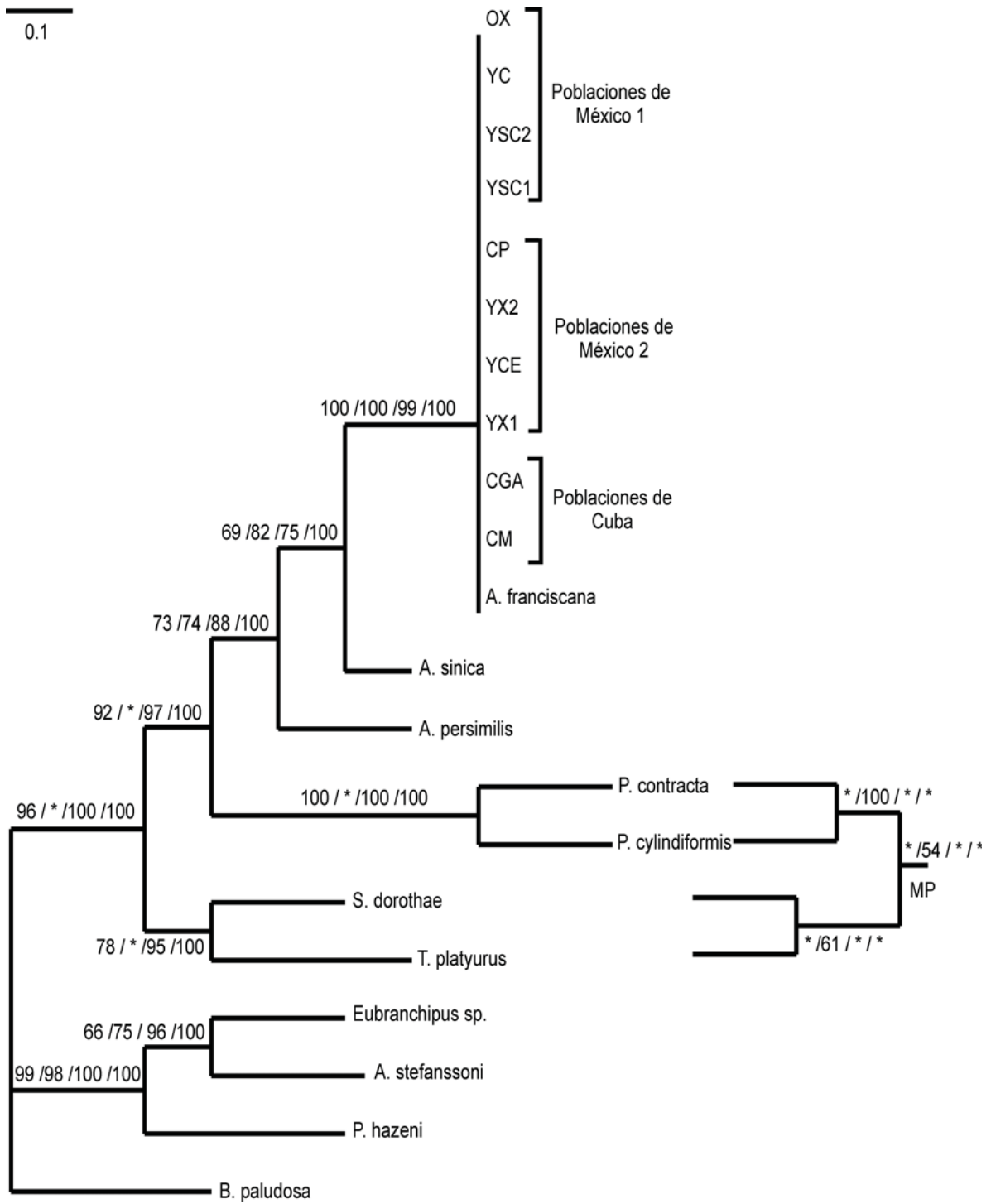


Figura 3. Filograma de consenso a partir de ADN mitocondrial (fragmentos combinados de 16S ARNr y COI) con los parámetros de del modelo TIM+I+G para los análisis NJ, MP, ML y Mr. Bayes (los números en ese orden) (* indican los valores BS de MP en el inserto).

Entre las poblaciones de *Artemia* estudiadas se observaron dos grupos principales, las poblaciones de Cuba con *A. franciscana* y las poblaciones de México con un fuerte soporte en los resultados de los análisis de NJ, MP, ML y Mr. Bayes (100 / 100 / 99 / 100). Los cladogramas para estos mismos análisis presentan a las poblaciones de México en 2 grupos formados por OX, YC, YSC2 y YSC1 (poblaciones de México 1) y CP, YX2, YCE con YX1 (poblaciones de México 2) (Fig. 4).

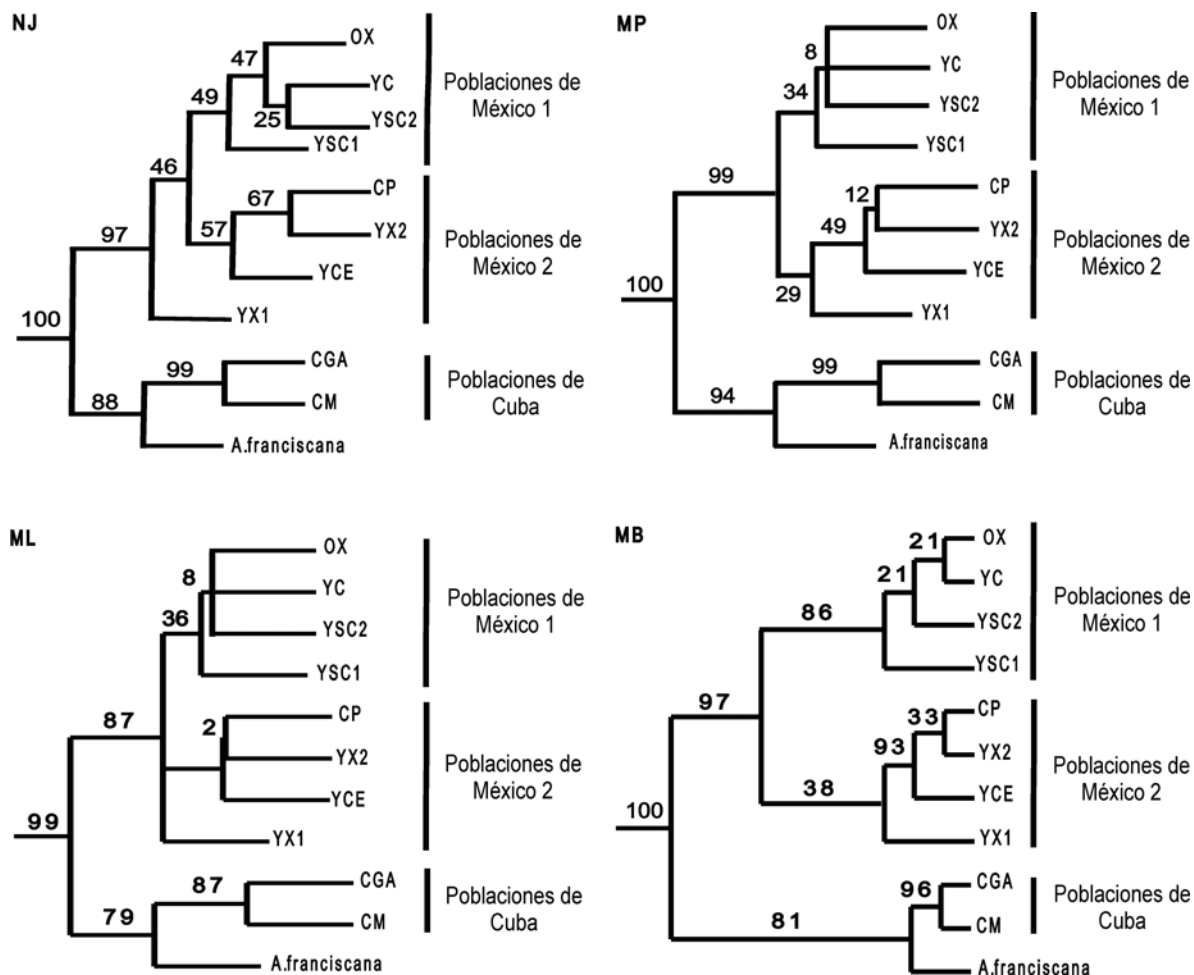


Figura 4. Secciones de cladogramas de las poblaciones de Cuba y México a partir de ADN mitocondrial (fragmentos combinados de 16S ARNr y COI) con los parámetros del modelo TIM+I+G para los análisis NJ, MP, ML y Mr. Bayes.

3.2 Estudios citogenéticos

El número y las características de los cromocentros obtenidos a partir de quistes de *Artemia* de poblaciones de Cuba, México, Puerto Rico y Estados Unidos se muestran en la Tabla 10 y las Figuras 5 a la 8. De las poblaciones estudiadas, las de Cuba mostraron los mayores promedios en el número de cromocentros, presentando 17.4 ± 0.3 para la muestra procedente de la salina Frank País (Guantánamo) (CM) (Fig. 5a), mientras que los ejemplares de la salina El Real (Camagüey) (CGA) mostraron valores por arriba de 20 cromocentros que no fue posible contar en su totalidad (Fig. 5b).

De las poblaciones de México, la de Campeche (CP) presentó el valor menor con un promedio de 10.13 ± 1.8 cromocentros (Fig. 6c) mientras Oaxaca (OX) y San Crisanto (Yucatán) (YSC) (Fig. 6d y 7e) mostraron promedios de 13.81 ± 1.5 y 14.09 ± 2.1 respectivamente. Las poblaciones de Yucatán estudiadas por Torrentera y Abreu-Grobois (2002), (Xtampú (8.6), Chuburna (4.4) y Celestún (3.8) presentan valores inferiores que las encontradas en este estudio. También un promedio inferior al encontrado en nuestros estudios fue determinado para muestras de *Artemia* de Yavaros, Sinaloa con 3.9 (Abreu-Grobois y Breardmore, 1989) y 3.0 (Morales, 2005) (Tabla 10).

En la muestra de la Bahía de San Francisco (SFB) (Fig. 7f) se observaron 17 ± 1.1 cromocentros como promedio, por otra parte conteos de poblaciones de *A. franciscana* de la Bahía de San Francisco de 13.5 ± 2.8 y Pichilingue de 12.1 ± 3.0 fueron obtenidos por Morales (2005). En los ejemplares de Puerto Rico (PR 2) se encontró el menor valor de todas las poblaciones estudiadas con una media de 5.1 ± 0.1 cromocentros cercana a la encontrada por Mayer (2002) para poblaciones de ese país (7.25 ± 1.92) (Fig. 8).

Tabla 10. Número promedio de cromocentros, desviación estándar (ds) y abreviaturas de referencia de las poblaciones de estudio y de poblaciones de América obtenidos por diferentes autores (en paréntesis abreviaturas utilizadas en el análisis discriminante) (*Valores de error estándar).

Localidad / Código	Especie	Número promedio Cromocentros \pm ds	Autor
Canadá			
Lago Chaplin (Can)	<i>A. franciscana</i>	17.70 \pm 1.92	Abreu-Grobois y Beardmore, 1989
EUA			
Bahía de San Francisco (SFB)	<i>A. franciscana</i>	17.01 \pm 1.0	Este estudio
Gran Lago Salado (GSL)	<i>A. franciscana</i>	17.0 \pm 2.3	Abreu-Grobois y Beardmore, 1989
Bahía de San Francisco	<i>A. franciscana</i>	13.5 \pm 2.8	Morales, 2005
México			
Pichilingue, Baja California Sur	<i>A. franciscana</i>	12.1 \pm 1.1	Morales, 2005
Yavaros, Sonora	<i>A. cf. franciscana</i>	3.0 \pm 1.1	Morales, 2005
Yavaros, Sonora (YAV)	<i>A. cf. franciscana</i>	3.9 \pm 0.88*	Abreu-Grobois y Beardmore, 1989
Celestún, Yucatán (YCE)	<i>A. cf. franciscana</i>	3.8 \pm 0.3*	Torrentera y Abreu-Grobois, 2002
Chuburna, Yucatán (YC)	<i>A. cf. franciscana</i>	4.4 \pm 0.2*	Torrentera y Abreu-Grobois, 2002
Xtampú, Yucatán (YX)	<i>A. cf. franciscana</i>	8.6 \pm 0.3*	Torrentera y Abreu-Grobois, 2002
Las Coloradas, Yucatán (YLC)	<i>A. cf. franciscana</i>	9.9 \pm 0.3*	Torrentera y Abreu-Grobois, 2002
San Crisanto, Yucatán (YSC)	<i>A. cf. franciscana</i>	14.1 \pm 2.1	Este estudio
Campeche (CP)	<i>A. cf. franciscana</i>	10.1 \pm 1.8	Este estudio
Oaxaca (OX)	<i>A. cf. franciscana</i>	13.8 \pm 1.5	Este estudio

Tabla 10. Continuación...

Localidad / Código	Especie	Número promedio Cromocentros \pm ds	Autor
Cuba			
Frank Pais, Guantánamo (CM)	<i>A. franciscana</i>	17.4 \pm 3.8	Este estudio
El Real, Camagüey (CGA)	<i>A. franciscana</i>	> 20	Este estudio
Puerto Rico			
Bahía salinas (PR 1)	<i>A. franciscana</i>	7.25 \pm 1.92	Abreu-Grobois y Beardmore, 1989
Salina La Parguera, Mayaguey (PR 2)	<i>A. franciscana</i>	5.1 \pm 1.1	Este estudio
Colombia			
Manaure (Col)	<i>A. franciscana</i>	7.12 \pm 1.31	Abreu-Grobois y Beardmore, 1989
Venezuela			
Puerto Araya (Ven)	<i>A. franciscana</i>	7.10 \pm 1.75	Abreu-Grobois y Beardmore, 1989
Brasil			
Macau (Br 1)	<i>A. franciscana</i>	9.8 \pm 2.0	Gajardo <i>et al.</i> , 2001
Cabo Frío (Br 2)	<i>A. franciscana</i>	15.5 \pm 3.5	Gajardo <i>et al.</i> , 2001
Ecuador			
Pacoa (Ecu 1)	<i>A. franciscana</i>	8.9 \pm 3.0	Gajardo <i>et al.</i> , 2001
San Pedro (Ecu 2)	<i>A. franciscana</i>	5 \pm 3.5	Gajardo <i>et al.</i> , 2001
Perú			
Piura (Per)	<i>A. franciscana</i>	7.7 \pm 1.9	Gajardo <i>et al.</i> , 2001
Argentina			
Provincia Buenos Aires (Ar 1)	<i>A. persimilis</i>	1.4 \pm 0.25	Gajardo <i>et al.</i> , 2001
Colorada chica (Ar 2)	<i>A. persimilis</i>	1 \pm 0	Gajardo <i>et al.</i> , 2001
Río Negro (Ar 3)	<i>A. persimilis</i>	13.1 \pm 0.6	Gajardo <i>et al.</i> , 2001

El análisis discriminante mostró la formación de 2 grupos principales, el primero que incluye a las poblaciones que presentan un rango entre 13 y 18 cromocentros como

promedio, el cual contiene a poblaciones bien definidas como *A. franciscana* (CAN, GSL, BR 2) o pertenecientes a la localidad de origen como SFB, aunque también se observan 2 poblaciones de México (OX y YSC) y una de Argentina (Ar 3) (correspondiente a *A. persimilis*) formando un grupo independiente dentro del mismo. De la misma manera por su alto número de cromocentros los ejemplares de la población de Cuba de la salina El Real (CGA) se muestran separadamente del cluster que contiene las poblaciones de *A. franciscana* aunque dentro de mismo subgrupo (Fig. 9).

El segundo cluster contiene dos subgrupos, el primero dividido a su vez en dos contiene las muestras de Argentina de la especie *A. persimilis* (Ar 1 y Ar 2) con los menores valores medios del número de cromocentros (entre 1 y 1.4) mientras que el segundo reúne poblaciones de diferentes localidades de México (YAV, YCE y YC), Puerto Rico (PR 2) y Ecuador (Ecu 2) con promedios entre 3.8 y 5.1. El segundo subgrupo dividido también en dos partes reúne en una de ellas a las poblaciones de Colombia (Col), Venezuela (Ven), Puerto Rico (PR 1) y Perú (Per) con un contenido de 7.1 a 7.7 cromocentros como promedio, mientras que en el segundo subgrupo presenta a ejemplares con contenidos medios entre 8.6 y 10 e incluye a las localidades de México (YX, YLC y CP), Brasil (Br 1) y Ecuador (Ecu 1).

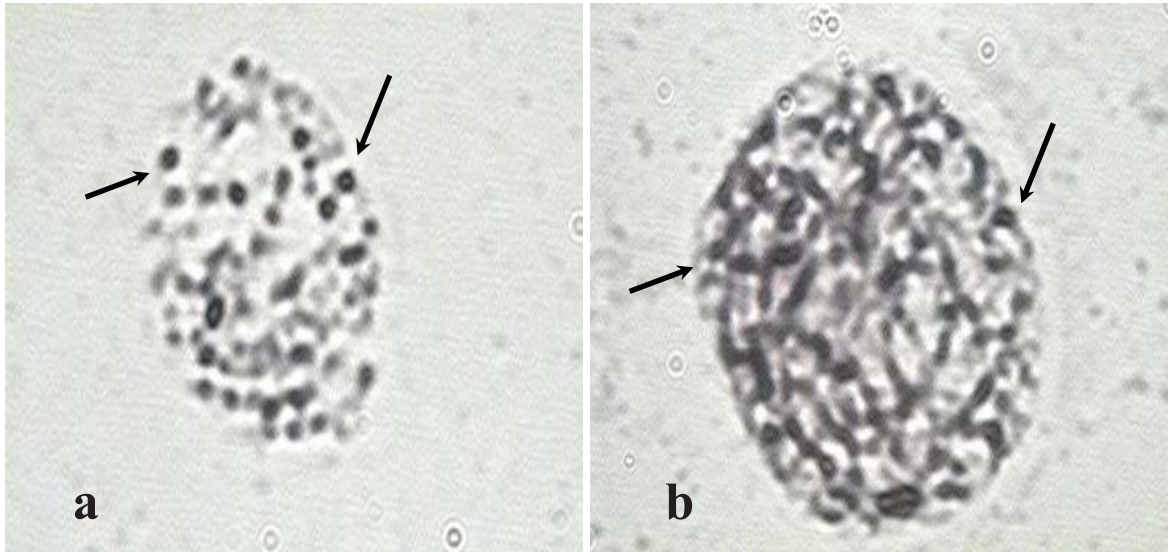


Figura 5. Cromocentros en células interfásicas de *Artemia* de Frank Pais, Caimanera (CM) (alrededor de 17 cromocentros) (40x – 2x) (a), y El Real, Camagüey (CGA) (> 20 cromocentros) (100x – 2x) (b).

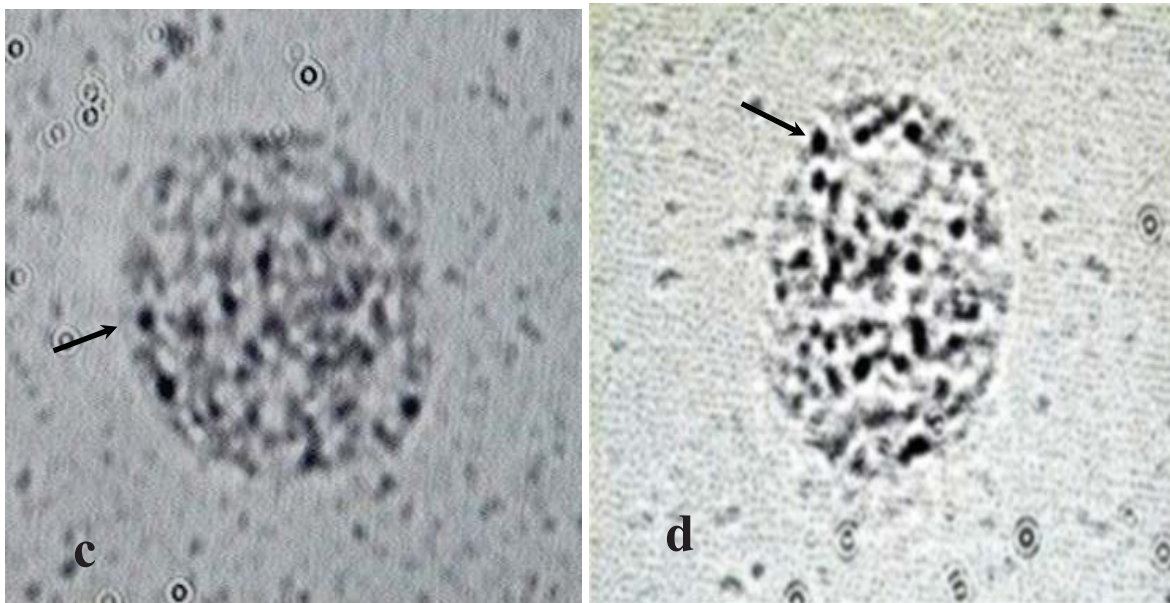


Figura 6. Cromocentros en células interfásicas de *Artemia* de Campeche (CP) (alrededor de 10 cromocentros) (100x – 2x) (c) y Oaxaca (OX) (alrededor de 14 cromocentros) (100x – 2x) (d).

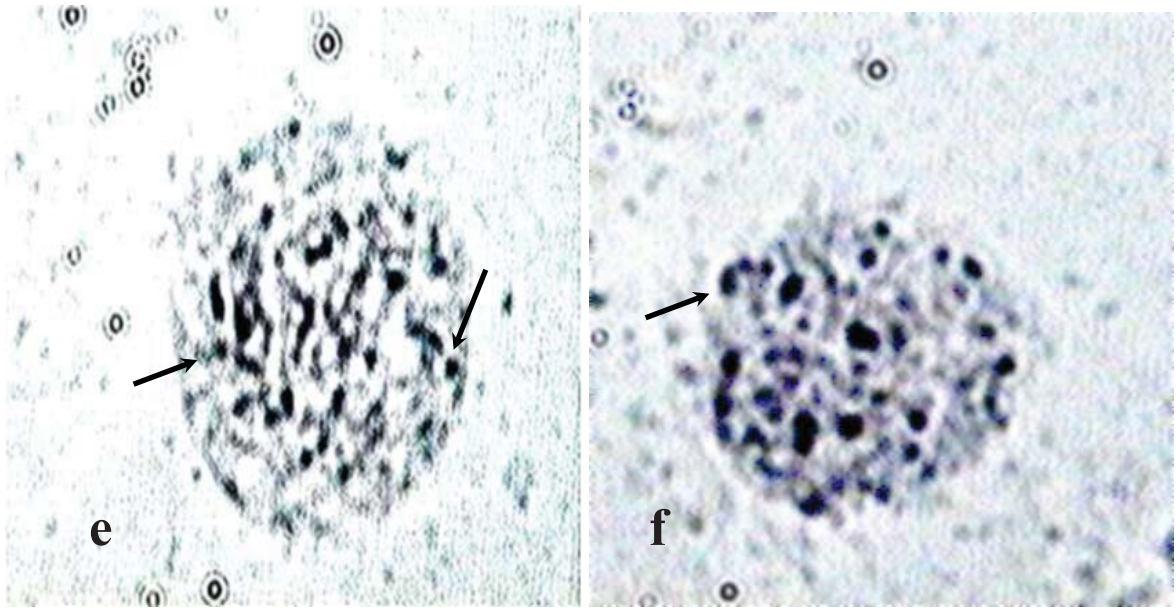


Figura 7. Cromocentros en células interfásicas de *Artemia* de San Crisanto (YSC) (alrededor de 14 cromocentros) (100x – 2x) (e) y Bahía de San Francisco (SFB) (EU) (*A. franciscana*, alrededor de 17 cromocentros) (100x – 2x) (f).

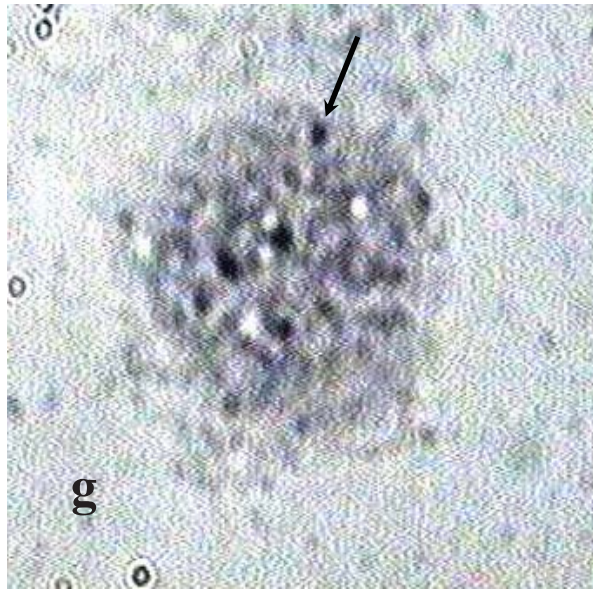


Figura 8. Cromocentros en células interfásicas de *Artemia* de Puerto Rico (PR2) (alrededor de 5 cromocentros) (100x – 2x) (g).

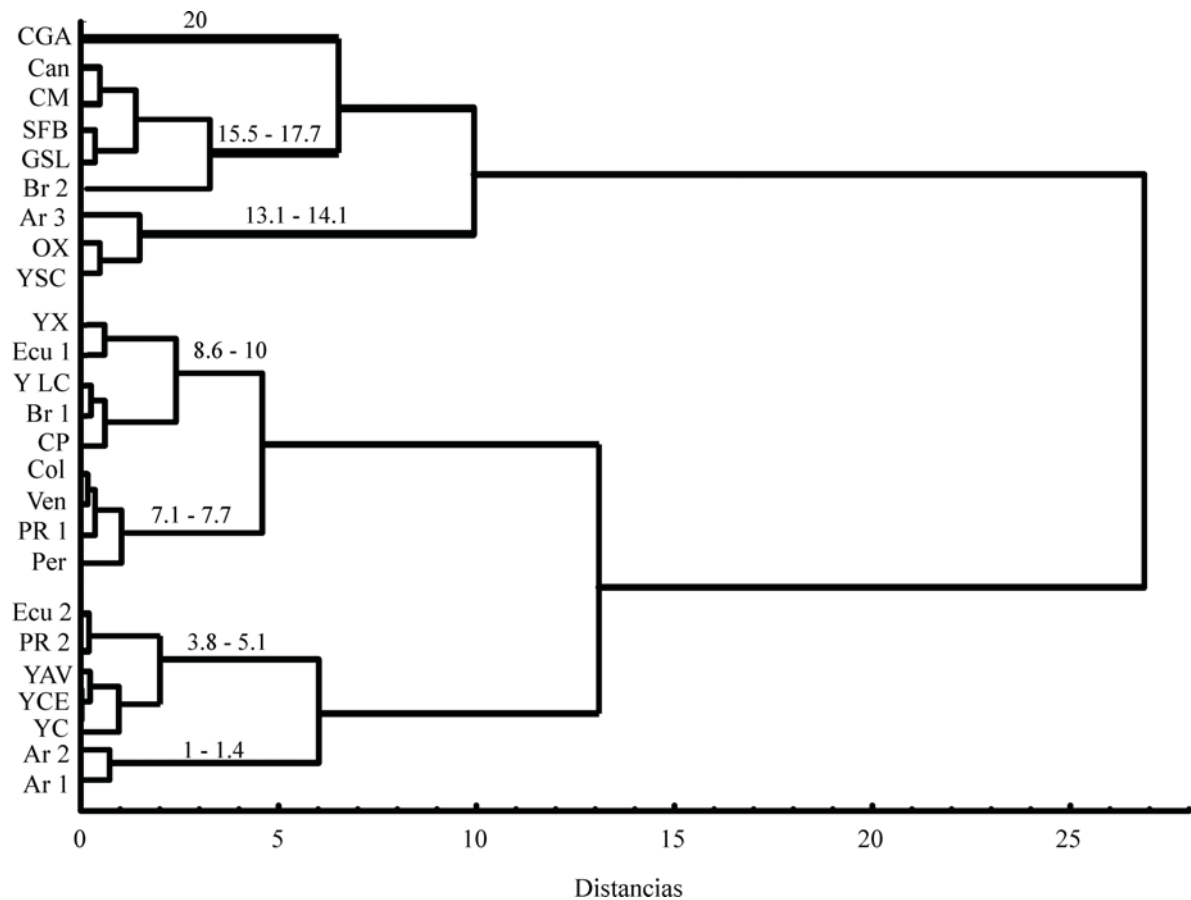


Figura 9. Análisis discriminante (distancias Euclidianas) entre el número promedio de cromocentros de poblaciones de *A. franciscana* y *A. persimilis* de diferentes localidades de América.

3.3 Estudios morfológicos

Las poblaciones de Cuba muestran el diámetro de quistes menor (CM $199.9 \pm 9.0 \mu\text{m}$, CGA $201.5 \pm 12.0 \mu\text{m}$) en comparación con las poblaciones de *A. franciscana* de diferentes localidades de América evaluadas por diferentes autores (Vanhaecke y Sorgeloos, 1980; Mayer, 2002). Sin embargo, en las muestras del año 2000 de la salina Frank País este valor se encuentra entre 231.4 y $236.7 \mu\text{m}$ similar a los observados en otras localidades de la región. (Tabla 11).

Tabla 11. Diámetro de quistes (enteros y decapsulados) y largo total de nauplios de las poblaciones de Cuba (\pm ds) y otras localidades de América (en μ m).

Procedencia	Diámetro de quistes sin decapsular	Diámetro de quistes decapsulados	Grosor del corion	Largo total de nauplios	Referencia
San Francisco Bay (Estados Unidos)	241	-	-	431	Mayer, 2002
San Francisco Bay (Estados Unidos)	223.9–228.7	207.7 – 212.1	7.05 – 8.30	-	Vanhaecke y Sorgeloos, 1980
Great Salt Lake (Estados Unidos)	244.2-252.5	234.8-241.6	4.7-5.45	-	Vanhaecke y Sorgeloos, 1980
Salina Frank Pais (Cuba)	231.4- 236.7	215 - 221	10 - 21	406 - 421	(datos no publicados del autor, 2000)
Salina Frank Pais (Cuba)	199.9 \pm 9.0	184.2 \pm 7.0	15.7	401 \pm 18	Este estudio
Salina El Real (Cuba)	201.5 \pm 12.0	191.2 \pm 6.0	10.3	404 \pm 15	Este estudio
Monte Cristi (Republica Dominicana)	225	-	-	462	Mayer, 2002
Salina Fortuna (Puerto Rico)	232	-	-	455	Mayer, 2002
Salina Botoncillo (Puerto Rico)	221	-	-	464	Mayer, 2002
Bahia Salinas (Puerto Rico)	253.7	233.4	10.15	-	Vanhaecke y Sorgeloos, 1980
Puerto Araya (Venezuela)	246.8-249	226.4-226.6	10.1-11.2	-	Vanhaecke y Sorgeloos, 1980

El diámetro de los quistes decapsulados también presenta los menores valores (CM 184.2 \pm 7.0 μ m y CGA 191.2 \pm 6.0 μ m), al ser comparados con los obtenidos por otros

autores. También en las muestras del año 2000 de la salina Frank País los valores del diámetro de quistes decapsulados se encuentra dentro de los rangos encontrados en otros estudios en el área (Vanhaecke y Sorgeloos, 1980, Mayer, 2002).

El grosor del corion para los quistes de las poblaciones de Cuba se encuentra entre 10 y 21 μm para las muestras de la salina Frank País (CM) y 10.3 μm para los quistes de la salina El Real (CGA); valores entre 10 y 11 μm han sido encontrados en quistes de Puerto Rico y Venezuela (Vanhaecke y Sorgeloos, 1980).

Los nauplios de la salina Frank País (CM) presentan valores entre 401 ± 18 y $421 \mu\text{m}$ de largo y $404\pm 15 \mu\text{m}$ para los de la salina El Real (CGA) en ambos casos son inferiores a los encontrados por Mayer (2002) en poblaciones del Caribe, Puerto Rico (455–464 μm), República Dominicana (462 μm), y América del Norte (Bahía de San Francisco, EUA, 431 μm) aunque cercanos a esta última.

La mayoría de los diferentes indicadores morfológicos evaluados presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$) para las poblaciones de las dos salinas de Cuba, en el caso de los machos únicamente en el largo del abdomen (lab) no se observó diferencia, mientras que entre las hembras solo la longitud de la primera antena (la) y el largo total (lt) no presentaron diferencias significativas (Tabla 12). El largo total medio de machos y hembras en conjunto fue inferior a los encontrados por Gajardo *et al.* (1998) para diferentes poblaciones de América del Norte, Chile y Argentina (Tabla 13).

Tabla 12. Comparación de diferentes características morfológicas por sexos, en adultos de *Artemia* de las salinas El Real (Camagüey) y Frank País (Guantánamo) ($P>0.05$). Diámetro ocular (doc), distancia entre los ojos (do), ancho de la cabeza (ac), longitud de la primera antena (la), longitud abdominal (lab), ancho abdominal (aa), longitud de la furca (lf), número de setas en la furca (sf), ancho del saco ovígero (aso) y largo total (lt).

Característica	Hembras	Machos
	F (Fc = 4.01)	F (Fc = 4.01)
doc	26.48*	79.2*
do	32.78*	88.08*
ac	67.64*	119.7*
la	1.122	28.76*
aa	31.2*	101.1*
lab	21.83*	0.611
lf	103.4*	385.7*
sf	125.9*	273.1*
lt	2.159	7.046*
aso	284.4*	ND

* indica diferencias significativas

Tabla 13. Valores morfométricos promedio de las poblaciones de Cuba y otras localidades de América (valores en mm, excepto sf que es un valor absoluto, (n) = ds). Diámetro ocular (doc), distancia entre los ojos (do), ancho de la cabeza (ac), longitud de la primera antena (la), longitud abdominal (lab), ancho abdominal (aa), longitud de la fúrca (lf), número de setas en la fúrca (sf), ancho del saco ovífero (aso) y largo total (lt).

Localidad	lt	lab	aa	do	doc	sf	lf	la	ac	% lab / lt	Referencia
San Francisco Bay, EUA (SFB)	7.74 (1.35)	2.95 (0.65)	0.69 (0.20)	1.69 (0.20)	0.35 (0.05)	10.95 (1.88)	0.27 (0.05)	0.76 (0.26)	0.94 (0.10)	38.12 (7.10)	Gajardo <i>et al.</i> , 1998
Salina El Real, Cuba (CGA)	5.48 (0.74)	2.67 (0.39)	0.31 (0.04)	0.89 (0.15)	0.19 (0.04)	7.82 (1.65)	0.13 (0.02)	0.46 (0.11)	0.19 (0.07)	48.72 (4.82)	Este estudio
Salina Frank Pais, Cuba (CM)	5.41 (0.59)	2.37 (0.22)	0.40 (0.03)	1.14 (0.10)	0.25 (0.03)	15.55 (1.91)	0.24 (0.03)	0.52 (0.05)	0.48 (0.06)	43.72 (3.98)	Este estudio
Macau, Brasil (Br)	8.44 (1.07)	3.83 (0.67)	0.62 (0.09)	1.7 (0.19)	0.32 (0.04)	10.16 (1.76)	0.34 (0.04)	0.81 (0.25)	1.02 (0.09)	45.15 (2.89)	Gajardo <i>et al.</i> , 1998
Salar de Atacama, Chile (Chil 1)	6.67 (1.14)	2.58 (0.73)	0.42 (0.90)	1.31 (0.16)	0.27 (0.05)	7.36 (1.71)	0.21 (0.06)	0.7 (0.21)	0.68 (0.12)	38.1 (6.15)	Gajardo <i>et al.</i> , 1998
Torres del Paine, Chile (Chil 2)	9.37 (1.29)	5.02 (0.88)	0.43 (0.04)	1.46 (0.24)	0.27 (0.10)	1.91 (1.40)	0.06 (0.05)	0.78 (0.31)	0.69 (0.09)	53.37 (3.55)	Gajardo <i>et al.</i> , 1998
Pichilemu Chile, (Chil 3)	8.4 (1.04)	4.37 (0.78)	0.42 (0.05)	1.35 (0.13)	0.28 (0.10)	2.88 (1.25)	0.21 (0.04)	0.56 (0.18)	0.77 (0.06)	54.74 (3.65)	Gajardo <i>et al.</i> , 1998
Buenos Aires, Argentina (Ar)	8.28 (0.97)	3.29 (0.67)	0.4 (0.08)	1.46 (0.23)	0.29 (0.06)	3.1 (1.53)	0.18 (0.12)	0.56 (0.25)	0.76 (0.11)	40.27 (9.18)	Gajardo <i>et al.</i> , 1998

El análisis discriminante mostró la formación de 2 grupos principales, el primero que incluye a dos poblaciones de Chile de la especie *A. persimilis* (Chil 2 y Chil 3), mientras que el segundo incluye a las poblaciones cercanas a *A. franciscana* (SFB, Chil 1, Br, CGA y CM), aunque la población Ar no pertenece a esta especie (Fig. 10).

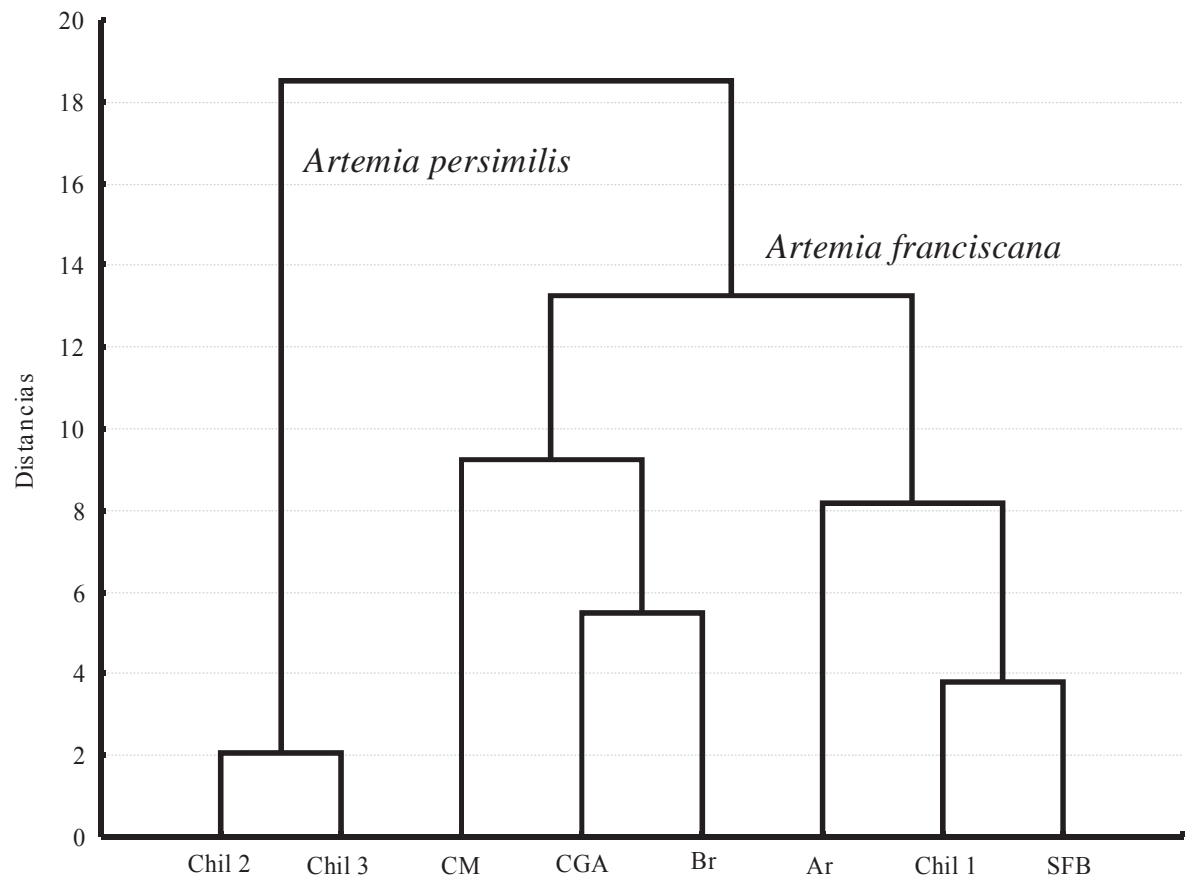


Figura 10. Análisis de cluster (distancias Euclidianas) entre diferentes poblaciones de América a partir de medidas morfométricas.

3.4 Perfil de ácidos grasos

Los perfiles de ácidos grasos identificados están caracterizados por un importante número de compuestos presentes con un total de 51 ácidos grasos (Anexo 1). La Tabla 14 muestra las concentraciones medias de 29 compuestos seleccionados (con concentraciones > 0.1 µg/mg dw (peso seco por sus siglas en inglés)).

Los ácidos grasos metil esterés (FAME por sus siglas en inglés) más representados corresponden a C16:0 y C18:0. En particular el ácido hexadecanoico (C16:0), se encuentra en todas las muestras con valores por encima de los 16 µg/mg dw, con las cifras más importantes para las muestras CM, CP y SFB. Los menores valores del ácido cis-11-hexadecenoico (C16:1 n5) se encontraron en las muestras de OX, YCE y SFB (< 8 µg/mg dw). Los ácidos grasos metil esterés C18:0 (9-octadecenoico C18:1 n9, 11-octadecenoico C18:1 n7, y 9,12-octadecadienoico C18:2 n6 se encontraron en todas las muestras mientras que las concentraciones mínimas y máximas para el C18:1 n9 fueron 13.5 (YCE) y 42.8 µg/mg dw (YX) respectivamente. En todas las muestras la concentración de C18:1 n7 fue mayor de 6.5 µg/mg dw, con el valor máximo para CP (19.1 µg/mg dw). También el C18:3 n3 se encontró en todas las muestras con un máximo de 42.9 µg/mg dw en SFB, y en menores concentraciones en las muestras de OX (8.5 µg/mg dw), CP (8.1 µg/mg dw) y YCE (7.7 µg/mg dw); el valor mínimo se encontró en las muestras de CGA, con 0.7 µg/mg dw.

El ácido docosanoico C22:0 fue encontrado en todas las muestras en concentraciones menores de 1.2 µg/mg dw, mientras que el C22:6 n3 (docosaheptanoico) no fue detectado.

Se observó que los ácidos grasos monoinsaturados predominaron en todas las muestras con excepción de SFB. Este resultado coincide con los obtenidos por otros autores en estudios del perfil de ácidos grasos en quistes y nauplios de diferente origen (Coutteau y Mourente, 1991; Navarro y Amat, 1992; McEvoy *et al.*, 1996; Navarro *et. al.*, 1997) (Tabla 15).

Tabla 14. Concentraciones de ácidos grasos determinados en las poblaciones de Cuba, México y Estados Unidos ($\mu\text{g}/\text{mg dw}$). Los datos representan las medias \pm SD ($n = 3$). Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

Ácido graso	CGA ^a	CM ^b	CP ^c	OX ^d	YC ^e	YCE ^f	YX ^g	YSC ^h	SFB ⁱ
14:0	1.86 \pm 0.3 ^f	2.54 \pm 0.6	2.08 \pm 0.4	1.92 \pm 0.4	1.39 \pm 0.5	1.27 \pm 0.2 ^a	2.10 \pm 0.8	1.60 \pm 0.7	1.64 \pm 0.04
iso 14:0	2.29 \pm 0.3 ^c	2.32 \pm 0.5 ^c	4.89 \pm 1.1 ^{abdefghi}	1.25 \pm 0.3 ^{ch}	2.01 \pm 0.8 ^c	2.31 \pm 0.3 ^c	1.81 \pm 0.7 ^c	3.16 \pm 1.4 ^{cd}	2.06 \pm 0.06 ^c
15:0	1.78 \pm 0.2 ^{fghi}	2.01 \pm 0.4 ^{defghi}	1.89 \pm 0.4 ^{dghi}	0.91 \pm 0.2 ^{abc}	1.24 \pm 0.5 ^{bfi}	0.23 \pm 0.3 ^{abceh}	0.69 \pm 0.3 ^{abc}	1.00 \pm 0.4 ^{abcf}	0.33 \pm 0.01 ^{abce}
iso 15:0	1.32 \pm 0.1 ^c	1.50 \pm 0.3 ^c	2.93 \pm 0.8 ^{abdefghi}	0.61 \pm 0.1 ^{ch}	1.22 \pm 0.5 ^c	1.37 \pm 0.2 ^c	0.98 \pm 0.4 ^c	1.92 \pm 0.8 ^d	1.22 \pm 0.03 ^c
16:0	16.40 \pm 1.5 ^{bc}	37.14 \pm 8.3 ^{aef}	41.13 \pm 11.2 ^{aef}	24.47 \pm 4.1	18.02 \pm 7.3 ^{bc}	19.41 \pm 2.9 ^{bc}	26.84 \pm 10.9	24.07 \pm 10.1	30.81 \pm 1.4
16:1 n7	2.74 \pm 0.3 ^{beg}	7.96 \pm 1.9 ^{adefhi}	5.99 \pm 1.2 ^{adefi}	2.35 \pm 0.5 ^{bg}	1.80 \pm 0.7 ^{beg}	0.58 \pm 0.1 ^{bog}	7.83 \pm 2.7 ^{aethi}	2.97 \pm 1.4 ^{bg}	1.94 \pm 0.2 ^{bog}
16:1 n5	19.31 \pm 2.4 ^{dfi}	14.56 \pm 3.6	21.99 \pm 4.8 ^{digi}	8.52 \pm 1.7 ^{ac}	16.36 \pm 5.8 ^{fi}	5.51 \pm 0.7 ^{ace}	11.28 \pm 4.1 ^c	14.36 \pm 6.5	5.13 \pm 0.4 ^{ace}
iso 16:0	1.76 \pm 0.1 ^c	1.97 \pm 0.5 ^c	4.02 \pm 1.3 ^{abdefghi}	0.74 \pm 0.2 ^{ch}	1.88 \pm 0.8 ^c	1.75 \pm 0.3 ^c	1.29 \pm 0.6 ^c	2.30 \pm 0.1 ^c	1.24 \pm 0.1 ^c
16:2	1.43 \pm 0.2 ^{ghi}	1.96 \pm 0.5 ^{efghi}	1.32 \pm 0.2 ^{gh}	0.57 \pm 0.1 ^b	1.14 \pm 0.3	0.80 \pm 0.7 ^b	0.45 \pm 0.1 ^{abc}	0.46 \pm 0.2 ^{abc}	0.50 \pm 0.1 ^{ab}
17:0	3.49 \pm 0.2 ^{fi}	3.31 \pm 0.8 ^{fi}	3.70 \pm 1.3 ^{fi}	1.87 \pm 0.4	3.25 \pm 1.4 ^{fi}	0.82 \pm 0.1 ^{abce}	1.82 \pm 0.8	2.63 \pm 1.1	1.00 \pm 0.1 ^{abce}
17:1	3.98 \pm 0.3 ^{fi}	5.44 \pm 1.3 ^{defghi}	4.40 \pm 0.9 ^{fghi}	2.29 \pm 0.4 ^{bc}	2.71 \pm 1.2 ^b	0.83 \pm 0.1 ^{abc}	2.49 \pm 0.9 ^b	2.15 \pm 0.9 ^{bc}	0.88 \pm 0.1 ^{abc}
18:0	5.73 \pm 0.4	5.19 \pm 1.1	8.15 \pm 3.3	4.55 \pm 0.9	5.43 \pm 2.4	5.59 \pm 1.0	5.20 \pm 2.3	6.54 \pm 2.7	8.59 \pm 0.6
18:1 n9	24.53 \pm 1.2	41.92 \pm 10.2 ^{ef}	42.00 \pm 12.7 ^{ef}	21.74 \pm 3.9	18.14 \pm 7.4 ^{beg}	13.59 \pm 2.1 ^{beg}	42.86 \pm 16.2 ^{ef}	25.25 \pm 10.8	30.92 \pm 3.2
18:1 n7	16.37 \pm 0.8 ^d	9.31 \pm 2.2 ^c	19.18 \pm 5.7 ^{bdfgi}	6.95 \pm 1.3 ^{ac}	12.83 \pm 5.2	6.52 \pm 1.0 ^{ac}	11.01 \pm 4.1	13.88 \pm 5.8	7.66 \pm 0.1 ^{ac}
18:2 n6	0.03 \pm 0.02 ^{fi}	0.02 \pm 0.01 ^{fi}	0.09 \pm 0.04 ⁱ	0.03 \pm 0.01 ^{fi}	0.04 \pm 0.03 ⁱ	0.12 \pm 0.05 ^{abdi}	0.06 \pm 0.03 ⁱ	0.07 \pm 0.04 ⁱ	0.56 \pm 0.05 ^{abcedefgh}
18:2 n3	16.22 \pm 1.3 ^{bhghi}	27.80 \pm 6.8 ^{adeefghi}	20.46 \pm 4.8 ^{defghi}	11.80 \pm 2.1 ^{bc}	11.28 \pm 4.3 ^{bc}	3.54 \pm 0.5 ^{abc}	6.80 \pm 2.3 ^{abc}	7.44 \pm 3.2 ^{abc}	7.02 \pm 0.7 ^{abc}
18:3 n6	0.25 \pm 0.02 ^{ci}	0.41 \pm 0.1 ^{fg}	0.50 \pm 0.1 ^{adefgh}	0.26 \pm 0.06 ^{ci}	0.34 \pm 0.1	0.18 \pm 0.03 ^{bci}	0.21 \pm 0.1 ^{bci}	0.30 \pm 0.1 ^{ci}	0.52 \pm 0.05 ^{adefgh}
18:3 n3	0.79\pm0.1^{cdfi}	2.16\pm0.5^{cdfi}	8.17\pm2.1^{abegi}	8.55\pm1.7^{abegi}	2.20\pm0.8^{cdfi}	7.76\pm1.1^{abci}	3.84\pm1.2^{cdi}	4.63\pm2.1ⁱ	42.94\pm3.1^{abcedefgh}
18:4	0.29 \pm 0.04 ^{cfgi}	0.48 \pm 0.1 ^{cfi}	1.7 \pm 0.4 ^{abdei}	0.66 \pm 0.2 ^{ci}	0.61 \pm 0.2 ^{ci}	1.35 \pm 0.2 ^{abi}	1.15 \pm 0.2 ^{ai}	0.99 \pm 0.4 ⁱ	7.40 \pm 0.7 ^{abcedefgh}
19:0	0.13 \pm 0.02	0.17 \pm 0.1 ^f	0.13 \pm 0.08	0.06 \pm 0.03	0.10 \pm 0.06	0.03 \pm 0.01 ^b	0.07 \pm 0.04	0.08 \pm 0.03	0.04 \pm 0.02
20:0	0.22 \pm 0.02	0.24 \pm 0.1	0.45 \pm 0.2	0.24 \pm 0.04	0.30 \pm 0.1	0.21 \pm 0.07	0.30 \pm 0.1	0.28 \pm 0.1	0.27 \pm 0.04
20:1 cis 11	0.58 \pm 0.06	0.81 \pm 0.2 ^f	0.88 \pm 0.4 ^{efhi}	0.43 \pm 0.08 ⁱ	0.38 \pm 0.16 ^{ci}	0.17 \pm 0.02 ^{begi}	0.80 \pm 0.4 th	0.22 \pm 0.1 ^{begi}	1.04 \pm 0.1 ^{deth}
20:1 cis 13	0.32 \pm 0.03	0.15 \pm 0.05	0.41 \pm 0.2 ^{dth}	0.10 \pm 0.01 ^c	0.26 \pm 0.1	0.11 \pm 0.04 ^c	0.21 \pm 0.1	0.13 \pm 0 ^c	0.20 \pm 0.2
20:2 n6	0.11 \pm 0.05 ^b	0.31 \pm 0.08 ^{adeefgh}	0.19 \pm 0.2	0.12 \pm 0.02 ^b	0.09 \pm 0.04 ^b	0.19 \pm 0.1	0.11 \pm 0.04 ^b	0.12 \pm 0.03 ^b	0.25 \pm 0.05
20:3 n6	0.08 \pm 0.01	0.18 \pm 0.05 ^g	0.17 \pm 0.05 ^g	0.11 \pm 0.03	0.11 \pm 0.05	0.09 \pm 0.02	0.07 \pm 0.03 ^{bc}	0.12 \pm 0.06	0.11 \pm 0.03
20:4 n6	0.86 \pm 0.1 ^b	2.64 \pm 0.7 ^{acefghi}	0.9 \pm 0.3 ^b	2.04 \pm 0.04 ^{fg}	1.05 \pm 0.4 ^b	0.05 \pm 0.01 ^{bdi}	0.37 \pm 0.1 ^{bd}	1.11 \pm 1.1 ^b	1.36 \pm 0.2 ^{bf}
20:5 n3	1.87\pm0.2^{bdi}	4.06\pm1.2^{aceefgh}	2.03\pm0.5^{bdfi}	4.28\pm0.9^{aceefgh}	1.95\pm0.7^{bfi}	0.23\pm0.04^{bceehi}	1.08\pm0.3^{bdi}	2.02\pm0.9^{bdfi}	4.48\pm0.5^{aceefgh}
22:0	0.70 \pm 0.1	0.85 \pm 0.2	1.12 \pm 0.7	0.59 \pm 0.2	0.72 \pm 0.3	0.70 \pm 0.2	0.79 \pm 0.4	0.75 \pm 0.3	0.80 \pm 0.4
24:0	0.15 \pm 0.04	0.27 \pm 0.06	0.33 \pm 0.3	0.11 \pm 0.04	0.14 \pm 0.1	0.22 \pm 0.06	0.29 \pm 0.1	0.23 \pm 0.06	0.28 \pm 0.1

En negritas ácidos grasos de importancia para la nutrición de especies acuícolas marinas.

Tabla 15. Comparación de la proporciones (% del total) de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados obtenidos en este estudio y por diferentes autores.

Origen de la muestra	Saturados	Monoinsaturados	Poliinsaturados	Método de extracción	Referencia
CGA	29.0	54.1	16.8	1	Este estudio
CM	32.1	46.1	21.8	1	Este estudio
CP	35.5	47.5	17.0	1	Este estudio
OX	34.5	40.0	24.4	1	Este estudio
YC	33.7	49.3	16.6	1	Este estudio
YCE	44.2	37.5	18.3	1	Este estudio
YSC	37.3	49.1	13.5	1	Este estudio
YX	32.0	57.7	10.3	1	Este estudio
SFB	30.5	30.6	38.9	1	Este estudio
ATP S.A. ^a	22.6	38.8	35.2	2	Navarro y Amat, 1992
INVE ^b	17.9	31.0	-	3	McEvoy, <i>et al.</i> , 1995
Frank País Cuba ^c	34.1	42.9	20.3	4	Navarro <i>et. al.</i> , 1997
Gran Lago Salado EUA ^d	19.7	36.9	-	3	Coutteau y Mourente, 1997

1. Transesterificación directa HCL-Metanol (Lepage y Roy, 1984, 1986; Sato y Murata, 1988). 2. Transmetilación con hidróxido de potasio-metanol (Sato y Murata, 1988). 3. Homogenización en cloroformo-metanol. 4. Transmetilación con tolueno-metanol. ^aQuistes de *Artemia* bisexual, ^b Nauplios de *A. franciscana*, ^c Quistes decapsulados, ^d Nauplios de *A. franciscana*.

CAPITULO 4: DISCUSION

4.1 Estudios moleculares

En los dos fragmentos (16S ARNr y COI) de las poblaciones de *Artemia* estudiadas, fue observada una proporción mayor del contenido de T+A en relación con G+C (52.4% y 64.8% respectivamente). Esta es una propiedad característica de los genes mitocondriales de artrópodos (Simon *et al.*, 1994; Blouin *et al.*, 1998). El ADN mitocondrial en *Artemia* es más conservado en comparación con otras especies de invertebrados (Perez *et al.*, 1994). Aunque ambos genes presentan grados diferentes de evolución, esta comprobada su utilidad en evaluaciones de taxa divergentes (en los últimos 145 – 150 millones de años) y estudios filogenéticos (Hillis y Dixon, 1991; Kumazawa y Nishida, 1993), como es el caso de los anostracos cuyo origen esta considerado en el Cretácico inferior (~ 145 millones de años) (Fryer, 1987). Por esta razón, ambos genes son usados frecuentemente en estudios filogenéticos en crustáceos (Giribet *et al.*, 2001). Nuestros resultados presentan una baja diferenciación entre *A. franciscana* y las poblaciones de Cuba. En el análisis por separado de los dos genes se obtuvieron 8 haplotipos para el 16S ARNr y 5 haplotipos para el COI, lo que nos permite afirmar que el fragmento 16S ARNr puede ser más apropiado como marcador genético en los análisis de la diversidad genética de las poblaciones de América. Murugan *et al.* (2002), reportan que en comparaciones moleculares de diferentes formas de *Triops* de América, el fragmento 16S por si solo no era suficientemente informativo, lo que sugiere diferentes niveles en los cambios evolutivos de las regiones del ADN mitocondrial. Por otra parte los fragmentos empleados en el análisis no pudieron resolver de forma satisfactoria las diferencias entre las poblaciones de México (Fig. 3 y 4).

Los resultados filogenéticos para las 7 familias de anostracos analizados, indican una relación más cercana entre las especies de ambientes salinos entre si (Artemiidae y Parartemiidae) que con las de agua dulce (Thamnocephalidae, Streptocephalidae, Chirocephalidae, Polyartemiidae y Branchinectidae). Sin embargo, las especies de agua dulce muestran una separación en tres grupos: 1) Thamnocephalidae y Streptocephalidae, 2) Chirocephalidae y Polyartemiidae, y 3) Branchinectidae. Remigio y Hebert (2000), basados en el análisis filogenético de secuencias combinadas y simples de los genes 28S, 16S y COI, sugieren una división en dos grandes clados: Thamnocephalidae con Streptocephalidae y Chirocephalidae, Polyartemiidae y Branchinectidae, afirmando también que esta hipótesis contradice las filogenias propuestas para estas familias a partir de datos morfológicos, por lo que señalan la necesidad de encontrar características morfológicas que sean relevantes en los estudios filogenéticos.

Los análisis filogenéticos realizados en este estudio revelan dos clados bien definidos: uno compuesto por las poblaciones de México y otro por las poblaciones de Cuba con *A. franciscana* (Fig. 3). Esta aseveración se soporta también en el análisis de distancias de MS y las diferencias totales de nucleótidos de los fragmentos (Tabla 9). Torrentera y Dodson (1995) a partir de estudios morfológicos reportan la existencia de diferenciación morfológica entre las poblaciones de *Artemia* de Yucatán, de la Bahía de San Francisco y del Gran Lago Salado, y sugieren que estas poblaciones pueden representar una o más especies diferentes. De acuerdo a estos autores las poblaciones de Yucatán son genéticamente distintas y se encuentran separadas entre ellas por diferencias en su hábitat. Sin embargo, la cercanía entre las mismas hace difícil la solución de la diferenciación de especies entre ellas y debe ser un objetivo de investigaciones futuras.

La similitud encontrada entre las poblaciones de Cuba y *A. franciscana* confirma que esta fue la especie introducida en Cuba (Gelabert y Solís, 1994; Espinosa *et al.*, 1995). Las poblaciones de Cuba no presentan diferencias entre ellas, aunque se encuentran a una distancia de 600 Km, y poseen diferentes condiciones ambientales (Tabla 9). El Real (CGA) es una salina estacional, afectada por periodos de lluvias intensas, donde la población en edad reproductiva prácticamente desaparece como resultado de inundaciones de agua dulce. La población de *Artemia* en la salina Frank País (CM), es permanente, pero debido a la influencia del pez depredador *Ciprinodon variegatus*, está confinada a los estanques de cristalización donde la salinidad alcanza valores de 160 psu.

Para los crustáceos halofílicos, y en particular la *Artemia* que habita regiones bajo la influencia de condiciones ambientales extremas (especialmente la alta salinidad), se han obtenido evidencias de un aceleramiento en el ritmo de la evolución molecular (gen mitocondrial 16S ARNr y genes nucleares 18S ARNr y 28S ARNr) (Hebert *et al.*, 2002). Por otra parte Gajardo *et al.* (2002) afirma que *Artemia* posee un potencial evolutivo importante lo que se ha evidenciado en los resultados de Kappas *et al.* (2004) a partir de estudios de isoenzimas, al encontrar marcadas divergencias entre las poblaciones actuales de la Bahía de Vin Chau, (Vietnam), y la fuente de inoculación (*A. franciscana*, Bahía de San Francisco, EUA), después de solo nueve años de la introducción. De la misma forma se ha observado en esta población un incremento de la eficiencia reproductiva con respecto a *A. franciscana* a temperaturas mayores de 30°C indicando una adaptación térmica de la población. En cepas de *Artemia* de Oaxaca, se comprobó que temperaturas de hasta 39°C no afectan el proceso de eclosión de los nauplios, no así para las cepas de la Bahía de San

Francisco donde este proceso se afecta negativamente a partir de 37°C (Campos-Ramos *et al.*, 2006).

4.2 Estudios citogenéticos

La obtención de cromocentros a partir de quistes decapsulados se reporta por primera ocasión. El quiste de *Artemia* se encuentra detenido a nivel de gástrula tardía, compuesta de aproximadamente 4000 células (Nakanishi *et al.*, 1962). Esto permite observar células individuales después de aplicar la disociación del tejido embrionario con la solución de ácido acético. Esta técnica se llevó a cabo ya que no fue posible eclosionar los quistes para proseguir a la obtención de cromosomas y cromocentros de una forma ya reportada en la literatura. Ante la imposibilidad de obtener cromosomas, este estudio se tuvo que limitar a la cuantificación de cromocentros. Para validar la técnica, se probó inicialmente con quistes de *A. franciscana* de EUA, en donde de antemano se conocía el número de cromocentros por célula. El resultado fue la observación de alrededor de 17 cromocentros, lo cual coincidió para lo reportado en esta especie, y de ahí, se procedió a evaluar las cepas de *Artemia* consideradas en este estudio.

En América, solo se consideran tres especies zigogenéticas; *A. franciscana*, *A. monica* y *A. persimilis*. Se parte de la idea de que *A. franciscana* y *A. persimilis* tuvieron un origen independiente procedentes de hábitats del Mediterráneo, caracterizado por un evento de colonización de una población para cada especie, aisladas geográficamente, mientras que *A. monica* constituye una especie derivada de *A. franciscana* (Abreu-Grobois, 1987). Dado que las formas partenogenéticas, al igual que otras especies bisexuales del Viejo Mundo no presentan cromocentros (Abreu-Grobois y Beardmore, 1989), los bajos números

de cromocentros en *A. persimilis* son características similares a las especies del Viejo Mundo como *A. salina* (Barigozzi, 1980) y confirman la procedencia primitiva de esta especie. En este sentido, se podría considerar la posibilidad de que *A. franciscana* sea una forma derivada de *A. persimilis* ya habiendo colonizado el Nuevo Mundo. Sin embargo, no existen evidencias de la derivación de *A. franciscana* a partir de *A. persimilis*, y en la actualidad se consideran especies hermanas (Clark y Bowen, 1976). Ambas especies presentan una morfología muy similar y su diferencia principal radica que la primera presenta 42 cromosomas, mientras que la segunda 44 cromosomas (Piccinelli y Prosdocimi, 1968), aunado a la presencia de valores extremos del número de cromocentros (15-17 y 0-3 respectivamente) (Abreu-Grobois y Beardmore, 1989). Gajardo *et al.* (2001), argumentan que en forma preliminar, lograron obtener una cruce de *A. franciscana* con *A. persimilis*, en cuya descendencia se observaron valores intermedios del número de cromocentros. Bowen (1964), logró solo una cruce exitosa entre estas dos especies y posteriormente, Clark y Bowen (1976), fallaron en numerosos intentos. Si bien es posible una cruce exitosa entre estas dos especies, el número de cromocentros observado sería muy cercano al de *A. franciscana*, dado que en el cigoto, F₁ estaría compuesto de cromosomas con masas de heterocromatina (*A. franciscana*), homólogos a cromosomas sin heterocromatina (*A. persimilis*). Fenotípicamente, en las células observadas se apreciarían alrededor de 17 cromocentros. Tendría que haber una segunda generación procedente de la F₁, en donde sí se encontraría un patrón diverso, debido a la segregación al azar de los cromosomas durante la primera división meiótica. Lo anterior se comprueba en el trabajo de Morales (2005), en donde se cruzaron dos cepas de México provenientes de Pichilingue, BCS y Yavaros, Sonora, con 12 y 4 cromocentros respectivamente. La F₁ presentó un número de

cromocentros similar al de Pichilingue, tal y como se esperaría de la fusión de dos gametos procedentes de dos formas distintas, y no de la manera equivocada, como lo aseveran Gajardo *et al.* (2001). Lo más revelante aquí, es que a diferencia de *A. franciscana* que colonizó todo el continente americano, *A. persimilis* se mantuvo por alguna razón aislada en el cono sur.

Gajardo *et al.*, (2001), proponen un patrón de distribución de cromocentros de *A. franciscana* en América, en donde se observa una disminución latitudinal continua de norte a sur, hasta el Ecuador en el hemisferio norte, representada por valores entre 13 y un máximo de 17 cromocentros en latitudes de norteamérica, incluyendo el norte de México, Estados Unidos y Canadá. Valores intermedios entre 7 y 12 cromocentros, representados por Centroamérica en regiones tropicales como Perú, Ecuador y Venezuela. Finalmente un valor de cinco cromocentros, representado por solo una población ecuatoriana. Continuando con la distribución de cromocentros, *A. franciscana* tiende a aumentar a partir del Ecuador hasta La Patagonia (Hemisferio Sur), representadas por una cepa de Argentina y una de Chile, ambas con 13 cromocentros y dos cepas de Brasil con 15 y 17 cromocentros respectivamente. Adicionalmente incluyendo la especie *A. persimilis* en Argentina que presenta un rango de 0 a 3 cromocentros. Los autores sugieren que la frecuencia de cromocentros latitudinal, así como las características de los ecosistemas que *Artemia* colonizó latitudinalmente, requieren de más investigación.

Cabe señalar que dicho patrón carece de evidencia sustancial, principalmente en el hemisferio sur. Primeramente, se presentan varias cepas de Brasil, en donde es bien sabida la introducción de quistes procedentes de EUA con fines de explotación de *Artemia* (Vos y De la Rosa, 1980), con números de cromocentros similares a los de norteamérica. Segundo,

solamente presenta evidencia de una cepa de Chile (Salar de Atacama), que inicialmente se había pensado que era *A. persimilis*, con 13 cromocentros, en donde es posible pensar de igual manera de que se trata de una introducción hecha por el hombre. Fuera de estos 3 puntos geográficos en Sudamérica, no existe más evidencia de biodiversidad en *Artemia*. Por otro lado, el patrón latitudinal de disminución de cromocentros de norte a sur en el hemisferio norte, excluye la población de Yavaros, Sonora, México, la cual presenta de 3 a 4 cromocentros, en donde de acuerdo al patrón de disminución de norte a sur esta población debería de estar representada en América Central o el Ecuador y no en norteamérica.

De todas maneras el patrón latitudinal es evidente, con algunas excepciones, y nos lleva a pensar en diferentes escenarios evolutivos enfocándonos a *A. franciscana*. La primera hipótesis, señalaría a ambas especies colonizando el cono sur de América, y de ahí, *A. franciscana* comenzó procesos de dispersión hasta Norteamérica, con la ayuda de interrelaciones de cadenas tróficas con animales depredadores de esta, como aves y reptiles, ventajas que posiblemente no existieron en la actualmente aislada *A. persimilis* en Argentina. El origen de *A. franciscana* en el cono sur de América, no es muy convincente, debido a que, como ya se ha mencionado anteriormente, se esperarían encontrar un patrón abundante de poblaciones de esta especie en el cono sur, las cuales no existen. La segunda hipótesis que se puede plantear en este estudio, es que el origen de *A. franciscana* se remite a mesoamérica, la cual anula la hipótesis de origen en el cono sur. Precisamente la mayor diversidad desde el punto de vista molecular (mitocondrial) y de cromocentros, reside aquí. Parece mucho más plausible que a partir de ecosistemas que alcanzaron una colonización exitosa, conllevando a una alta diversidad, se hayan establecidos procesos de dispersión hacia ambos hemisferios. De aquí, se podría pensar que el nombre científico de *Artemia* en

América tendría que tener una connotación mesoamericana, cuya divergencia genética por ADN mitocondrial y número de cromocentros, derivó a la llamada *A. franciscana*.

En este estudio, las poblaciones del sur de México de Oaxaca, Campeche y Yucatán presentaron valores entre 10 y 14 cromocentros. Aunados estos datos a la literatura existente, conlleva a que las poblaciones de *Artemia* de Yucatán, presentan una alta diversidad de cromocentros con un rango de 3.8 hasta 14 cromocentros. Particularmente el estado de Yucatán, se puede considerar como el de más alta diversidad de *Artemia* en América, y pudieran ser el punto de origen de esta *Artemia* mesoamericana. Por otra parte, Yucatán como punto recurrente en la migración de aves procedentes de ambas costas de EUA y Canadá, facilitaría la dispersión de quistes hacia diferentes zonas. Clark y Bowen (1976), señalan que el genotipo *A. franciscana* ha sido diseminado en América, mediante el acarreo de quistes por pájaros ya sea en su tracto digestivo o en sus plumas, o a través de introducciones comerciales. A partir de sus resultados, en cruzamientos fértiles de 14 poblaciones de *Artemia* de Estados Unidos, Canadá y México con *A. franciscana*, se evidencia que esta especie ha colonizado de una forma exitosa diferentes ecosistemas mesoamericanos y norteamericanos. Torrentera y Abreu-Grobois (2002), encontraron que las poblaciones de *Artemia* de Yucatán, presentan importantes diferencias citogenéticas cuando son comparadas con los valores típicos para *A. franciscana* de EUA, en el número de cromosomas ($2n = 42$) y cromocentros (15 a 19) (Gran Lago Salado y Bahía de San Francisco). Las poblaciones de Celestún, Chuburna, Xtampú y Las Coloradas tienen números diploides de cromosomas de 40, 44 y 48 y un número medio de cromocentros de 3.8, 4.4, 8.6 y 9.9 respectivamente. Debido a sus características de poliploidia, tipificadas exclusivamente a poblaciones partenogénicas del Viejo Mundo, y adicionalmente por su

número bajo de cromocentros, queda por analizar si dentro de estas poblaciones existe *Artemia* zigogenética y partenogenética nativa del sureste de México, lo cual daría evidencia del origen de ambas formas de reproducción procedentes del Viejo Mundo. Se podría pensar que el origen de la población de Yavaros, con solo 3 a 4 cromocentros (Abreu-Grobois y Breadmore, 1989, Morales, 2005) se derivó de alguna población zigogenética de Yucatán, durante una migración de aves hacia la costa oeste de EUA. Del mismo modo, es posible considerar que la *Artemia* procedente de Yucatán colonizó el Caribe y la costa oriental de Sudamérica (según datos de cromocentros de Abreu-Grobois y Breadmore, 1989; Gajardo *et al.*, 2001) a través de migraciones de aves, o fenómenos meteorológicos, dando lugar a las poblaciones naturales hoy existentes de Puerto Rico con un rango de 5 a 7 cromocentros, Antillas Holandesas con 7 a 14 cromocentros, Bahamas con 11 a 12 cromocentros y en el continente como la población de Puerto Araya y Tucacas, en Venezuela con 7 a 13 cromocentros, valores que se encuentran bien representados en las poblaciones de Yucatán. La dispersión de quistes a través de animales terrestres, o a través de ríos como el Grijalba-Usumacinta del sureste al suroeste de México, hacia la costa Pacífico y a lo largo de la costa occidental del México y la península de California, incluyendo Pichilingue (12 cromocentros) y la Bahía de San Francisco, y de esta a Canadá. Estas últimas en donde se tipifica un número máximo de cromocentros, la cual incluye *A. monica* (16 cromocentros). Igualmente hacia el sur de México, la dispersión de quistes procedentes de Yucatán, pudieron haber colonizado la costa occidental de Chiapas (aún no estudiada), Centroamérica (aún no estudiada) y Sudamérica, como Colombia, Perú y Ecuador con rangos de 7 a 8 cromocentros, todos representados en poblaciones de Yucatán. Bajo estas premisas, se podría plantear que *A. persimilis* deriva de una forma original

mesoamericana con un bajo número de cromocentros, que quedó aislada en La Pampa, Argentina y en donde ocurrió una fisión cromosómica de un bivalente meiótico que dió lugar a un par adicional de cromosomas.

De acuerdo a lo anterior, la zona del Ecuador no sería el punto de partida (origen) hacia ambos hemisferios (Gajardo *et al.*, 2001), sino más bien, Mesoamérica. En este sentido, la acumulación latitudinal de ADN repetitivo observado como cromocentros, ocurrió de Mesoamérica hacia Norteamérica y no de forma inversa, extendiéndose además hacia el Ecuador y Sudamérica. En resumen, es posible plantear, que la colonización de América por esta *Artemia* mesoamericana, conllevó a una divergencia genética a partir del aislamiento geográfico, inicialmente propagado por dispersión animal, provocando cambios estructurales del genoma (cromocentros) y mutaciones a nivel molecular (ADN mitocondrial).

En especies como las del género *Artemia*, con un amplio rango de distribución a nivel mundial, los procesos adaptativos a las variaciones geográficas y ambientales implican cambios fisiológicos y morfológicos importantes que deben también influir sobre indicadores genéticos como es el número de cromosomas y cromocentros. En este último, se piensa que el ADN repetitivo de la familia *Alu I*, pudiera estar relacionado con la organización estructural nuclear y ser un elemento dinámico de especiación (Gajardo *et al.*, 2001). Remigio y Hebert (2000), menciona los efectos de condiciones ambientales extremas como la alta salinidad pueden ejercer modificaciones sobre la síntesis de proteínas a partir de afectaciones en la reparación, la replicación y la fidelidad del ADN. Las variaciones en el número de cromocentros podrían ser el resultado de la dispersión y del proceso de colonización, a manera de contrarrestar las presiones de selección natural, como

son la concentración de sal, radiación solar y altas temperaturas, como factores principales adaptativos de una especie en un ambiente hipersalino, como es el caso de *Artemia*. De esta forma, es de esperar que el incremento en el número de cromocentros sea una respuesta de una determinada subpoblación a presiones fuertes de selección natural, mientras que aquellas poblaciones en hábitats “estables” no tendrán modificaciones tan evidentes, como Yavaros, aquellas de Yucatán e inclusive, posiblemente *A. persimilis*.

Las poblaciones de Cuba, podrían ser un ejemplo de aislamiento y divergencia nuclear. Como ya se mencionó, las poblaciones de Cuba no presentan diferencias entre ellas a un nivel molecular mitocondrial, ni tampoco con su antecesora procedente de EUA. Sin embargo, fueron muy distintas en su número de cromocentros, lo cual se considera un resultado no esperado, ya que ambas poblaciones se sometieron a la introducción original de Estados Unidos. Por otra parte, aunque las dos poblaciones se encuentran a una distancia de 600 Km entre sí, poseen diferentes condiciones ambientales. El Real (CGA), es una salina estacional, afectada por periodos de lluvias intensas, donde la población en edad reproductiva prácticamente desaparece como resultado de inundaciones de agua dulce, lo cual sugiere acciones más fuertes de selección. En contraste, la población de *Artemia* en la salina Frank Pais (CM) es permanente, confinada a los estanques de cristalización donde la salinidad alcanza valores de 160 psu. Después de casi 3 décadas de la introducción original, ambas poblaciones son morfológicamente distintas en cuanto a sus proporciones corporales a su antecesora de Estados Unidos (ver discusión de morfología). Si tomamos en consideración la hipótesis, de que los incrementos en el número de cromocentros se presentan en lugares en donde se encontró una mayor presión de selección natural, el resultado es que la población actual de la salina el Real Camagüey, Cuba, incrementó de 17

a más de 20 cromocentros en tan solo 3 décadas, aunado a una mayor densidad y distribución de heterocromatina (Fig. 5b), cuando se compara con cualquier otra población estudiada. Este número de cromocentros encontrado en esta población se reporta por primera vez. No se han encontrado referencias, donde se reporte un número tan elevado de cromocentros, lo que hace difícil la interpretación y discusión de este resultado, y por ende requerirá de investigaciones futuras.

4.3 Estudios morfológicos

Entre las poblaciones estudiadas se observan diferencias en el diámetro de los quistes hidratados tanto entre las poblaciones del Caribe y América del Norte como entre las propias poblaciones de Cuba, Puerto Rico y República Dominicana. Incluso, entre dos cosechas diferentes de quistes en la salina Frank País (años 2000 y 2003) se encuentran variaciones en el diámetro de los quistes, estas se encuentran influenciadas por diferentes condiciones físicas y químicas sobre las hembras en el momento de la deposición de los huevos (Mayer, 2002, Vanhaecke y Sorgeloos, 1980).

De acuerdo a los resultados encontrados en nuestros estudios, así como los presentados por Vanhaecke y Sorgeloos (1980), el grosor del corion es menor en poblaciones que se encuentran en áreas más al norte como la Bahía de San Francisco (7.05–8.30 μm) y el Gran Lago Salado (4.7-5.45 μm) en Estados Unidos. Las altas temperaturas y la intensa radiación solar, propia de las zonas tropicales donde están situados Cuba, Puerto Rico, República Dominicana y Venezuela, hacen necesaria una mayor protección de los quistes. Por otra parte, las localidades donde se encuentran las poblaciones de *Artemia* en los países de la región tropical se caracterizan por su baja profundidad, intensa evaporación

y permanentes variaciones ambientales, mientras que las salinas de la Bahía de San Francisco y el Gran Lago Salado son áreas ecológicas de gran tamaño (16200 y 440297 ha, respectivamente) lo que los convierte en ambientes relativamente estables sin dejar de ser zonas de condiciones extremas.

El tamaño de quistes, y en particular en nauplios que presentan las poblaciones de Cuba, se encuentra dentro de los rangos observados para otras cepas como la de Bahía de San Francisco, utilizadas comúnmente en la acuicultura, por lo que tienen las características necesarias, para ser empleados para este fin. Los nauplios son empleados mayormente en la larvicultura de peces y camarones, los que presentan un requerimiento de presas de tamaño pequeño en las etapas tempranas de vida.

Las diferencias estadísticamente significativas encontradas para la mayoría de las mediciones morfológicas entre los organismos de cada sexo de ambas salinas (Tabla 12), se encuentran afectadas por las condiciones ambientales particulares en cada una de ellas, en particular la salinidad y el régimen hidrológico. Amat (1980) y Gajardo *et al.*, (1998), han documentado la variación de aspectos morfológicos en dependencia de las condiciones ambientales y en particular la salinidad. La salina Frank País (CM) es una salina comercial permanente con una precipitación anual de 450 mm, mientras que la salina El Real es afectada cada año por la estación de lluvias, que tiene un impacto directo sobre la salinidad, la temperatura y el flujo de nutrientes (Menú, 1988), por lo que es probable que estas variaciones sean el resultado también de las diferencias ambientales entre ambas localidades.

Hontoria y Amat (1992a y b), introdujeron por primera vez el uso del análisis multivariado discriminante de indicadores morfológicos, para estudiar poblaciones de

España, Italia y el continente Americano. En el trabajo relacionado con la *Artemia* de América clasifican 25 poblaciones en 4 grupos principales Argentina, costa Pacífica, el Caribe y Norte América estableciendo que *A. franciscana* y *A. persimilis* son especies divergentes. Las poblaciones del Caribe, estaban más relacionadas entre si que con las otras poblaciones estudiadas excepto las poblaciones de Yucatán (México), Manaure (Colombia), y Bahía Salinas (Puerto Rico). Estos resultados demostraron que es posible discriminar entre poblaciones cercanas geográficamente o con ambientes similares. Camargo (2003), relacionó las poblaciones de la costa del Caribe colombiano con *Artemia* de la Bahía de San Francisco con resultados que sitúan a estas poblaciones dentro del grupo del Caribe, separadas de *A. franciscana* de Norteamérica. La inclusión de las poblaciones de Cuba, en el grupo de especies con un origen conocido a partir de *A. franciscana* de la Bahía de San Francisco, como Br (Macau, Brasil) (Vos y De la Rosa, 1980; Gajardo *et al.*, 1995; Gajardo *et al.*, 1998) y Chil 1 (Salar de Atacama, Chile) (Gajardo y Beardmore 1993), confirman su pertenencia a esta especie y su procedencia a partir de introducciones intencionales. Sin embargo, dentro del mismo grupo de poblaciones relacionadas con *A. franciscana* se observa la separación en grupos, el integrado por las poblaciones de Brasil y Cuba, presenta similar tiempo de inoculación (≈ 30 años, 1977 y 1978 respectivamente) y estas diferencias indican una variación de la morfología de estas a partir de la adaptación a las condiciones ambientales locales, distintas a las del lugar de la cepa de origen. Este aspecto es corroborado, a partir de las diferencias moleculares encontradas en este estudio de hasta 7 bp en ambas poblaciones de Cuba con *A. franciscana* y en el incremento del número medio de cromocentros (> 20) observado para la población de la salina El Real (CGA).

4.4 Perfil de ácidos grasos

Los resultados obtenidos sugieren que la composición de ácidos grasos, y especialmente la de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en quistes de *Artemia*, puede estar atribuida a una distribución latitudinal de las poblaciones que determina en parte las condiciones ambientales de cada localidad. La cepa SFB, proveniente de un área templada mostró un predominio de este grupo sobre todas las cepas de estudio, encontrándose también diferencias significativas ($P < 0.05$) del resto de las muestras con un origen tropical, con una concentración superior de los ácidos grasos 18:2 n5 (10, 13-octadecadienoico), 18:3 n3 (octadecatrienoico) y 18:4 n3 (6, 9, 12, 15-octadecatetraenoico) (Tablas 14 y 15). Se encontró también un alto contenido de PUFA en esta muestra (65.3 $\mu\text{g}/\text{mg dw}$) (38.9%) en comparación con las procedentes de zonas tropicales que mostraron concentraciones entre 14.3 y 40.3 $\mu\text{g}/\text{mg dw}$ coincidiendo con Narciso y Morais (2001) que reportan un alto contenido de PUFA, 102.8 $\mu\text{g}/\text{mg dw}$ en nauplios de *Artemia franciscana* de otro sitio de clima templado el Gran Lago Salado en Utah, EUA.

La variabilidad en la composición de ácidos grasos de quistes y nauplios provenientes de áreas salinas, están probablemente correlacionados con los cambios en las condiciones ambientales de acuerdo a la situación geográfica. En este sentido, las variaciones de la temperatura, la salinidad y el oxígeno disuelto, afectan la cantidad y la calidad de los florecimientos de algas y de esta forma la alimentación de la *Artemia*, lo que se refleja en sus características nutricionales (Carpelan, 1957; Haynes y Hammer, 1978; Torrentera y Dodson, 2004). Mura *et al.* (1997, 1998, 2000), concluyó que las condiciones particulares del hábitat como la temperatura y los factores biológicos como el alimento

(cantidad y calidad), estadio de desarrollo y el sexo tienen un impacto directo en el perfil de ácidos grasos en anostracos de agua dulce.

De acuerdo al régimen de sus aguas, las salinas tropicales estudiadas pueden dividirse en dos tipos: las que presentan agua en sus estanques durante todo el año, como El Real (CGA), Frank País (CM), Campeche (CP), Oaxaca (OX), Chuburna (YC) y San Crisanto (YSC) y las que se secan periódicamente como Celestún (YCE) y Xtampú (YX). Las muestras de Cuba (CGA y CM), provenientes de dos diferentes tipos de cuerpos de agua presentan diferencias significativas ($P < 0.05$) en las concentraciones de 6 ácidos grasos (16:0, 16:1 n7, 18:2 n6, 20:2 n6, 20:4 n6 y 20:5 n3) (Tabla 14). Estas salinas aunque se localizan a una distancia geográfica relativamente pequeña presentan características ambientales diferentes.

La salina Frank País (CM) es una salina permanente caracterizada por una precipitación anual inferior a 450 mm, mientras que la salina El Real (CGA) es afectada cada año por la temporada de lluvias que tiene un impacto directo en la temperatura, la salinidad y el flujo de nutrientes (Menú, 1988). Navarro *et al.* (1997) reportó un contenido de 4.9% (en nauplios) y 8.1% (en quistes decapsulados) del ácido graso 20:5 n3 (ácido eicosapentaenoico) en muestras de la salina Frank País pero no encontró 22:6 n3 (ácido docosahexaenoico).

Entre las muestras de México, las de Campeche (CP) presentan las mayores diferencias en los ácidos grasos iso14:0, 15:0, iso15:0, 16:1 n7, iso16:0, y 16:1 n5 (Tabla 12). Sin embargo a partir de su perfil de ácidos grasos está más cercana a las cepas de Oaxaca (OX), Chuburna (YC) y San Crisanto (YSC) las cuales provienen también de cuerpos de agua permanentes o semipermanentes que no se caracterizan por condiciones

ambientales extremas (Torrentera y Dodson, 2004). Mura *et al.* (1999, 2000), encontró cantidades considerables de 20:5 n3 y 22:6 n3 en quistes del anostraco de agua dulce *Chirocephalus ruffoi* (Cottarelli y Mura, 1984), y *C. kerkyrensis* (Pesta, 1936), concluyendo que individuos alimentados con diferentes dietas y procedentes de hábitat disímiles se caracterizan por un desigual perfil de ácidos grasos. En las cepas estudiadas las concentraciones de 20:5 n3 son bajas, en particular en la cepa de Celestún (YCE).

Leger y colaboradores (1986) y Mura y Fancello (2005), reportan que los ácidos grasos 16:0, 16:1 n7, 18:1 n9, 18:2 n6, 18:3 n3 y 20:5 n3 conforman hasta el 80% del perfil de ácidos grasos en la mayoría de las cepas de *Artemia*. En nuestras muestras estos ácidos grasos variaron entre el 57 y el 87% del contenido total de ácidos grasos, mientras que en algunos anostracos de agua dulce (*Branchipus*, *Chirocephalus* y *Tanymastix*) este contenido puede variar entre 18.9% y 59.3 % (Mura y Fancello, 2005).

La presencia de ácidos grasos ramificados *iso* y *anteiso* en *Artemia* ha sido reportada como consecuencia de la ingestión de bacterias halofílicas, las cuales constituyen la población microbiana predominante en las últimas etapas de los sistemas de producción de sal (Suutari y Laakso, 1994). Sin embargo, el perfil de ácidos grasos de bacterias y algas marinas, así como el contenido de diferentes compuestos, puede variar de forma importante en dependencia de la especie, la estación del año y el tipo de nutrientes presentes (Dunstan *et al.*, 1993; Intriago y Jones, 1993). La producción de quistes y nauplios con un alto contenido de n3 PUFA parece ser limitada a biotopos naturales donde la toma de agua proviene de zonas de manglares, con una presencia dominante de bacterias halofílicas púrpuras y cianobacterias, que son el principal componente de la dieta de la *Artemia* (Sorgeloos *et al.*, 1986).

Aunque en las muestras se encontraron los componentes de mayor interés para la acuicultura como el C20:5 n3 (ácido eicosapentaenoico), su concentración fue baja (0.23 - 4.48 µg/mg dw) (0.3 a 3.8% del total de ácidos grasos). Las poblaciones de CM, OX, y SFB presentaron las mayores concentraciones de este compuesto con 4.06, 4.28 y 4.48 µg/mg dw respectivamente (2.2, 3.8 y 2.7% del total de ácidos grasos). Usualmente el contenido de este ácido graso en *Artemia* es bajo, excepto en cepas como las de Chaplin Lake (Canadá) y de la Bahía de San Francisco (EUA) (Leger *et al.*, 1986). Quynh *et al.* (1988) reportaron altos contenidos (10%) de C20:5 n3 en *Artemia* inoculada en la salina de la Bahía de Cam Ranh, (Vietnam).

En la acuicultura, las deficiencias nutricionales pueden ser resueltas con el uso de las técnicas de enriquecimiento desarrolladas por Watanabe *et al.* (1982, 1983), las cuales se emplean en la actualidad en la acuicultura, para la manipulación del perfil nutricional de *Artemia* y rotíferos (Estévez y Kanazawa, 1996; McEvoy *et al.*, 1996; Tocher *et al.*, 1997). De las 3 poblaciones que presentaron el mayor contenido de 20:5 n3 (CM, OX y SFB), solo OX presenta valores entre 3 y 4% del contenido total de ácidos grasos, de esta forma se puede asignar entre las llamadas de “tipo marino” según la clasificación de Watanabe *et al.* (1978). Aunque es de esperar la influencia ejercida por el alimento natural en su perfil de ácidos grasos, el alto contenido de C20:5 n3 en la cepa OX puede ser un indicador de la existencia de un componente genético que favorece la acumulación de ciertos compuestos, lo que debe ser investigado en el futuro. Navarro y Amat (1992) sugieren que además de la influencia fenotípica del alimento vivo en el proceso de transferencia de los ácidos grasos,

la influencia genotípica y la capacidad de bioconversión en *Artemia* deben ser también estudiadas.

4.5. Consideraciones generales

La *Artemia*, es un organismo que presenta una gran diversidad desde el punto de vista genético, en particular en América, es posible encontrar variaciones importantes en indicadores moleculares, citogenéticos y morfológicos en localidades relativamente cercanas. Por otra parte, es posible localizarla en un elevado número de ecosistemas que aunque tienen en común que son acuatorios hipersalinos, con condiciones extremas de temperatura y otros factores abióticos, presentan importantes diferencias entre si. Esto nos muestra, la capacidad de este organismo a adaptarse a condiciones variables que se refleja a niveles moleculares (variaciones en las secuencias de las bases), celulares (variaciones en el número de cromocentros) y macroestructurales (cambios en la estructura y proporciones corporales, variaciones en el tamaño y características de los quistes), lo que se ha evidenciado en los resultados de la presente tesis.

De la misma forma, es difícil establecer un patrón con referencia a su perfil de ácidos grasos, el cual está influenciado por aspectos geográficos que introducen variaciones en todo el proceso, hasta llegar a la fuente directa de alimento y de esta forma a su reflejo en la progenie. Sin embargo, aspectos relacionados con la genética del mismo, son aún desconocidos, en primer lugar si es cierta o no esta influencia genética y en caso positivo sus regularidades. También, es todavía un espacio por explorar el relacionado con los niveles y la capacidad de bioconversión de diferentes ácidos grasos, pues aunque se estima que existe, no se conocen sus mecanismos.

La importancia de *Artemia* para la acuicultura, es cada vez mayor, pues la diversificación y el incremento de los cultivos en todo el mundo, requieren cantidades superiores de este producto y demandan de cualidades especiales como mejores perfiles nutricionales, tamaños particulares de quistes y nauplios, y sincronía en los procesos de eclosión.

Esta creciente demanda de quistes, ha provocado el desarrollo de una tendencia a la introducción de este organismo en lugares donde antes no existía, muchas veces desconociendo si una especie similar o endémica estaba presente, de esta forma ya hoy es posible encontrar *Artemia* en más de 600 localidades de la Tierra (Triantaphylidis y Sorgeloos, 1998, Van Stapen, 2002). La particular plasticidad genética de *A. franciscana*, ha provocado el desplazamiento de especies locales como *A. persimilis* en el Salar de Atacama (Chile) (Gajardo *et al.*, 2001), o su presencia reciente en salares de Europa (Amat *et al.*, 2005). Este proceso, llevara al hallazgo de “nuevas especies” de *Artemia*, en disímiles lugares en un periodo relativamente corto, de los cuales ya se encuentran señales en los resultados de este trabajo con las poblaciones de México y Cuba (Tizol *et al.*, 2006), así como los encontrados en la bahía de Vin Chau (Vietnam) (Kappas *et al.*, 2004). Por ello, es de particular importancia a través de un esfuerzo común, la actualización de las fuentes existentes de esta especie y la conservación de un genofondo de referencia para el futuro. El presente documento realiza una contribución a esta actualización a través del análisis de poblaciones del Caribe y sur de México.

CAPITULO 5: CONCLUSIONES

- A partir de los resultados filogenéticos moleculares, citogenéticos y morfológicos es posible afirmar que las poblaciones de *Artemia* de Cuba y México corresponden a la superspecie *A. franciscana*.
- Las diferencias filogenéticas, citogenéticas y morfológicas entre las poblaciones de México soportan el concepto señalado por Torrentera y Dodson (1995), que las poblaciones del sur de México pueden representar diferentes especies. Sin embargo, la cercanía entre las mismas hace difícil la solución de la diferenciación de especies entre ellas y debe ser objetivo de investigaciones futuras.
- Se sugiere la hipótesis de que el origen de *A. franciscana* en el continente americano se remite a Mesoamérica, la cual se contrapone a la hipótesis de su origen en el cono sur planteada por otros autores.
- Las poblaciones de las salinas Frank País y El Real presentan diferencias significativas en sus proporciones morfológicas las cuales pueden estar dadas por las diferencias en las condiciones ambientales de las dos localidades.
- Los nauplios provenientes de las poblaciones de Cuba presentan un largo entre 401 y 421 μm se encuentra dentro de los rangos observados para otras cepas utilizadas en la acuicultura por lo que tienen las características necesarias para ser empleados para este fin.
- El método de transesterificación directa en quistes decapsulados ofrece resultados satisfactorios en la obtención del perfil de ácidos grasos de *Artemia*.
- De acuerdo a su perfil de ácidos grasos las cepas de *Artemia* evaluadas en este estudio son del tipo dulceacuícola, excepto la muestra de Oaxaca que es del tipo marino, y presentan potencialidades para su uso en acuicultura.

- Las cepas de Cuba, México y *A. franciscana* (EUA) presentan perfiles cualitativos de ácidos grasos similares aunque difieren en sus concentraciones las cuales probablemente dependen de factores ambientales.

CAPITULO 6: REFERENCIAS

- Abreu-Grobois, F.A., Beardmore, J.A., 1980. International Study on *Artemia* II. Genetic characterization of *Artemia* populations: an electrophoretic approach. En: *The brine shrimp Artemia. I: Morphology, Genetics, Radiobiology, Toxicology*. Sorgeloos, P., Bengtson, D.A., Declair, W., Jaspers, E. (eds). pp. 133-146. Universa press, Wetteren.
- Abreu-Grobois, F.A., Beardmore, J.A., 1982. Genetic differentiation of the brine shrimp *Artemia*. En: *Mechanism of speciation*, Barigozzi, C. (ed) pp. 345-376. Alan R. Liss, New York.
- Abreu-Grobois, F.A., 1987. A review of the genetics of *Artemia*. En: *Artemia Research and its Applications*. Sorgeloos, P., Bengtson, D.A., Declair, W., Jaspers, E. (eds), Vol. 1, pp. 61–99. Universa Press, Wetteren.
- Abreu-Grobois, F.A., Beardmore, J.A., 1989. Chromosomes and chromocenters in the genus *Artemia*. *Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnologia*, 16, 1-15.
- Amat, D.F., 1980. Differentiation in *Artemia* strains from Spain. En: *The brine shrimp Artemia*. Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O., Jaspers, E. (eds). Vol. 1, pp. 19-39. Universa Press, Wetteren, Belgium.
- Amat, F., Hontoria, F., Ruiz, O., Green, A.J., Sánchez, M.I., Figuerola, J., Hortas, F., 2005. The American brine shrimp as an exotic invasive species in the western Mediterranean. *Biological Invasions*, 7, 37-47.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., 1999. Short Protocols in Molecular Biology. pp. 24-27. John Wiley & Sons.
- Avise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lambs, T., Neigel, J.E., Reeb, C.A., Saunders, N.C., 1987. Intraspecific phylogeography, the mitochondrial DNA brogde between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18, 489-522.

- Badaracco, G., Baratelli, L., Ginelli, E., Meneveri, R., 1987. Variations in repetitive DNA and heterochromatin in the genus *Artemia*. *Chromosoma*, 95, 71-75.
- Badaracco, G., Tubiello, G., Benfante, R., Cotello, F., Maiorano, D., Landsberger, N., 1991. Highly repetitive DNA sequence in parthenogenetic *Artemia*. *Journal of Molecular Evolution*, 32, 31-36.
- Badaracco, G., Vellorí, M., Landsberger, N., 1995. Phylogenetic study of bisexual *Artemia* using random amplified polymorphic DNA. *Journal of Molecular Evolution*, 41, 150-154.
- Barigozzi, C., 1980. Genus *Artemia*: Problems of systematics. En: *The brine shrimp Artemia*. Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O. y Jaspers, E. (eds) Vol. 1, 147-153. Universa Press, Wetteren.
- Barigozzi, C., Baratelli, L., 1981. Presence and absence of chromocenters in populations of *Artemia*. *Atti della Accademia Nazionale dei Lincei*, 1, pp: 119-125.
- Barigozzi, C., Badaracco, G., Plevani, P., Baratelli, L., 1984. Heterochromatin in the genus *Artemia*. *Chromosoma*, 90, 332-337.
- Barigozzi, C., Valsanini, P., Ginelli, B., Badaracco, G., 1987. Further data on repetitive DNA and speciation in *Artemia*. En: *Artemia Research and its Applications*. Sorgeloos, P., Bengston, D.A., Declair, W., Jaspers, E. (eds), Vol. 1, pp. 103-105. Universa Press, Wetteren.
- Barnung, T. N., Grahl-Nielsen O., 1987. The fatty acids profile in cod (*Gadus morhua*) eggs and larvae: Developmental variations and responses to oil pollution. *Sarsia*, 72, 412-417.
- Bligh, E. G., Dyer, W. J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37, 911-917.

- Blouin, M.S., Yowell, C.A., Courtney, C.H., Dame, J.B., 1998. Substitution bias, rapid saturation and the use of mtDNA for nematode systematics. *Molecular Biology and Evolution*, 15, 1719–1727.
- Bossier, P., Xiaomei, W., Catania, F., Doods, S., Van Stappen, G., Naessens, E., Sorgeloos, P., 2004. An RFLP database for authentication of commercial cyst samples of the *Artemia* spp. (International Study on *Artemia* LXX). *Aquaculture*, 231, 93–112.
- Bowen, S.T., 1964. The genetics of *Artemia salina*. Part 4. Hybridization of wild populations with mutant stocks. *Biological Bulletin*, 126, 333-344.
- Bowen, T., Fogarino, E., Hitchner, K., Dana, G., Chow, V., Buoncristiani, M., Carl, J., 1985. Ecological isolation in *Artemia*: population differences in tolerance of anion concentrations. *Journal of Crustacean Biology*, 5, 106-129.
- Bowen, S.T., Bayliss, F.T., Vogler, D., Spicer, G.S., 2001. Phylogeny of the brine shrimp genus *Artemia* inferred by mitochondrial 16S ribosomal RNA sequences. *No publicado*, AF202754; AF202766.
- Browne, R., Bowen, T., 1991. Taxonomy and population genetics of *Artemia*. En: *Artemia Biology*. Browne R., Sorgeloos, P., Trotman, C. (eds). pp. 221-235. CRC Press, Boca Raton Ann Arbor Boston, USA.
- Brown, T.A., 1999. Genomes. BIOS Scientific Publisher Ltd. UK. Pp. 115-140.
- Cabot, E., 1998. The Eyeball Sequence Editor. Version 3.2.
- Chair, M., Nelis, J., Leger, P., Sorgeloos, P., De-Leenheer A.P., 1996. Accumulation of trimethoprim, sulfamethoxazole and N-acetylsulfamethoxazole in fish and shrimp fed medicated *Artemia franciscana*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40, 1649 – 1652.

- Calihueque, N., Gajardo, G., 1996. Chromosomal analysis in *Artemia* populations from South America. *Cytobios*, 88, 141–148.
- Clark, L.S., Bowen, S.T., 1976. The genetics of *Artemia salina*. VII. Reproductive isolation. *The Journal of Heredity*, 67, 385-388.
- Camargo, W., Sorgeloos, P., Bossier, P., 2002. Preliminary genetic data on some Caribbean *Artemia franciscana* strains based on RAPD's. *Hydrobiologia*, 468, 245–249.
- Camargo, W., Ely, J., Sorgeloos, P., 2003. Morphometric characterization of thalassohaline *Artemia franciscana* populations from the Colombian Caribbean. *Journal of Biogeography*, 30, 697-702.
- Campos-Ramos, R., Maeda-Martinez, A.M., Obregon-Barboza, H., Murugan G., Guerrero-Tortolero, D.A., Monsalvo-Spencer, P., 2003. Mixture of parthenogenetic and zygogenetic brine shrimp *Artemia* (Branchiopoda: Anostraca) in commercial cyst lots from Great Salt Lake, UT, USA. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 296, 243-251.
- Campos-Ramos, R Obregón-Barboza, H, Guerrero-Tortolero, D.A., Monsalvo-Spencer, P., Maeda-Martínez, A.M. 2006. Hatching temperature and sex-ratio profiles from mixed *Artemia franciscana* and *A. parthenogenetica* commercial cysts (Crustacea: Branchiopoda: Anostraca): preventing the introduction of an exotic parthenogenetic strain in the New World. (*Sometido*).
- Carpelan, L. H., 1957. Hydrobiology of the Alviso salt ponds. *Ecology*, 38: 375-390.
- Correa, F., Bückle, L.F., 1993. Morfología y biometría de cinco poblaciones de *Artemia franciscana* (Anostraca: Artemiidae). *Revista Biología Tropical*, 41, 103-110.
- Correa-Sandoval, F., de la Rosa-Velez, J., 1996. Allozymatic variation in three populations of *Artemia franciscana* (Kellogg, 1906) from Mexico. En: *Improvement of the commercial*

production of marine aquaculture species. Proceedings of a workshop on fish and mollusc larviculture. Gajardo, G., Coutteau, P. (eds), pp. 165-171, Santiago, Chile.

Coutteau, P., Mourente G., 1997. Lipid classes and their content on n3 highly unsaturated fatty acids (HUFA) in *Artemia franciscana* after hatching, HUFA-enrichment and subsequent starvation. *Marine Biology*, 130, 81-91.

Cruces, J., Díaz-Guerra, M., Gil, I., Renart, J., 1989. The 5S rRNA-histone repeat in the crustaceans *Artemia*: structure polymorphism and variation of the 5S rRNA segment in different populations. *Nucleid Acids Research*, 17, 6283–6297.

Dhont, J., Sorgeloos P., 2002. Applications of *Artemia*, En: *Artemia: Basic and applied biology.* Chapter VI. Abatzopoulos, Th. J., Beardmore, J. A., Clegg, J. S., Sorgeloos, P. (eds) pp. 251-277. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Dunstan, G.A., Volkman, J.K., Barret, S.M., Graland, C.D., 1993. Changes in the lipid composition and maximisation of the polyunsaturated fatty acid content of three microalgae grown in mass culture. *Journal of Applied Phycology*, 5, 71-93.

Espinosa, G., Gelabert, R., Diaz, R., Tabeada, E., Barrionuevo, A., 1995. Comparación de la especie *Artemia* de Cuba con *A. franciscana* mediante genética bioquímica e intercruzamiento genético. *Revista de Investigaciones Marinas*, 16, 151–156.

Estévez, A., Kanazawa A., 1996. Fatty acid composition of neural tissues of normally pigmented and unpigmented juveniles of Japanese flounder using rotifer and *Artemia* enriched in n-3 HUFA. *Fisheries Science*, 62, 88-93.

Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39, 783-791.

- Fernández-Reiriz, M. J., Ferreiro, M., Planas, M., Labarta, U., Garrido, L., 1991. Nutritional quality of *Artemia* during enrichment and starvation. Larviculture Symposium, Larvi'95. *European Aquaculture Society Special Publication*, 24, 48-50.
- Folch, J., Lees, M., Stanley, G. H. S., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biology and Chemistry*, 226, 497-509.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R., 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3, 294-299.
- Fryer, G., 1987. A new classification of the branchiopod Crustacea. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 91, 357-383.
- Gajardo, G., Beardmore, J.A., 1993. Electrophoretic evidence suggest that the *Artemia* found in Salar de Atacama, Chile is *Artemia franciscana* Kellog. *Hydrobiologia*, 257, 65-71.
- Gajardo, G., Da Conceicao, M., Weber, L., Beardmore, J.A., 1995. Genetic variability and interpopulation differences in *Artemia* strains from South America. *Hydrobiologia*, 302, 21-29.
- Gajardo, G., Colihueque, N., Parraguez, M., Sorgeloos, P., 1998. International study on *Artemia* LVIII. Morphologic differentiation and reproductive isolation of *Artemia* populations from South America. *International Journal of Salt Lake Research*, 7, 133-151.
- Gajardo, G., Beardmore, J., Sorgeloos, P., 2001. International study on *Artemia*. LXII. genomic relationship between *Artemia franciscana* and *A. persimilis* inferred from chromocentre numbers. *Heredity*, 87, 172-177.

- Gajardo, G., Abatzopoulos, T.J., Kappas, I., Beardmore, J.A., 2002. Evolution and speciation. En: *Artemia: basic and applied biology*. Abatzopoulos, T.J., Beardmore, J.A., Clegg, J.S., Sorgeloos, P. (eds), pp. 225-250. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Gajardo, G., Crespo, J., Triantafyllidis, A., Tzika, A., Baxevanis, A.D., Kappas, I., Abatzopoulos, T.J., 2004. Species identification of Chilean *Artemia* populations based on mitochondrial DNA RFLP analysis. *Journal of Biogeography*, 31, 547–555.
- Gapasin, R.S., Nelis, H.J., Chair, M., Sorgeloos, P., 1996. Drug assimilation in the tissue of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fry delivered orally through bioencapsulation. *Journal of Applied Ichthyology*, 12, 39–42.
- Gelabert, R., Solis, L., 1994. La selección del tamaño de partículas alimenticias por la *Artemia* de Guantánamo, Cuba. *Revista de Investigaciones Marinas*, 14, 141–145.
- Gelabert, R., 2002. Bioencapsulación en *Artemia* y su efecto en la alimentación de postlarvas de camarón *Litopenaeus vannamei*. Tesis Doctoral Universidad Nacional Autónoma de México.
- Giribet, G., Edgecombe, G.D., Wheeler, W.C., 2001. Arthropod phylogeny based on eight molecular loci and morphology. *Nature*, 413, 157–161.
- Haynes, R. C., Hammer, U.T., 1978. The saline lakes of Saskatchewan. *Hydrobiologia*, 63, 337-351.
- Hebert, P.D.N., Remigio, E.A., Colbourne, J.K., Taylor, D.J., Wilson, C.C., 2002. Accelerated molecular evolution in halophilic crustaceans. *Evolution*, 56, 909–926.
- Hillis, D., Dixon, M., 1991. Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. *Quarterly Reviews of Biology*, 66, 411-453.

- Hontoria, F., Amat, F., 1992a. Morphological characterization of adult *Artemia* (Crustacea, Branchiopoda) from different geographical origin. American populations. *Journal of Plankton Research*, 14, 1461–1471.
- Hontoria, F., Amat, F., 1992b. Morphological characterization of adult *Artemia* (Crustacea, Branchiopoda) from different geographical origin. Mediterranean populations. *Journal of Plankton Research*, 14, 949–959.
- Hou, L., Bi, X.D., Zou, X.Y., Yang, L., Yao, F., 2005. Molecular Systematics of Bisexual *Artemia* Populations. DQ119647; DQ119648, *No publicado*.
- Huelsenbeck, J. P., Ronquist, F., 2001. MrBayes: bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics*, 17, 754-755.
- Intriago, P., Jones D.A., 1993. Bacteria as food for *Artemia*. *Aquaculture*, 113, 115-127.
- Kates, M., 1972. Techniques of lipidology, isolation, analysis and identification of lipids. North-Holland Publishing Company, Amsterdam. 553 pp.
- Kappas I., Abatzopoulos, T.J., Van Hoa, N., Sorgeloos, P., Beardmore, J. A., 2004. Genetic and reproductive differentiation of *Artemia franciscana* in a new environment. *Marine Biology*, 146, 103-117.
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, B.I., Nei, M., 2001. MEGA 2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, *Bioinformatics*, 17, 1244-1245.
- Kumazawa, Y., Nishida, M., 1993. Sequence evolution of mitochondrial tRNA genes and deep-branch animal phylogenetics. *Journal of Molecular Evolution*, 37, 380-398.
- Lavens, P., Sorgeloos, P., 2000. The history, present status and prospects of the availability of *Artemia* cyst for aquaculture. *Aquaculture*, 181, 397–403.

- Leger, P., Bengston, D.A., Simpson, K.L., Sorgeloos, P., 1986. The use and nutritional value of *Artemia* as a food source. *Oceanographic Marine Biology Annual Review*, 24, 521-623.
- Lepage, G., Roy, C.C., 1984. Improved recovery of fatty acids through direct transesterification without prior extraction or purification. *Journal of Lipids Research*, 25, 1391-1396.
- Lepage, G., Roy, C.C., 1986. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *Journal of Lipids Research*, 27, 115-120.
- Lesser, I. J. M., 1974. Estudio hidrogeológico e hidrogeoquímico de la Península de Yucatán. *Informe final del Proyecto SARH/CONACYT*, México. 74 pp.
- Maeda-Martínez, A. M., Obregón-Barboza, H., García-Velazco, H., Prieto-Salazar, M. A., 2002. Biodiversidad, Taxonomía y Biogeografía de Artrópodos de México. Branchiopoda Anostraca. Llorente-Bousquets, J., Morrone, J.J. (eds), pp. 305-322. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Marko, MA, Chipperfield, R., Birnboim, HC., 1982. Isolation of Highly Purified Plasmid DNA Using Alkaline Extraction and Binding to Glass Powder. *Analytical Biochemistry*, 121, 382-387.
- Mayer, R.J., 2002. Morphology and biometry of three populations of *Artemia* (Branchiopoda: Anostraca) from the Dominican Republic and Puerto Rico. *Hydrobiologia*, 486(1), 29-38.
- McCarthy, C., 1998. Chromas 1.45. School of Health Sciences. Queensland. Australia.
- McEvoy, L.A., Navarro, J.C., Hontoria, F., Amat, F., Sargent, J.R., 1995. PUFA enhancement in *Artemia nauplii*: a multivariate approach to fatty acid analysis. Lavens, P., Jaspers, E., Roelants, I. (eds) *European Aquaculture Society. Special Publication* 24, 145-148.
- McEvoy, L.A., Navarro, J.C., Hontoria, F., Amat, F., Sargent J.R., 1996. Two novel *Artemia* enrichment diets containing polar lipids. *Aquaculture*, 144: 339-352.

- Menú, B., 1988. Consultoría en *Artemia salina*. Informe técnico de la serie n°5-Contrato n° dp/cub/86/004-2/f10. *France Aquaculture*. Habana, Cuba. 85 pp.
- Miles A.K., Takekaria, J.Y., Schoelhamer, D.H., Spring, S.E., Atearn, N.D., Shellenbarger, G.G., Tsao, D.C., 2004. San Francisco Bay Estuary Salt Ponds. Progress Report 2001-2003. *Priority Ecosystem Science Program, USGS/USFWS (CNO)*. 67 pp.
- Morales, J.R., 2005. Caracterización molecular (ADNmt) y citogenética de híbridos provenientes de tres poblaciones de *Artemia franciscana*, Kellog, 1906. Tesis de Maestría, IPN-CICIMAR, BCS., México.
- Mura, G., Ferrara, F., Fabietti, F., Delise, M., Bocca, A., 1997. Biochemical (fatty acid profile) diversity in anostracans species of the genus *Chirocephalus* Prevost. *Hydrobiologia*, 359, 237-241.
- Mura, G., Ferrara, F., Fabietti, F., Delise, M., Bocca, A., 1998. Intraspecific variation of fatty acid profile in wild populations of *Chirocephalus diaphanous* Prevost (Anostraca). *Crustaceana*, 71(7), 785-800.
- Mura, G., Zarattini, P., Delise, M., Fabietti, F., Bocca, A., 2000. Seasonal variation of the fatty acid profile in cyst and wild adults of the fairy shrimp *Chirocephalus kerkyrensis* Pesta, 1936 (Anostraca). *Crustaceana*, 73(4), 479-495.
- Mura, G., Fancello, G., 2005. Nutritional evaluation of decapsulated cyst of five species of fairy shrimps (Branchiopoda, Anostraca) from Italy for use in larval fish rearing. *Crustaceana*, 78(6), 727-737.
- Murugan, G., Maeda-Martinez, A.M., Obregon-Barboza, H., Hernandez-Saavedra, N.Y., 2002. Molecular characterization of the tadpole shrimp *Triops* (Branchiopoda: Notostraca) from

- the Baja California Peninsula, Mexico: New insights on species diversity and phylogeny of the genus. *Hydrobiologia*, 486, 101-113.
- Nakanishi, Y. H., Iwasaki, T., Okigaki, T., Kato, H., 1962. Cytological studies of *Artemia salina*. I. Embryonic development without cell multiplication after the blastula stage in encysted dry eggs. *Annotationes Zoologicae Japonenses*, 35(4), 223-228.
- Navarro, J.C., Amat, F., 1992. Effect of algal diets on the fatty acid composition of brine shrimp *Artemia* sp. cyst. *Aquaculture*, 101, 223-227.
- Navarro, G., Tizol, R., Díaz, D., 1997. Análisis de indicadores nutricionales en *Artemia*. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras*, 26, 105-108.
- Nicholas, K.B., Nicholas, H.B., 1997. GenDoc: A tool for editing and annotating multiple sequence alignments. *Embnet News*, 4, 1-4.
- Page, R.D.M., 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, 12, 357-358.
- Palumbi, S.R., 1996. Nucleic acids II: The polymerase chain reaction. En: *Molecular Systematics*. Hillis D.M., Moritz, C., Mable, B.K, (eds), pp: 205-247 Sinauer Associates, Sunderland, Massachussets, United States.
- Pérez, M.L., Valverde, J.R., Batuecas, B., Amat, F., Marco, R., Garesse, R. 1994. Speciation in the *Artemia* genus: mitochondrial DNA analysis of bisexual and parthenogenetic brine shrimps. *Journal of Molecular Evolution*, 38, 156-168.
- Posada, D., Crandall, K.A., 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14, 817-818.

- Posada, D., Buckley, T.R., 2004. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of the AIC and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Systematic Biology*, 53, 793-808.
- Quynh, V. D., Lavens, P., Leger, P., Tackaert, W., Sorgeloos, P. 1988. Characterization of brine shrimp *Artemia* from Cam Ranh Bay in Central Vietnam. *Hydrobiologia*, 157, 209-217.
- Remigio, E.A., Hebert, P.D.N., 2000. Affinities among anostracan (Crustacea: Branchiopoda) families inferred from phylogenetic analyses of multiple gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 17 (1), 117-128.
- Remigio, E.A., Hebert, P.D.N., Savage, A., 2001. Phylogenetic relationships and remarkable radiation in *Parartemia* (Crustacea: Anostraca), the endemic brine shrimp of Australia: evidence from mitochondrial DNA sequences. *Biological Journal of the Linnean Society*, 74, 59-71.
- Sato, N., Murata, N., 1988. Membrane lipids. *Methods of Enzimology*, 167, 251-259.
- Seale, A., 1933. Brine shrimp (*Artemia*) as a satisfactory life food for fishes. *Transactions of the American Fisheries Society*, 63, 192-230.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., Flook, P., 1994. Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87, 651-701.
- Sorgeloos, P., Lavens, P., Leger, Ph., Tackaert, W., Versichele, D., 1986. Manual for the culture and use of the brine shrimp *Artemia* in Aquaculture. *FAO Fisheries Technical Paper*, 361. 295 pp.

- Sorgeloos, P., Coutteau, P., Dhert, P., Merchie G., Lavens, P., 1998. Use of brine shrimp *Artemia* spp. in larval crustacean nutrition: A Review. *Reviews in Fisheries Science*, 6, 55–68.
- StatSoft, Inc., 2004. STATISTICA, versión 7. www.statsoft.com.
- Stringfield, V.T., Legrand, H.E., 1974. Karst hidrology of Northern Yucatan peninsula. En: *Water and Carbonate Rocks of the Yucatan Peninsula, Mexico*. New Orleans Geological Society, USA. pp. 26-44.
- Sun, Y., Zhong, Y., Song, W.Q., Zhang, R.S., Chen, R.Y., Sorgeloos, P. 1999. Detection of genetic relationship among four *Artemia* species, using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). *International Journal of Salt Lake Research*, 8, 341–350.
- Suutari, M., Laakso, S., 1994. Microbial fatty acids and thermal adaptation. *Critical Reviews in Microbiology* 20: 285-328.
- Swofford, D. L., 2003 PAUP. Phylogenetic Analysis Using Parsimony. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tares, S., Cornuet J., Abad, P., 1993. Characterization of an unusually conserved *Alu I* highly reiterated DNA sequence family from the honeybee, *Apis mellifera*. *Genetics*, 134, 1195-1204.
- Tizol-Correa, R., Maeda-Martínez, A.M., Weekers, P.H.H., Torrentera, L., Maldonado-Montiel, T.D.N.J., Murugan, G., 2006. Phylogenetic relationships of *Artemia* populations from tropical salterns of southern México and Cuba inferred from the mitochondrial 16S rRNA and cytochrome oxidase I genes. *Journal of Biogeography* (sometido).
- Thomson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, E., Jeanmougin, E., Higgins, D.G., 1997. The Clustal X Windows interfase flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 24, 4876–4882.

- Tocher, D.R., Mourente, G., Sargent, J.R., 1997. The use of silages prepared from fish neural tissues as enrichers for rotifers (*B. plicatilis*) and *Artemia* in the nutrition of larval marine fish. *Aquaculture*, 148, 2-3.
- Torrentera, L., Dodson, S.I., 1995. Morphological diversity of populations of *Artemia* (Branchiopoda) in Yucatán. *Journal of Crustacean Biology*, 15, 86-102.
- Torrentera, L., Abreu-Grobois, A.F., 2002. Cytogenetic variability and differentiation in *Artemia* (Branchiopoda: Anostraca) populations from the Yucatán Peninsula, México. *Hydrobiologia*, 486, 303-314.
- Torrentera, L., Dodson, S.I., 2004. Ecology of the brine shrimp *Artemia* in the Yucatan, Mexico, salterns. *Journal of Plankton Research*, 26, 617-624.
- Triantaphyllidis, G.V., Criel, G.R.J., Abatzopoulos, T.J., Thomas, K.M., Peleman, J., Beardmore, J.A., Sorgeloos, P., 1997a. International Study on *Artemia*: LVII. Morphological and molecular characters suggest conspecificity of all bisexual and European and North African *Artemia* populations. *Marine Biology*, 129, 477-487.
- Triantaphyllidis, G.V., Criel, G.R.J., Abatzopoulos, T.J., Sorgeloos, P., 1997b. International Study on *Artemia*: LIV. Morphological studies of *Artemia* with emphasis to Old World strains. II. Parthenogenetic population. *Hydrobiologia*, 357, 155-163.
- Triantaphyllidis, G.V., Criel, G.R.J., Abatzopoulos, Th.J., Sorgeloos, P., 1997c. International Study on *Artemia*: LIII. Morphological studies of *Artemia* with emphasis to Old World strains. I. Bisexual populations. *Hydrobiologia*, 357, 139-153.
- Triantaphyllidis, G.V., Sorgeloos, P., 1998. Review of the biogeography of the genus *Artemia* (Crustacea, Anostraca). *Journal of Biogeography*, 25, 213-226.

- Van Stappen, G., 2002. Zoogeography. En: *Artemia: Basic and Applied Biology*. Abatzopoulos, Th.J., Beardmore, J.A., Clegg, J.S., Sorgeloos P. (eds), pp. 171-215. Kluwer Academic Publishing. Netherlands.
- Vanhaecke, P., Sorgeloos, P., 1980. International Study on *Artemia*. IV. The biometrics of *Artemia* strains from different geographical origin. En: *The brine shrimp Artemia*. Vol. 3. *Ecology, Culturing, Use in Aquaculture*. Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O., Jaspers, E. (eds) pp. 393–405. Universa Press, Wetteren, Belgium.
- Vanhaecke, P., Tackaert, W., Sorgeloos, P., 1987. The biogeography of *Artemia*: an updated review. En: *Artemia research and its applications*. Vol. 1. *Morphology, Genetics, Strain Characterization, Toxicology*. Sorgeloos, P., Bengston, D.A., Decler, W., Jaspers, E. (eds) pp: 129 – 155. Universa press. Wetteren, Belgium.
- Vos, J., De la Rosa, N., 1980. Manual on *Artemia* production in salts ponds in the Philippines. FAO/UNDP-BFAR, PHI/75/005. 150 p.
- Watanabe, T., 1978. Nutritive value of plankton for fish larvae in the view point of lipids. Koseisha-Koseikaku, Tokyo, *Japan Fisheries Service*, 22, 93-111.
- Watanabe, T., Ohta, M., Kitajima, C., Fujita, S., 1982. Improvement of dietary value of brine shrimp *Artemia salina* for fish larvae by feeding them on omega 3 highly unsaturated fatty acids. *Bulletin Japan Society of Science Fisheries*, 48, 1775-1782.
- Watanabe, T., Tamiya, T., Oka, A., Hirata, M., Kitajima, C., Fujita, S., 1983. Improvement of dietary value of live foods for fish larvae by feeding them on omega 3 highly unsaturated fatty acids and fat soluble vitamins. *Bulletin Japan Society of Science Fisheries*, 49, 471-479.

Weidie, A.E., 1984. Regional geology of Yucatan Peninsula. En: *Water and Carbonate Rocks of the Yucatan Peninsula, Mexico*. New Orleans Geological Society, USA. pp. 2-8.

White, M.J.D., 1978. Modes of speciation. W.H. Freeman, San Francisco.

ANEXOS

Anexo 1.

Nombre sistemático, nombre abreviado y rango de concentración ($\mu\text{g}/\text{mg dw}$) para 51 ácidos grasos identificados de quistes decapsulados de *Artemia* de 8 localidades de clima tropical de Cuba y el sur de México. (El Real, Santa Lucía, Camagüey, Cuba; Frank País, Guantánamo, Cuba; Real de Salinas, Campeche, México; La Colorada, Oaxaca, México; Chuburna, Yucatán, México; Celestún, Yucatán, México; Xtampú, Yucatán, México; San Crisanto, Yucatán, México), y una de clima templado (Bahía de San Francisco, California, EUA).

Nombre sistemático	Nombre abreviado	Rango	
		Min	Max
dodecanoico	12:0	0.06	0.16
11 dodecanoico	iso 12:0	0.07	0.14
tridecanoico	13:0	0.03	0.16
12 tridecanoico	iso 13:0	0.23	0.38
tetradecanoico	14:0	1.27	2.54
tetradecenoico	14:1	0.12	0.65
tetradecenoico	14:1	0.15	0.35
13 tetradecanoico	iso 14:0	0.01	0.18
19 tetradecanoico	iso 14:0	1.25	4.89
12 tetradecanoico	ante iso 14:0	0.45	0.80
pentadecanoico	15:0	0.23	2.01
pentadecenoico	15:1	0.13	2.33
pentadecenoico	15:1	0.04	1.13
pentadecenoico	15:1	0.02	0.14
14 pentadecanoico	iso 15:0	0.61	2.93
13 pentadecanoico	iso 15:0	0.01	0.05

2,6,10,14 pentadecanoico	iso 15:0	0.01	0.22
hexadecanoico	16:0	16.40	41.13
9 hexadecenoico	16:1 n7	0.58	7.96
11 hexadecenoico	16:1 n5	5.13	21.99
hexadecenoico	16:1	0.11	0.52
15 hexadecanoico	iso 16:0	0.74	4.02
hexadecadienoico	16:2	0.45	1.96
14 hexadecanoico	ante iso 16:0	0.21	1.67
hexadecadienoico	16:2	0.07	0.47
heptadecanoico	17:0	0.82	3.70
heptadecenoico	17:1	0.83	5.44
heptadecenoico	17:1	0.04	1.23
heptadecenoico	17:1	0.04	0.17
heptadecenoico	17:1	0.04	1.81
16 heptadecanoico	iso 17:0	0.02	0.10
heptadecadienoico	17:2	0.02	0.19
octadecanoico	18:0	4.55	8.59
9 octadecenoico	18:1 n9	13.59	42.86
11 octadecenoico	18:1 n7	6.52	19.18
octadecenoico	18:1	0.08	0.19
9,12 octadecadienoico	18:2 n6	0.02	0.12
12,15 octadecadienoico	18:2 n3	3.54	27.80
6,9,12 octadecatrienoico	18:3 n6	0.21	0.52
nonadecanoico	19:0	0.04	0.17
9,12,15 octadecatrienoico	18:3 n3	0.79	42.94
6,9,12,15 octadecatetraenoico	18:4 n3	0.29	7.40

eicosanoico	20:0	0.21	0.45
11 docosenoico	20:1 cis 11	0.17	1.04
13 docosenoico	20:1 cis 13	0.10	0.41
11,14 eicosadienoico	20:2 n6	0.09	0.31
8,11,14 eicosatrienoico	20:3 n6	0.07	0.18
5,8,11,14 eicosatetraenoico	20:4 n6	0.09	2.64
5,8,11,14, 17 eicosapentaenoico	20:5 n3	0.23	4.48
docosanoico	22:0	0.59	1.12
tetracosaenoico	24:0	0.11	0.29
