

**Centro de Investigación Científica y de
Educación Superior de Ensenada**



**ANALISIS DE LA VARIABILIDAD ALOZIMATICA DE
LA LEUCIN-AMINOPEPTIDASA (LAP), DE LA
FOSFOGLUCOMUTASA (PGM) Y DE LA
FOSFOGLUCOSA-ISOMERASA (PGI) DE
Artemia franciscana BAJO DIFERENTES
CONDICIONES DE CULTIVO.**

**TESIS
MAESTRIA EN CIENCIAS**

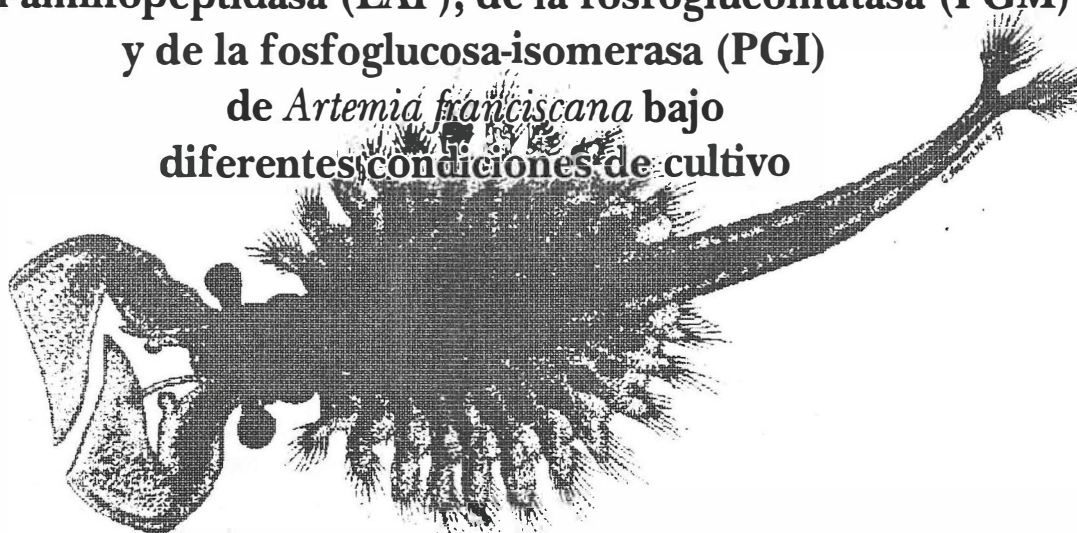
DIANA ESMERALDA RODRIGUEZ CORTES

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MEXICO

ENERO DE 1998.

**CENTRO DE INVESTIGACION CIENTIFICA Y DE
EDUCACION SUPERIOR DE ENSENADA
DIVISION DE OCEANOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ACUICULTURA**

**Análisis de la variabilidad alozimática de la
leucin-aminopeptidasa (LAP), de la fosfoglucomutasa (PGM)
y de la fosfoglucosa-isomerasa (PGI)
de *Artemia franciscana* bajo
diferentes condiciones de cultivo**



TESIS

que para cubrir parcialmente
los requisitos necesarios para
obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

presenta

Diana Esmeralda Rodríguez Cortés

SH
380
.6
.R63
Ej.2

RESUMEN de la tesis de Diana Esmeralda Rodríguez Cortés presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS en ECOLOGIA MARINA. Enero de 1998. Ensenada, Baja California, México.

Análisis de la variabilidad alozimática de la leucin-aminopeptidasa (LAP), de la fosfoglucomutasa (PGM) y de la fosfoglucosa-isomerasa (PGI) de *Artemia franciscana* bajo diferentes condiciones de cultivo

Resumen aprobado por :

Dr. Francisco Correa Sandoval
Director de Tesis

En el presente estudio se analiza y discute si distintas condiciones de cultivo pueden inducir a *Artemia franciscana* del Gran Lago Salado (Utah, EE.UU.) a mostrar diferencias genéticas, y si estas variaciones están relacionadas con características fenotípicas de importancia acuicultural como son las tallas finales alcanzadas y la composición bioquímica, dentro de una misma cohorte. Se empleó la técnica de electroforesis en gel de almidón para analizar la variabilidad alélica de cuatro loci polimórficos: leucin-aminopeptidasa-2 (*Lap-2*); leucin-aminopeptidasa-3 (*Lap-3*); fosfoglucomutasa (*Pgm*) y fosfoglucosa-isomerasa (*Pgi*) en *A. franciscana* cultivada en ocho condiciones experimentales diferentes. Los organismos analizados se cultivaron hasta el estado adulto bajo un diseño experimental de 2 x 2 x 2 (22 y 30 °C; 30 y 60 ‰ de salinidad, y como alimento se empleó *Dunaliella* sp. viva y *Spirulina* sp. seca comercial). Bajo la hipótesis de que no existe variación alélica significativa a corto plazo en una misma población mantenida en diferentes condiciones experimentales, se encontró que los valores promedio de heterocigosis observada (H_o) varían de 0.135 a 0.388. Las frecuencias alélicas de *Lap-2A* varían de 0.757 a 0.948; de *Lap-3A* de 0.686 a 0.862; de *Pgm-1A* de 0.391 a 1.000; y de *Pgi-1A* de 0.5 a 0.729. De los resultados obtenidos, se observa una variación alélica importante en función de las condiciones de cultivo. Al aplicar la prueba exacta de Fisher, empleando tablas de contingencia, se encontró que existen diferencias significativas ($\alpha=0.05$) en las frecuencias alélicas en cada locus analizado y, por lo tanto, se rechaza la hipótesis de la independencia entre los tratamientos y la composición alélica por locus. Sin embargo, la prueba de Tukey de no aditividad e interactivo del análisis multifactorial, que se empleó para analizar si existe un efecto sinérgico de los factores y la

composición alélica por locus, demostró que no existen diferencias significativas por alguno de los factores ni por la interacción entre éstos y, por lo tanto, ser determinante en la variación alélica observada. La variación alélica presente en el locus *Lap* parece indicar, como se ha reportado por otros autores, que tiene una función específica en la osmorregulación a diferentes salinidades y temperaturas al igual que *Pgm* y *Pgi*, que intervienen en la transformación de la glucosa. Se analizó, además, la composición bioquímica de *A. franciscana* determinándose el contenido de proteínas, lípidos y carbohidratos por los métodos analíticos estándar, tanto de los organismos cultivados como de las dietas suministradas. Los resultados demuestran una gran variabilidad en la composición bioquímica de *A. franciscana*, no sólo debida a la calidad de la dieta que se proporcionó, sino también a un efecto producido por la temperatura y la salinidad. En relación al crecimiento, se observó que las mayores longitudes totales, así como las longitudes del tórax, del abdomen y las razones longitud total/tórax y longitud total/abdomen, corresponden, en la mayoría de los casos, a los organismos cultivados en condiciones de salinidad baja. Al integrar los diferentes aspectos de este estudio, se observa que los grados de heterocigosis observada promedio de los cuatro loci no mostraron una relación aparente con las longitudes totales, velocidades de crecimiento ni con el perfil bioquímico. Sin embargo, se encontró una relación positiva de los valores de heterocigosis con la temperatura. En este estudio se demuestra que existe variabilidad en loci específicos, en una misma población, en diferentes ambientes, con lo cual se enfatiza la necesidad de tener precauciones al analizar la información genética de poblaciones naturales a través del tiempo. En el aspecto acuicultural, los resultados de este estudio son de gran utilidad porque se pueden obtener diferentes perfiles nutricionales y morfológicos en *A. franciscana*, los cuales pueden ser aprovechados en las dietas de los cultivos de peces y camarones según sus necesidades.

Palabras clave: *Artemia franciscana*; genética; bioquímica; morfología; salinidad; temperatura.

Analysis of allozymatic variability of leucin-aminopeptidase (LAP), of phosphoglucomutase (PGM) and phosphoglucose-isomerase (PGI) of *Artemia franciscana* under different culture conditions.

In the present study, it is analysed and discussed whether different culture conditions can induce genetic differences in *Artemia franciscana* from Great Salt Lake (Utah, USA), and whether these variations are related to phenotypic characteristics of aquacultural importance such as final sizes and biochemical composition, within a same cohort. The starch gel electrophoresis was used to analyse the allelic variation of four polymorphic loci: leucin-aminopetidase-2 (*Lap-2*); leucin-aminopeptidase-3 (*Lap-3*); phosphoglucomutase (*Pgm*) and phosphoglucose-isomerase (*Pgi*) in *A. franciscana* cultured in eight different experimental conditions. The analysed organisms were cultured to adult stage under an experimental design of 2 X 2 X 2 (22 and 30 ° C; salinity 30 and 60 ‰ and live *Dunaliella* sp. and dry commercial *Spirulina* sp. as nutriment). Under the hypothesis that there is no short term significant allelic variation in one same population maintained in different experimental conditions, it was found that the average values of observed heterozygosity (H_o) vary from 0.135 to 0.388. The allelic frequencies of *Lap-2A* vary from 0.757 to 0.948; of *Lap-3A* from 0.686 to 0.862; of *Pgi-1* from 0.391 to 1.000 and *Pgi-1A* from 0.5 to 0.729. The results obtained show an important allelic variation as a function of culture conditions. When applying Fisher's exact test, using contingency tables, the existence of significant differences ($\alpha=0.05$) were found in the allelic frequencies in each locus. Therefore, the hypothesis of independence among treatments and allelic composition by locus, is rejected. However, Tukey's test of no aditivity and interactive of the multifactorial analysis, which was used to analyse if there is a synergetic effect of the factors and the allelic composition by locus, proved that there are no significant differences by any of the factors nor by the interaction among them and, therefore, proved to be determinant in the observed allelic variation. The allelic variation present in the *Lap* locus seems to indicate, as has been reported by other authors, that it has a specific function in the osmoregulation at different salinities and temperatures, as well as *Pgm* and *Pgi*, which take part in the transformation of glucose. The biochemical composition of the cultured organisms as well as the provided diets was analysed by standard analytic methods, determining the protein, lipid and carbohydrate contents. The results prove a great variability in the biochemical composition of *A. franciscana*, not only due to the quality of the furnished diet, but also due to an effect produced by temperature and salinity. In the majority of the cases, it was observed that the greater total length/thorax and total length/abdomen, correspond to the organisms cultured under low salinity conditions. When integrating the different aspects of this study, it is seen that the average degrees heterozygosity observed of the four loci did not show an apparent relationship with total length, growth velocities, or with the biochemical profile. However, a positive relationship of the values of heterozygosity with temperature was found. This study proves that there is variability in specific locus, in one same population, under different environments, which emphasizes the necessity of having precautions when analysing the genetic information of natural populations through time. In the aquacultural aspect, the results of this study are of great use because it is possible to obtain different nutritional and morphological profiles in *A. franciscana*, which can be used to the greatest advantage in diets for fish and shrimp culture, according to their necessities.

Key words: *Artemia franciscana*; genetic; biochemistry; morphology; salinity; temperature.

Dedicatoria

A Benja, Mary y Benjamín, por que gracias a ellos encuentro fuerzas para seguir adelante.

A mis hermanos: Brenda, Andrea y Carlos, por que siempre los tengo cerca.

A mi madre y a mi padre: Esmeralda y Carlos, puesto que gracias a ellos hoy me encuentro aquí.

Agradecimientos

Al Dr. Francisco Correa del Instituto de Investigaciones Oceanológicas por su valiosa ayuda en la dirección de esta tesis.

A los miembros del Comité de tesis: Dra. Beatriz Cordero, Dr. Miguel Ángel del Río, M. C. Roberto Escobar y Dra. Diana Tentori por sus valiosas recomendaciones para mejorar este trabajo.

A todos mis compañeros, por su amistad y por la ayuda que en todo momento obtuve de ustedes.

Al CONACyT, por favorecerme con una beca.

Esta tesis fue financiada por el proyecto CONACyT 1942P-N9507.

CONTENIDO

	<u>PAGINA</u>
I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES	3
II. 1 Variabilidad genética	3
II.2 Composición proximal	5
II. 3 Morfometría	6
II. 4 Objetivo general	9
II. 4. 1 Objetivos particulares	10
III. MATERIALES Y METODOS	11
III. 1 Origen y procesamiento de los quistes de <i>Artemia franciscana</i>	11
III. 2 Condiciones experimentales de cultivo	11
III. 3 Cultivo de microalgas	14
III. 4 Análisis electroforéticos	15
III. 5 Análisis proximales	17
III. 6 Análisis biométricos	19

CONTENIDO (Continuación)

	<u>PAGINA</u>
IV. RESULTADOS	21
IV. 1 Variación alozimática	21
IV. 2 Composición proximal	26
IV. 3 Análisis morfométricos	28
V. DISCUSION	32
V. 1 Variabilidad genética	32
V. 2 Composición proximal	35
V. 3 Morfometría	37
VI. DISCUSION GENERAL	40
VII. CONCLUSIONES	47
LITERATURA CITADA	50



LISTA DE FIGURAS

<u>FIGURA</u>		<u>PAGINA</u>
1	Esquema del diseño experimental: a) Distribución de aire para acuarios y estanque; b) Regulador de temperatura; c) Calentador de titanio; d) Acuarios con subdivisiones de 10 l a diferentes salinidades; e) Estanque de 500 l.	12
2	Esquema de la distribución de los acuarios en los estanques. Acuarios con subdivisiones de 10 l para salinidades de 30 y 60 ‰. Estanques de 500 l a temperaturas de 22 y 30 ° C.	13
3	Esquema de las medidas morfométricas empleadas para los adultos de <i>Artemia franciscana</i> . A. Longitud total; B. longitud del abdomen; C. longitud del tórax (Modificado de Amat, 1980).	20

LISTA DE TABLAS

<u>TABLA</u>		<u>PAGINA</u>
I	Sistemas de amortiguadores utilizados y condiciones electroforéticas para fosfoglucomutasa (PGM), leucin-aminopeptidasa (LAP) y fosfoglucoasa-isomerasa (PGI).	18
II	Variación alélica de <i>Artemia franciscana</i> del Gran Lago Salado (Utah, EE.UU.), cultivada con dos dietas (<i>Dunaliella</i> y <i>Spirulina</i>), dos temperaturas (22 y 30 °C) y dos salinidades (30 y 60 ‰). Número de organismos analizados (n), heterocigosis esperada sin sesgo (He (ss)), heterocigosis observada (Ho), deficiencia de heterocigotos (D), prueba de χ^2 según el modelo de Hardy-Weinberg (χ^2), grados de libertad (gl), desviación estándar (d.e.) y error estándar (e.e.). *P= 0.95; **P=0.99; ***P=0.999.	22
IIIa	Matriz de probabilidades de la hipótesis nula (Ho=independencia entre la variación del locus <i>Lap-2</i> y los tratamientos; $\alpha \geq 0.05$ se acepta Ho; $\alpha < 0.05$ se rechaza Ho) mediante la Prueba exacta de Fisher en las tablas de contingencia usando el método de Markov. El principio de la prueba es examinar la independencia entre los tratamientos y la composición alélica. 1=22°C: 30‰: <i>Dunaliella</i> ; 2=22°C: 60‰: <i>Dunaliella</i> ; 3=30°C: 30‰: <i>Dunaliella</i> ; 4=30°C: 60‰: <i>Dunaliella</i> ; 5=22°C: 30‰: <i>Spirulina</i> ; 6=22°C: 60‰: <i>Spirulina</i> ; 7=30°C: 30‰: <i>Spirulina</i> ; 8=30°C: 60‰: <i>Spirulina</i> .	24
IIIb	Matriz de probabilidades de la hipótesis nula del locus <i>Lap-3</i> y los tratamientos. 1=22°C: 30‰: <i>Dunaliella</i> ; 2=22°C: 60‰: <i>Dunaliella</i> ; 3=30°C: 30‰: <i>Dunaliella</i> ; 4=30°C: 60‰: <i>Dunaliella</i> ; 5=22°C: 30‰: <i>Spirulina</i> ; 6=22°C: 60‰: <i>Spirulina</i> ; 7=30°C: 30‰: <i>Spirulina</i> ; 8=30°C: 60‰: <i>Spirulina</i> .	24
IIIc	Matriz de probabilidades de la hipótesis nula del locus <i>Pgm</i> y los tratamientos. 1=22°C: 30‰: <i>Dunaliella</i> ; 2=22°C: 60‰: <i>Dunaliella</i> ; 3=30°C: 30‰: <i>Dunaliella</i> ; 4=30°C: 60‰: <i>Dunaliella</i> ; 5=22°C: 30‰: <i>Spirulina</i> ; 6=22°C: 60‰: <i>Spirulina</i> ; 7=30°C: 30‰: <i>Spirulina</i> ; 8=30°C: 60‰: <i>Spirulina</i> .	25

LISTA DE TABLAS (Continuación)

<u>TABLA</u>		<u>PAGINA</u>
III d	Matriz de probabilidades de la hipótesis nula del locus <i>Pgi</i> y los tratamientos. 1=22°C: 30‰: <i>Dunaliella</i> ; 2=22°C: 60‰: <i>Dunaliella</i> ; 3=30°C: 30‰: <i>Dunaliella</i> ; 4=30°C: 60‰: <i>Dunaliella</i> ; 5=22°C: 30‰: <i>Spirulina</i> ; 6=22°C: 60‰: <i>Spirulina</i> ; 7=30°C: 30‰: <i>Spirulina</i> ; 8=30°C: 60‰: <i>Spirulina</i> .	25
IV	Composición proximal de adultos de <i>Artemia franciscana</i> del Gran Lago Salado (Utah, EE.UU.) cultivada en diferentes temperaturas, salinidades y alimentadas con distintas dietas. P=Proteínas; L= Lípidos; C= Carbohidratos; D= <i>Dunaliella</i> ; S= <i>Spirulina</i> . Porcentajes en base al total de la fracción orgánica.	26
V	Composición proximal de la microalga <i>Dunaliella</i> sp. cultivada a dos salinidades, proporcionada a <i>Artemia franciscana</i> del Gran Lago Salado. Porcentajes en base al total de la fracción orgánica. Cepa DU-T2 <i>Dunaliella</i> sp.	28
VI	Valores promedio de los diferentes caracteres morfométricos (en mm) de adultos de <i>Artemia franciscana</i> bajo diferentes condiciones experimentales de cultivo. Número de organismos medidos (N); longitud del tórax (Tx); longitud del abdomen (Ab); longitud total (LT); razón longitud total/longitud del tórax (LT/Tx), razón longitud total/longitud del abdomen (LT/Ab), días promedio de cultivo (DIAS) y tasa de crecimiento promedio diario (TC). Entre paréntesis se encuentra la desviación estándar.	30
VII	Grupos homogéneos formados en el análisis de comparación múltiple de rangos de la longitud del tórax (Tx), longitud del abdomen (Ab), longitud total (LT), razón longitud total/ longitud del tórax (LT/Tx) y razón longitud total/ longitud del abdomen (LT/Ab). Los números entre paréntesis son los tratamientos: 1=22°C: 30‰: <i>Dunaliella</i> ; 2=22°C: 60‰: <i>Dunaliella</i> ; 3=30°C: 30‰: <i>Dunaliella</i> ; 4=30°C: 60‰: <i>Dunaliella</i> ; 5=22°C: 30‰: <i>Spirulina</i> ; 6=22°C: 60‰: <i>Spirulina</i> ; 7=30°C: 30‰: <i>Spirulina</i> ; 8=30°C: 60‰: <i>Spirulina</i> .	31

LISTA DE TABLAS (Continuación)

<u>TABLA</u>		<u>PAGINA</u>
VIII	Composición proximal de adultos de <i>Artemia franciscana</i> . Porcentajes en base al total de la fracción orgánica. (A)= alimentada con <i>Chaetoceros</i> cultivada en medio f/2; (B)= alimentada con <i>Chaetoceros</i> cultivada con fertilizantes agrícolas; G.L.S.= Gran Lago Salado, Utah; S.F.B.= San Francisco Bay, California, EE.UU.	36
IX	Resumen de resultados de heterocigosis observada promedio (Ho) para 4 loci en <i>Artemia franciscana</i> en las diferentes condiciones de cultivo. Longitud total (LT), crecimiento promedio por día, longitud del tórax (Tx), longitud del abdomen (Ab), razones longitud total/tórax (LT/Tx), longitud total/abdomen (LT/Ab) y porcentaje de proteínas (P), lípidos (L) y carbohidratos (C).	44
Xa	Heterocigosis observada (Ho) del locus <i>Lap-2</i> , condiciones de cultivo y longitud total (mm) de <i>Artemia franciscana</i> .	45
Xb	Heterocigosis observada (Ho) del locus <i>Lap-3</i> , condiciones de cultivo y longitud total (mm) de <i>Artemia franciscana</i> .	45
Xc	Heterocigosis observada (Ho) del locus <i>Pgm</i> , condiciones de cultivo y longitud total (mm) de <i>Artemia franciscana</i> .	46
Xd	Heterocigosis observada (Ho) del locus <i>Pgi</i> , condiciones de cultivo y longitud total (mm) de <i>Artemia franciscana</i> .	46

Análisis de la variabilidad alozimática de la leucin-aminopeptidasa (LAP), de la fosfoglucomutasa (PGM) y de la fosfoglucosa-isomerasa (PGI) de *Artemia franciscana* bajo diferentes condiciones de cultivo.

I. INTRODUCCION

Las poblaciones de *Artemia* se encuentran en más de 300 lagos salados y salinas artificiales en todo el mundo. Las diferentes características geográficas de estos lagos han propiciado su adaptación a condiciones altamente fluctuantes en temperatura (de 6 a 35 ° C) y condiciones iónicas de los biotopos (aguas con altos porcentajes de cloruros, sulfatos y carbonatos) (Sorgeloos *et al.*, 1986). Aunque este organismo no posee ningún mecanismo de defensa contra sus depredadores, su adaptación fisiológica a medios con salinidades altas le confiere una defensa ecológica muy eficaz contra éstos, siendo *Artemia* el organismo con el sistema osmorregulatorio más eficiente conocido del reino animal. Además, es capaz de sintetizar pigmentos respiratorios con afinidad alta al oxígeno para soportar los niveles bajos de este gas que prevalecen en salinidades altas (Sorgeloos *et al.*, 1986).

El valor nutricional de los nauplios de *Artemia* como alimento para peces y crustáceos de importancia económica han propiciado que su uso se incremente sustancialmente. Además, en la actualidad constituye no sólo el mejor sino, en la mayoría de los casos, la única fuente de alimento vivo para estadios juveniles de estos organismos.

Debido a sus características biológicas y a su gran demanda dentro del área de la acuicultura, existen muchos esfuerzos enfocados al estudio de las poblaciones de las

diferentes especies de *Artemia*. En México, se han realizado diversos estudios que han caracterizado biológicamente algunas poblaciones de *Artemia franciscana*. Estos estudios abarcan el análisis desde diferentes niveles tales como el morfológico, biométrico, hibridación, composición bioquímica, análisis de la variabilidad genética de algunas poblaciones naturales y formas de cultivo (Abreu-Grobois y Beardmore, 1980; Amat, 1980; Abreu-Grobois y Beardmore 1982; Caro-Caro, 1991; Correa-Sandoval, 1991; Olivares-González, 1992; Correa-Sandoval y Bückle-Ramírez, 1993a; Correa-Sandoval *et al.*, 1993b; Correa-Sandoval *et al.*, 1993c; Correa-Sandoval *et al.*, 1994a; Correa-Sandoval *et al.*, 1994b; Castro *et al.* 1995; Juárez-Carrillo, 1995; Pedrosa, 1995; Tapia-Vázquez, 1995; Correa-Sandoval y de la Rosa-Vélez, 1996). Sin embargo, existe todavía la necesidad de realizar otros estudios y profundizar en diferentes campos para entender los aspectos biológicos básicos de las diferentes poblaciones de *Artemia* que permitan optimizar y desarrollar las estrategias necesarias para un adecuado manejo de este importante recurso natural.

Así, debido a su amplia distribución mundial, a sus distintas adaptaciones en sus formas reproductivas y morfológicas según el lugar donde habita y a su amplia utilización en la acuicultura, el complejo *Artemia* es un sistema único que ofrece grandes ventajas para el análisis de aspectos ecológicos y evolutivos (Browne y Bowen, 1991).

Por lo anterior, a continuación se presentan algunos de los antecedentes más relevantes sobre aspectos genéticos, de composición bioquímica y morfométricos, los cuales dan un panorama más amplio y claro de la temática que se aborda en el presente trabajo.

II. ANTECEDENTES

II. 1 Variabilidad genética

Se ha observado que diferentes poblaciones de una misma especie, tal como *Artemia franciscana*, presentan diferencias en las tallas alcanzadas en estado adulto y en la biomasa individual. Estas variaciones se observan aún en diferentes poblaciones mantenidas en una misma condición de cultivo. Se ha postulado que estas respuestas individuales/poblacionales en su conjunto están reguladas a nivel genético (Correa-Sandoval, 1991).

Se ha estudiado la utilidad de la cuantificación de la interacción entre factores genéticos y factores ambientales sobre la variación fenotípica en poblaciones naturales de algunos organismos, y se ha valorado el significado adaptativo de productos génicos particulares funcionales (alozimas) y los niveles de heterocigosis individual en diferentes grupos como anémonas (Shick y Dowse, 1985) y en moluscos (Diehl *et al.*, 1986; Garton, 1984; Garton *et al.*, 1985; Hawkins *et al.*, 1988). En estos trabajos se ha encontrado que existe una relación positiva entre el nivel de heterocigosis y el campo de crecimiento de los organismos a diferentes salinidades. Asimismo, esta relación es negativa con respecto a la cantidad de energía requerida para el metabolismo respiratorio (bajas tasas absolutas de consumo de oxígeno) lo cual se traduce en requerimientos reducidos para mantenimiento. La energía “ahorrada” puede ser utilizada para un crecimiento más rápido y, además, ser canalizada en la reproducción. Se ha encontrado que existe una adaptación fisiológica y genética al estrés térmico en copépodos (Bradley, 1978) y en anémonas (Hoffman, 1985) en

los cuales se observa también una estrecha relación entre la heterocigosidad de los individuos y su resistencia al estrés, además de su relación con la enzima glicolítica fosfoglucoisomerasa (PGI), la cual ha demostrado encontrarse a frecuencias altas en organismos adaptados a aguas cálidas. Otra enzima estudiada y que se encuentra directamente relacionada con la adaptación a cambios ambientales es la leucin-aminopeptidasa (LAP), la cual participa en la hidrólisis de polipéptidos durante la adaptación a cambios en la salinidad para la osmorregulación celular (Koehn *et al.*, 1983)

Se ha observado que *Artemia* varía sus dimensiones corporales en función de la salinidad y la temperatura y, por lo anteriormente mencionado, se cree que están reguladas por los sistemas genético/enzimáticos leucin-aminopeptidasa (LAP), fosfoglucomutasa (PGM) y fosfoglucoisomerasa (PGI). Los antecedentes bibliográficos en esta área para *Artemia franciscana* son nulos. Sin embargo, se tienen estudios en bivalvos, donde se han analizado distintos sistemas enzimáticos y se han encontrado diferencias en las frecuencias alélicas a partir de una misma población, pero mantenidas en condiciones de cultivo diferentes (Hawkins *et al.* 1988; Jørgensen, 1992; Koehn, 1985; Pough, 1989; Watt, 1985; Zouros y Mallet, 1988).

Asimismo, Zapata *et al.* (1990) demostraron como las diferencias a nivel de heterocigosis y el éxito reproductivo en machos de *Artemia* tienen una relación positiva, al menos para ciertas condiciones de apareamiento y para 5 loci probados (entre ellos *Pgi*), y concluyeron que estos resultados pueden ser aplicados a todos los componentes del desempeño (ajuste) total Darwiniano.

La importancia de este tipo de estudios es que nos permite conocer, analizar y entender los aspectos biológicos básicos de regulación genética y sus implicaciones a nivel fisiológico. Esto es muy importante para cualquier especie, más aún si es susceptible de ser cultivada, puesto que un individuo que tenga menores gastos energéticos para mantenimiento, podrá derivar su energía básicamente para crecimiento y reproducción, por lo que, además, los resultados de estas investigaciones pueden aplicarse directamente en el campo de la acuicultura. En esta área queda implícito que las condiciones de cultivo juegan un papel fundamental para el buen crecimiento y éxito reproductivo de cualquier especie.

II. 2 Composición proximal

Estudios previos sobre aspectos de la composición bioquímica de biomasa de *Artemia* cultivada en diferentes condiciones experimentales son muy escasos, hasta el momento no se le ha dado la importancia que merecen, aún cuando este organismo es empleado frecuentemente como alimento único o suplementario para peces y camarones (Sorgeloos *et al.*, 1986), por lo que es indiscutible el efecto que tiene en el crecimiento y maduración sexual en estos organismos (Léger *et al.*, 1986).

Correa-Sandoval *et al.* (1994a) realizaron un estudio sobre la composición bioquímica de *A. franciscana* del Gran Lago Salado, empleando como alimento la diatomea *Chaetoceros muelleri*; estos autores encuentran diferencias en su composición proximal debidas a la calidad del alimento administrado. Tobias *et al.* (1980) analizaron y compararon *A. franciscana* de Macau, Brasil, cultivada en el Upwelling Culturing System de St. Croix,

Islas Vírgenes, y reportan disimilitudes en los valores proximales entre las diferentes variedades geográficas de *Artemia*, aún alimentadas con la misma dieta.

Otros estudios como los de Millikin *et al.* (1980), Gallagher y Browne (1975) y Good *et al.* (1982), que analizaron la composición proximal de poblaciones silvestres de *A. franciscana*, coinciden en que éstas mantienen diferencias importantes debidas a las condiciones ambientales y a la disponibilidad del alimento que consumen.

Algunos trabajos de tesis realizados en el Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (C.I.C.E.S.E) y en la Universidad Autónoma de Baja California (U.A.B.C.) (Paniagua-Chávez, 1993; Arriaga-Haro, 1993; González-Medina, 1994; Juárez-Carrillo, 1995 y Cervantes-Trujano, 1996), muestran el efecto de varias dietas y diferentes condiciones de cultivo en la composición bioquímica de *Artemia*, así como en el crecimiento y sobrevivencia, aportando valiosos resultados que han contribuido a tener un conocimiento más amplio de este crustáceo experimentando diversas variables. Sin embargo, no existen ensayos sobre el efecto fenotípico que puede tener el someter a una misma población a diferentes condiciones de cultivo.

II. 3 Morfometría

Es notoria la gran diversidad de trabajos que pretenden encontrar las condiciones óptimas de crecimiento de *Artemia*. Se han comparado diferentes características entre cepas o poblaciones para conocer cuales de ellas tienen potencial para emplearse en cultivos masivos. Estas comparaciones se han centrado en conocer las diferencias en crecimiento de organismos

obtenidos de poblaciones silvestres (Amat, 1980), o de organismos cultivados en laboratorio bajo condiciones de cultivo estándar (Vanhaecke y Sorgeloos, 1980), lo cual proporciona las bases para la selección de una población geográfica específica para su uso práctico.

Una vez conocidas las diferentes especies de *Artemia* existentes en los distintos biotopos, y observando que existen características disímiles en cada población, dependiendo de las condiciones en que se desarrollaba en estado silvestre, surge la inquietud por parte de algunos investigadores por conocer cual es el origen de esas diferencias entre poblaciones de la misma especie cultivadas bajo condiciones controladas de laboratorio (Amat, 1980; Vanhaecke y Sorgeloos, 1980; Correa-Sandoval *et al.*, 1994b) con diferentes alimentos (Lavens *et al.*, 1987, Castro *et al.*, 1995), diferentes concentraciones de alimento y densidades poblacionales (Abreu-Grobois *et al.*, 1991) y con varias temperaturas y salinidades (Vanhaecke *et al.*, 1984). Los resultados muestran que las tasas de crecimiento son variables, pero están estrechamente relacionadas con factores genéticos, ambientales o con la calidad y cantidad del alimento proporcionado.

Barigozzi (1974) mencionó que algunas variaciones fenotípicas que existen en *Artemia* se deben a una respuesta a fluctuaciones de salinidad, provocando modificaciones morfológicas de algunas partes del cuerpo como la furca, la cual se ve reducida a mayor salinidad así como el número de setas en la misma.

Otras modificaciones morfológicas atribuibles a mayores salinidades del medio en *A. franciscana* de España (Amat, 1980) son el aumento en la longitud relativa del abdomen y la disminución del tamaño y número de setas de los telopoditos, lo cual se menciona que

pueden ser adaptaciones a la disminución del tamaño de las partículas alimenticias en un medio de alta salinidad.

El efecto de diferentes alimentos en las tallas alcanzadas en *Artemia*, así como el tiempo en que alcanza el estado adulto, son elementales para poder proponer a este organismo como una alternativa viable en los diferentes usos que tiene dentro de la acuicultura. Sobre estos temas existen estudios que comprueban que una buena cantidad y calidad de alimento permiten resultados favorables en el crecimiento y/o sobrevivencia. En este sentido, se encuentran trabajos en donde el objetivo principal es el de encontrar o mejorar la calidad de *Artemia* directamente, mientras que en otros, ésta sirve como modelo para llevar a cabo bioensayos de calidad de microalgas y otros alimentos. Para los primeros, se tiene el trabajo de Sick (1976), que probó el efecto nutricional de varias microalgas en su eficiencia de asimilación, crecimiento, sobrevivencia y tasa de maduración sexual. Lavens *et al.* (1987), reportaron la viabilidad de la utilización de alimentos alternativos en diferentes combinaciones y a diferentes densidades de *A. franciscana* del Gran Lago Salado, encontrando diferencias en sobrevivencia, longitud, producción de biomasa y eficiencia de conversión del alimento. Asimismo, Tobias *et al.* (1980) estudiaron el efecto de la alimentación con *Chaetoceros* sp. en 17 cepas de *Artemia*, mostrando variaciones en la sobrevivencia, el tiempo en el que alcanzan la madurez sexual, la producción de biomasa y el crecimiento. Claus *et al.* (1979) probaron el efecto de adicionar dos tipos de alimento a nauplios de dos cepas diferentes de *A. franciscana* (de San Francisco Bay y del Gran Lago Salado) por un lapso de 48 horas, encontrando diferencias en el crecimiento y composición

bioquímica por el tipo de alimento y por población. Más recientemente, Abreu-Grobois *et al.* (1991), obtuvieron los resultados de cultivar varias densidades de *A. franciscana* con diferentes concentraciones y raciones de *Dunaliella*. También, Cervantes-Trujano (1996) probó la factibilidad de cultivos semi-intensivos con tres densidades de organismos con lo que mostró que 13 organismos/ml aportaron un mayor rendimiento en biomasa. Castro *et al.* (1995), comparó alimentos secos comerciales que favorecieron el crecimiento aunque no la sobrevivencia de *A. franciscana* del Gran Lago Salado. Por otro lado, debido a su ciclo de vida corto, *Artemia* permite probar el efecto que tienen diferentes calidades de alimento en su crecimiento, sobrevivencia y composición bioquímica (Paniagua-Chávez, 1993; Arriaga-Haro, 1993; González-Medina, 1994 y Sánchez-Saavedra y Voltolina, 1995).

A pesar de que existen una gran cantidad de trabajos realizados con *A. franciscana*, queda aún mucho por conocer, sobre todo en lo que se refiere a los efectos interactivos de diferentes variables (temperatura, salinidad y alimento), en sus características genéticas y fenotípicas, por lo que en el presente estudio se abordan los siguientes objetivos:

II. 4 Objetivo General

Analizar y entender si las diferentes condiciones de cultivo para *Artemia franciscana* pueden inducir a diferencias fenotípicas a partir de cambios genotípicos para los loci leucin-aminopeptidasa, fosfoglucomutasa y fosfoglucoisomerasa; analizar si las variaciones

genéticas pueden eventualmente estar correlacionadas con la composición bioquímica y la morfometría.

II. 4. 1 Objetivos particulares

- 1.- Analizar la variabilidad alelomórfica de cuatro loci polimórficos en una población de *Artemia franciscana* del Gran Lago Salado sujetas a diferentes condiciones experimentales de cultivo.
- 2.- Analizar la composición bioquímica de *Artemia franciscana* y su variación en cada una de las fracciones producida por la combinación de diferentes salinidades, temperaturas y alimentos.
- 3.- Detectar la existencia de diferencias en los caracteres morfométricos de *Artemia franciscana* cultivada en distintas condiciones experimentales de salinidad, temperatura y alimento.

III. MATERIALES Y METODOS

III. 1 Origen y procesamiento de los quistes de *Artemia franciscana*

La población que se utilizó en este estudio proviene de quistes del Gran Lago Salado EE.UU. (Sanders Brine Shrimp Company, Inc. lot.# SP 1352). Los quistes fueron descapsulados con el método del hipoclorito de sodio (Correa-Sandoval y Bückle-Ramírez, 1993a).

III. 2 Condiciones experimentales de cultivo

El experimento se basó en un diseño factorial de 2 x 2 x 2 (dos salinidades, dos temperaturas y dos alimentos) (Fig.1). Las temperaturas fueron de 22 ± 0.5 °C y de 30 ± 0.5 ° C las cuales se seleccionaron como temperaturas óptimas extremas inferior y superior, respectivamente; las salinidades de 30 ‰ y de 60 ‰ se seleccionaron bajo el mismo criterio de la temperatura; como alimento, se empleó la microalga viva *Dunalliella* sp. y *Spirulina* sp. seca comercial procedente de Sosa-Textcoco (spray-dried).

Los cultivos de *Artemia* se realizaron por triplicado y los nauplios se colocaron en acuarios de 10 l cada uno, con una densidad de 0.5 organismo \cdot ml⁻¹ (Fig. 2). Las raciones diarias de *Dunaliella* son las indicadas por Vanhaecke *et al.* (1984). En el caso de *Spirulina*, se administró en base a experiencias previas: para los dos primeros días 0.02 mg/org.; días 3 y 4 = 0.025 mg/org.; días 5 y 6 = 0.03 mg/org.; días 7 y 8 = 0.05 mg/org.; días 9 y 10 = 0.06 mg/org.;

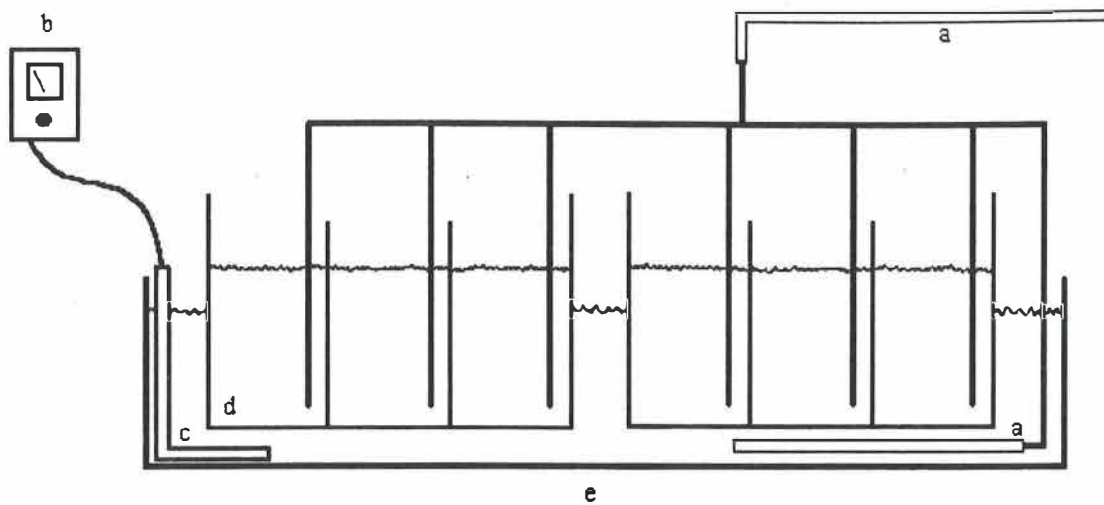


Figura 1. Esquema del diseño experimental: a) Distribución de aire para acuarios y estanque; b) Regulador de temperatura; c) Calentador de titanio; d) Acuarios con subdivisiones a diferentes salinidades; e) Estanque de 500 l

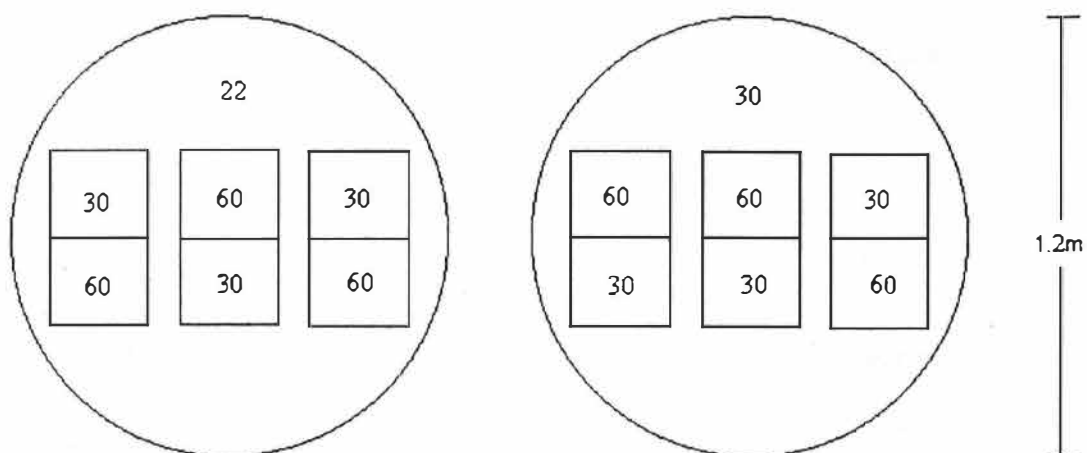


Figura 2. Esquema de la distribución de los acuarios en los estanques. Acuarios con subdivisiones de 10 l para salinidades de 30 y 60 ‰. Estanques de 500 l a temperaturas de 22 y 30 ° C.

y días subsecuentes, 0.1 mg/org. El experimento finalizó una vez que los organismos alcanzaron la talla adulta y presentaron los caracteres reproductivos desarrollados; estos se colectaron y se almacenaron a -70°C para los análisis genéticos (colectados en forma individual) y para los análisis proximales. Para los análisis morfométricos, se colectaron 30 organismos de cada una de las repeticiones y tratamientos y se conservaron en una solución fijadora con 25 ml de formol, con pH ajustado a 8 con glicerofosfato de sodio, 5 ml de propilfenoxitol y 50 ml de propilenglicol, aforados a 500 ml con agua destilada, con la que se evita el endurecimiento de los tejidos (Correa-Sandoval, 1991).

III. 3 Cultivo de microalgas

La cepa *Dunaliella* sp. (DTU-2) se obtuvo de la Colección de Microalgas del C.I.C.E.S.E. (Trujillo-Valle, 1993). Para el mantenimiento de la cepa y de los inóculos, se siguió la metodología descrita por Guillard (1985); el medio de cultivo utilizado fue f/2 (Guillard y Rythes, 1962). Se hicieron escalamientos sucesivos hasta un nivel de 18 litros. Las microalgas se cultivaron a dos salinidades, 30 y 60 ‰ (previa adaptación a esta última, aumentando la salinidad 5 ‰ cada semana). Los cultivos se mantuvieron en laboratorio bajo condiciones controladas de temperatura ($21 \pm 1^{\circ}\text{C}$), pH (7.6 - 8.0) e intensidad de luz ($120 \mu\text{E m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$).

Los cultivos se mantuvieron en sistema semicontinuo, determinándose previamente las tasas de dilución óptima para *Dunaliella* en las dos salinidades, las cuales fueron de 20 ‰

para la que se mantuvo a 60 ‰ de salinidad y 30 ‰ para la que se mantuvo a 30 ‰ de salinidad.

Para conocer la calidad de las microalgas que se les proporcionó a los organismos durante los experimentos, cada tercer día se filtraron, por triplicado, 5 ml de cada condición de cultivo de *Dunaliella* para determinar su composición proximal.

III. 4 Análisis electroforéticos

Los análisis fueron realizados con sistemas de gel de almidón al 13.5 ‰ (Sigma, # lote 123H0318), preparado de acuerdo al método de Hedgecock (Maqueda-Cornejo, 1990). Los procedimientos técnicos fueron similares a los descritos por Abreu-Grobois y Beardmore (1980), Abreu-Grobois (1983) y Correa-Sandoval y de la Rosa-Vélez (1996).

Las enzimas que se analizaron fueron: leucin-aminopeptidasa (LAP, E.C. 3.4.1.1), fosfoglucomutasa (PGM, E.C. 2.7.5.1) y fosfoglucosa-isomerasa (PGI, E.C. 5.3.1.9), las cuales resolvieron para cuatro loci (*Lap-2*, *Lap-3*, *Pgm-1* y *Pgi-1*). Los sistemas amortiguadores fueron tris-EDTA-borato pH 8.6 (TEB; Abreu-Grobois, 1983; Correa-Sandoval y de la Rosa-Vélez, 1996) para LAP y PGM; y tris-citrato/borato-hidróxido (gel pH 8.7/electrodo pH 8.2) (Poulik, 1957; Abreu-Grobois, 1983) para PGI (Tabla I). La designación alélica A, B, C, etc., se refiere al alelo que ha alcanzado la distancia mayor al ánodo desde el origen en base a la Opción #1 del programa BIOSYS-1 (Swofford y Selander, 1989). Otro programa utilizado fue GENEPOP (Raymond y Rousset, 1994). Ambos

programas aportan los principales estimadores genéticos, tales como el porcentaje de heterocigosis esperada (H_e) y el estimador D de deficiencia o exceso de heterocigotos.

Se obtuvo, después de los análisis electroforéticos, la heterocigosis observada (H_o) que es la proporción de individuos muestreados que realmente son heterocigotos (computación directa). La heterocigosis media observada se calcula a partir de la frecuencia de los individuos heterocigotos por locus al obtener la media aritmética con respecto a todos los loci.

La heterocigosis esperada (H_e), es la estimación usual basada en el equilibrio de Hardy-Weinberg. Se calcula la H_e , para cada locus, mediante la siguiente fórmula:

$$H_e = 1 - \sum (x_i^2)$$

donde x_i es la frecuencia del i -ésimo alelo del locus. La heterocigosis esperada sin sesgo (H_e (ss)) la cual está basada en las expectativas condicionales de Levene (1949) y Nei (1978) para muestras pequeñas. Se aplicó además la prueba de bondad de ajuste de χ^2 (ji-cuadrada) para la comparación de las frecuencias genotípicas observadas con las esperadas. También se obtuvo el estimador D que indica deficiencia o exceso de heterocigotos:

$$D = \frac{(H_o - H_e)}{H_e}$$

donde H_o y H_e son la heterocigosis observada y esperada, respectivamente. Un valor positivo indica un exceso y uno negativo, deficiencia de heterocigotos (Abreu-Grobois, 1983).

Del GENEPop se utilizó la opción #3 y #5 para elaborar la matriz de probabilidades, mediante la prueba exacta de Fisher en las tablas de contingencia usando el método de

Markov, donde se examina la independencia entre los tratamientos y la composición por locus. Se aplicó la prueba de Tukey (Sokal y Rohlf, 1995) de no aditividad e interactivo del análisis multifactorial para analizar si existe un efecto sinérgico de los factores y la composición alélica por locus, empleando el paquete estadístico para PC Statgraphics 4.0.

III. 5 Análisis proximales

El peso seco total y el peso seco orgánico fueron determinados de acuerdo a Sorokin (1973). Las muestras se secaron en un horno de convección a 60 ° C por 12 horas; una vez pesadas en una balanza analítica, se transfirieron a una mufla a 470 ° C por 12 horas para obtener las cenizas y por diferencia, el peso seco orgánico.

La composición proximal de *Artemia franciscana* y de *Dunaliella* sp., fué obtenida de la siguiente manera:

El contenido de proteínas fué determinado de acuerdo a Lowry *et al.* (1951) con las modificaciones de Farber-Lorda (1986). Para *A. franciscana*, la mejor extracción fué con NaOH 1N a 100 ° C por 30 minutos (Correa-Sandoval *et al.*, 1993). Para las microalgas la extracción fué con NaOH 0.25 N (Paniagua-Chávez, 1993). Para la determinación de carbohidratos, se empleó el método del fenol-sulfúrico de Dubois *et al.* (1956), después del pretratamiento de Whyte (1987). Los lípidos fueron extraídos por el método de Bligh y Dyer (1959) y determinados con el método colorimétrico de Pande *et al.* (1963). Para la cuantificación, se realizaron curvas de calibración con estándares conocidos: suero de albúmina de bovino para proteínas, glucosa para carbohidratos y tripalmitina para lípidos.

En el caso de *Spirulina* sp., se utilizó el análisis proximal proporcionado por Castro

Tabla I. Sistemas de amortiguadores utilizados y condiciones electroforéticas para leucin-aminopeptidasa (LAP), fosfoglucomutasa (PGM) y fosfoglucosa-isomerasa (PGI).

Enzima	Amortiguador		
LAP y PGM	Tris-EDTA-Borato (TEB) (Modificado de Wilson <i>et al.</i> , 1973; en Abreu-Grobois, 1983)		
	Gel:	Tris	6.06 g
		Acido bórico	1.40 g
		EDTA-Na	0.60 g
		Agua destilada	1.00 l
	Electrodo:	pH	8.6
		Tris	60.57 g
		Acido bórico	14.00 g
		EDTA-Na	5.99 g
		Agua destilada	1.00 l
	Voltaje:	200 V.	
	Amperes:	50 mA.	
	Tiempo:	7 hrs.	
PGI	Tris-Citrato/Borato-Hidróxido (Poulik) (Poulik, 1957; en Abreu-Grobois, 1983)		
	Gel:	Tris	9.21 g
		Acido cítrico	1.05 g
		Agua destilada	1.00 l
		pH	8.7
	Electrodo:	Acido bórico	18.55 g
		Hidróxido de sodio	2.40 g
		Agua destilada	1.00 l
		pH	8.2
		Voltaje:	350 V
	Amperes:	35 mA	
	Tiempo:	15 hrs.	

(com. pers.) de la Universidad Autónoma de Xochimilco, México.

III. 6 Análisis biométricos

Se obtuvieron las medidas de la longitud del cefalotórax, la longitud abdominal y, sumando ambas medidas, la longitud total de 30 individuos de cada uno de los tratamientos, con un microscopio estereoscópico adaptado con una regla micrométrica de 0.01mm (Fig. 3). Una vez obtenidas todas las medidas, se llevó a cabo un análisis de varianza de tres vías, para detectar diferencias estadísticas entre la talla total alcanzada en cada una de las condiciones de cultivo.

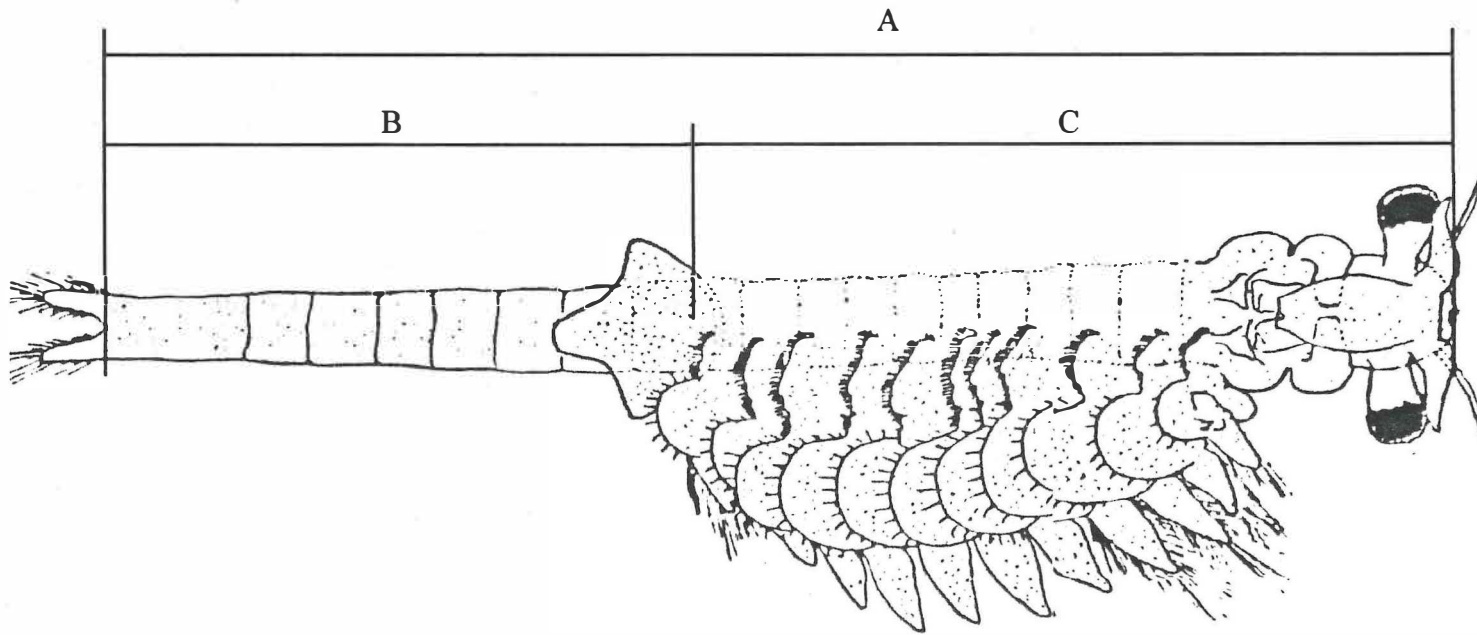


Figura 3. Esquema de las medidas morfométricas empleadas para los adultos de *Artemia franciscana*. A: longitud total; B: longitud del abdomen; C: longitud del tórax. (Modificado de Amat, 1980).

IV. RESULTADOS

IV. 1 Variabilidad alozimática

En casi todos los tratamientos en los que se cultivó *A. franciscana*, se presentaron desequilibrios en las proporciones genotípicas, según el modelo de Hardy-Weinberg. Estos desequilibrios se registraron en los loci *Lap-2*, *Lap-3* con diferencias altamente significativas ($\alpha=0.001$) y *Pgm* con diferencias muy significativas ($\alpha=0.01$) (Tabla II). Para *Pgi*, los resultados obtenidos en los tratamientos 3 y 5 están en desequilibrio con respecto a Hardy-Weinberg ($\alpha=0.05$), y en la 7 ($\alpha=0.001$).

En *Pgi*, no se presentaron deficiencias significativas de heterocigotos en ningún tratamiento, así como tampoco en el tratamiento 5 para *Lap-2* y *Pgm* (Tabla II). En el caso de *Pgm*, es interesante resaltar que los valores de D varían entre los tratamientos desde un exceso muy significativo de heterocigotos de 0.541 ($\alpha=0.01$) para el tratamiento 3, hasta una deficiencia total de heterocigotos en el caso de los tratamientos 2 y 7 ($\alpha=0.01$). Un comportamiento similar se observa en *Pgi* pero sin alcanzar una deficiencia total de heterocigotos (Tabla II). Los valores en este locus varían desde un exceso significativo ($\alpha=0.001$) de heterocigotos de 0.741 para el tratamiento 7, hasta una deficiencia no significativa ($\alpha=0.05$) de 0.088 para el tratamiento 4.

Al emplear la prueba exacta de Fisher en las tablas de contingencia usando el método de Markov del programa Genepop (Raymond y Rousset, 1994), cuyo principio es examinar la independencia de las frecuencias alélicas entre todos los pares de tratamientos para todos los

Tabla II. Variación alélica de *Artemia franciscana* del Gran Lago Salado (Utah, EE.UU.) cultivada con dos dietas (*Dunaliella* y *Spirulina*) dos temperaturas (22 y 30 °C) y dos salinidades (30 y 60 ‰). Número de organismos analizados (n), heterocigosis esperada sin sesgo (He (ss)), heterocigosis observada (Ho), deficiencia de heterocigotos (D), prueba de χ^2 según el modelo de Hardy-Weinberg (χ^2), grados de libertad (gl), desviación estándar (d.e.) y error estándar (e.e.). *P= 0.95, **P=0.99, ***P=0.999.

		<i>Dunaliella</i>				<i>Spirulina</i>			
		22 °C		30 °C		22 °C		30 °C	
Tratamientos		30 ‰	60 ‰	30 ‰	60 ‰	30 ‰	60 ‰	30 ‰	60 ‰
Locus	Alelo	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Lap-2</i>	n	26	29	13	11	32	39	35	35
	A	0.923	0.948	0.808	0.909	0.906	0.885	0.757	0.757
	B	0.077	0.052	0.192	0.091	0.094	0.115	0.243	0.243
	He(ss)	0.145	0.100	0.323	0.173	0.173	0.207	0.373	0.373
	Ho	0.000	0.034	0.077	0.000	0.125	0.026	0.029	0.086
	D	-1.000	-0.655	-0.762	-1.000	-0.276	-0.876	-0.923	-0.770
	(χ^2)gl	(34.043)1	(18.327)1	(9.143)1	(21.053)	(2.881)1	(33.288)1	(31.396)1	(21.845)1
		***	***	**	***	***	***	***	
<i>Lap-3</i>	n	34	32	29	34	39	40	39	35
	A	0.735	0.781	0.862	0.706	0.859	0.788	0.756	0.686
	B	0.265	0.219	0.138	0.294	0.141	0.213	0.244	0.314
	He(ss)	0.395	0.347	0.242	0.421	0.245	0.339	0.373	0.437
	Ho	0.000	0.063	0.000	0.000	0.026	0.125	0.026	0.057
	D	-1.000	-0.820	-1.000	-1.000	-0.896	-0.631	-0.931	-0.869
	(χ^2)gl	(35.654)1	(22.906)1	(32.653)1	(35.476)1	(34.030)1	(16.775)1	(35.390)1	(27.491)1
		***	***	***	***	***	***	***	
<i>Pgm</i>	n	14	8	29	23	21	16	7	12
	A	1.000	0.750	0.638	0.391	0.857	0.406	0.714	0.458
	B	0.000	0.250	0.362	0.609	0.143	0.594	0.286	0.542
	He(ss)	0.000	0.400	0.470	0.487	0.251	0.498	0.440	0.518
	Ho	0.000	0.000	0.724	0.174	0.190	0.188	0.000	0.083
	D	---	-1.000	0.541	-0.643	-0.241	-0.623	-1.000	-0.839
	(χ^2)gl	---	(10.182)1	(8.829)1	(9.983)1	(1.431)1	(6.668)1	(8.889)1	(9.231)1
		**	**	**		**	**	**	
<i>Pgi</i>	n	24	24	24	24	24	24	24	22
	A	0.729	0.625	0.500	0.563	0.500	0.563	0.563	0.659
	B	0.271	0.375	0.500	0.438	0.500	0.438	0.438	0.341
	He(ss)	0.403	0.479	0.511	0.503	0.511	0.503	0.503	0.460
	Ho	0.542	0.500	0.750	0.458	0.750	0.625	0.875	0.591
	D	0.343	0.044	0.469	-0.088	0.469	0.243	0.741	0.285
	(χ^2)gl	(3.015)1	(0.050)1	(5.503)1	(0.195)1	(5.503)1	(1.486)1	(13.761)1	(1.894)1
			*		*		***		
No. promedio de organismos analizados (d.e.)		24.5 (4.1)	23.3 (5.3)	23.8 (3.8)	23.0 (4.7)	29.0 (4.1)	29.8 (5.9)	26.3 (7.2)	26.0 (5.6)
No. promedio de alelos por locus (e.e.)		1.8 (0.3)	2.0 (0.0)	2.0 (0.0)	2.0 (0.0)	2.0 (0.0)	2.0 (0.0)	2.0 (0.0)	2.0 (0.0)
Ho (e.e.)		0.135 (0.135)	0.149 (0.118)	0.388 (0.202)	0.158 (0.108)	0.273 (0.163)	0.241 (0.132)	0.232 (0.214)	0.204 (0.129)
He (e.e.)		0.236 (0.099)	0.331 (0.082)	0.386 (0.063)	0.396 (0.076)	0.295 (0.074)	0.387 (0.071)	0.422 (0.031)	0.447 (0.030)

loci, se observa que para *Lap-2* (Tabla IIIa), los tratamientos 1-7, 1-8, 2-7, 2-85-7 y 5-8, se rechaza la hipótesis nula de independencia ($\alpha=0.05$) entre la variación alélica del locus y los tratamientos; es decir, existen diferencias significativas en las frecuencias alélicas entre los tratamientos. En el resto de las comparaciones locus/tratamientos, se acepta dicha independencia. En el locus *Lap-3* (Tabla IIIb) sólo en los tratamientos 3-4, 3-8, 4-5 y 5-8, se rechaza la hipótesis nula ($\alpha=0.05$). Para *Pgm* (Tabla IIIc) se rechaza la hipótesis nula, H_0 , en un 50% de las comparaciones de independencia entre los tratamientos y la variación de este locus. En *Pgi* (Tabla IIIId) sólo en los tratamientos 1-3 y 1-5 se rechaza H_0 .

El análisis multifactorial de no aditividad e interactivo de Tukey (Sokal y Rohlf, 1995) demostró, por el contrario, que no existen diferencias significativas ($F_{\alpha=0.05,1,1}= 161$) entre las frecuencias de cada loci y los efectos principales de cada uno de los factores de temperatura, salinidad y alimento.

IV. 2 Composición proximal

El porcentaje más alto de proteínas de *Artemia*, expresado en base al total de la fracción orgánica, fue obtenido con el tratamiento de 30 ° C, a 30 ‰ y alimentada con *Spirulina* sp. (68.54%) (Tabla IV). El valor más bajo fue para los organismos alimentados con *Dunaliella* sp. a 22 ° C y 60 ‰ (45.75%). En la fracción lipídica, el porcentaje más alto fue para la alimentada con *Dunaliella* a 30 ° C y 60‰ (33.52%), y el más bajo se registró con *Spirulina* a 22 ° C y 30 ‰ (10.12%). En carbohidratos, el porcentaje más alto fue con el tratamiento *Dunaliella* a 22 ° C y 60 ‰ (31.77%), y el más bajo fue para *Spirulina* a 30 ° C y 30 ‰ (11.56%).

Tabla IV. Composición proximal de adultos de *Artemia franciscana* del Gran Lago Salado (Utah, EE.UU.) cultivada en diferentes temperaturas, salinidades y alimentadas con distintas dietas. P=Proteínas; L= Lípidos; C= Carbohidratos; D= *Dunaliella*; S= *Spirulina*. Porcentajes en base al total de la fracción orgánica.

	22°C				30°C			
	30‰		60‰		30‰		60‰	
	D	S	D	S	D	S	D	S
P	47.76	64.62	45.75	57.33	63.31	68.54	49.38	61.49
L	25.36	10.12	22.04	10.88	10.87	19.88	33.52	15.04
C	26.87	25.24	32.20	31.77	25.80	11.56	17.09	23.45

Para la mayoría de los cultivos de *Artemia franciscana* a una misma temperatura y salinidad, pero alimentadas con dietas diferentes, se registraron variaciones muy evidentes en

cada uno de los parámetros bioquímicos. Sin embargo, variaciones menores se registraron en la fracción protéica para los cultivos de 30 ° C y 30 ‰ entre *Dunaliella* y *Spirulina*, donde existe una diferencia de 5.23%; y en la fracción de carbohidratos para las cultivadas a 22 ° C y 30 ‰, donde la diferencia entre las dos dietas es de 1.63% (Tabla IV).

Las diferencias observadas en cada parámetro bioquímico entre los cultivos de *Artemia*, al menos para los alimentados con *Dunaliella*, se debieron, en parte, a la disimilitud en la composición proximal de la microalga cultivada a diferentes salinidades (Tabla V). En ambas salinidades, el porcentaje más alto de proteínas de *Dunaliella* se registró a 60 ‰ (48.47 %) comparado con *Spirulina* con un 78.02 %. En lípidos, *Dunaliella* cultivada a una salinidad de 30 ‰ registró 39.17 %; y a 60 ‰ tiene 39.73 %. Ambos valores fueron diez veces más altos con respecto a *Spirulina*, que tiene 3.84 %. Para carbohidratos, el valor más alto fue para *Spirulina*, con 18.13 %, y mantiene una diferencia de 5.17 % respecto al cultivo de *Dunaliella* en 30 ‰, y de 6.35 % con la misma microalga a 60 ‰ (Tabla V).

El efecto de la dieta de *Spirulina*, en la fracción protéica, se reflejó en todos los cultivos de *A. franciscana*, donde se observaron porcentajes altos a diferentes temperaturas y salinidades (Tabla IV). Por otro lado, el efecto de *Dunaliella* en los porcentajes de lípidos, también se reflejó en casi todos los cultivos de *Artemia* donde se registra, a diferentes temperaturas y salinidades, los valores más altos respecto a *Spirulina*; excepto en el cultivo a 30 ° C y 30 ‰ (Tabla IV).

Tabla V. Composición proximal de la microalga *Dunaliella* sp. cultivada a dos salinidades, proporcionada a *Artemia franciscana* del Gran Lago Salado. Porcentajes en base al total de la fracción orgánica. ¡Cepa DU-T2, *Dunaliella* sp.

Dieta	Proteínas	Lípidos	Carbohidratos
30 ‰			
<i>Dunaliella</i> ₁	47.87	39.17	12.96
60 ‰			
<i>Dunaliella</i> ₁	48.47	39.73	11.78

IV. 3 Análisis morfométricos

Se encontró que los organismos alimentados con *Dunaliella* a 30 ° C y 30 ‰ alcanzan la longitud del tórax, longitud del abdomen, longitud total y tasa de crecimiento más altas (3.81, 3.27, 7.08, y 0.68 mm, respectivamente) (Tabla VI), mientras que para los alimentados con *Spirulina* a 30 ° C y 30 ‰ se registraron los menores valores de longitud del tórax, longitud del abdomen, longitud total y razón longitud total/tórax y tasa de crecimiento (2.81, 1.96, 4.78, 1.69 y 0.18 mm, respectivamente). La razón longitud total/abdomen mayor fue de 2.45 para los alimentados con *Spirulina* a 30 ° C y 30 ‰ y la menor de 2.16 para el mismo alimento pero a 22 ° C y 60 ‰. Por otro lado, los individuos que mostraron una razón longitud total/tórax mayor fueron los alimentados con *Spirulina* a 22 ° C y 60 ‰ (1.87).

En la Tabla VII se muestran los resultados de la comparación múltiple de rangos, en la cual se observaron grupos homogéneos, sin diferencias estadísticas significativas entre ellos, para las longitudes de tórax, abdomen y longitud total. Estos grupos están formados de la siguiente forma: los tratamientos 7 y 8, para los tres caracteres morfométricos en el primer grupo; el segundo grupo está constituido únicamente por el tratamiento 1 para los tres parámetros morfométricos; los tratamientos 4, 6 y 2, para la longitud del tórax, la longitud del abdomen y la longitud total, formando un tercer grupo; los tratamientos 3 y 5 para la longitud torácica y la longitud abdominal. En relación a la longitud total, se incluye además el tratamiento 6 y constituye el cuarto grupo. Para la razón longitud total/longitud del tórax, los grupos se conforman de la siguiente manera: los tratamientos 7 y 1 como primer grupo homogéneo; el tratamiento 8 como segundo grupo; los tratamientos 2, 4 y 5 como tercer segundo grupo; 5, 3 y 6 como cuarto grupo homogéneo. En el caso de la razón longitud total/longitud del abdomen, se forman 4 grupos, así tenemos que los tratamientos 6, 3 y 5 están dentro del primer grupo; 5, 4 y 2 en el segundo grupo; 8, 1 y 1, 7 como tercero y cuarto grupo, respectivamente.

Tabla VI. Valores promedio de los diferentes caracteres morfométricos (en mm) de adultos de *Artemia franciscana* bajo diferentes condiciones experimentales de cultivo. Número de organismos medidos (N), longitud del tórax (Tx), longitud del abdomen (Ab), longitud total (LT), razón longitud total/longitud del torax (LT/Tx), razón longitud total/longitud del abdomen (LT/Ab), días promedio de cultivo (DIAS) y tasa de crecimiento promedio diario (TC). Entre paréntesis se encuentra la desviación estándar.

Tratamientos	<i>Dunaliella</i>				<i>Spirulina</i>			
	22°C		30°C		22°C		30°C	
	30‰	60‰	30‰	60‰	30‰	60‰	30‰	60‰
	1	2	3	4	5	6	7	8
N	90	90	86	90	30	30	30	88
Tx	3.31 (0.35)	3.59 (0.31)	3.81 (0.53)	3.55 (0.34)	3.81 (0.42)	3.59 (0.39)	2.81 (0.28)	2.82 (0.42)
Ab	2.38 (0.46)	2.90 (0.44)	3.27 (0.60)	2.88 (0.53)	3.23 (0.63)	3.14 (0.59)	1.96 (0.31)	2.15 (0.53)
LT	5.70 (0.78)	6.49 (0.69)	7.08 (1.08)	6.44 (0.83)	7.05 (0.98)	6.73 (0.93)	4.78 (0.54)	4.98 (0.85)
LT/Tx	1.71 (0.08)	1.80 (0.08)	1.85 (0.09)	1.80 (0.09)	1.84 (0.11)	1.87 (0.11)	1.69 (0.08)	1.76 (0.15)
Lt/Ab	2.41 (0.17)	2.25 (0.13)	2.18 (0.14)	2.25 (0.15)	2.20 (0.15)	2.16 (0.15)	2.45 (0.19)	2.37 (0.31)
DIAS	29	27.3	10.3	10.6	26	26	26	21
TC	0.19	0.23	0.68	0.60	0.27	0.25	0.18	0.23

Tabla VII. Grupos homogéneos formados en el análisis de comparación múltiple de rangos de la longitud del tórax (Tx), abdomen (Ab), longitud total (LT), razón longitud total/tórax (LT/Tx) y razón longitud total/abdomen (LT/Ab). Los números entre paréntesis son los tratamientos: 1=22°C: 30‰: *Dunaliella*; 2=22°C: 60‰: *Dunaliella*; 3=30°C: 30‰: *Dunaliella*; 4=30°C: 60‰: *Dunaliella*; 5=22°C: 30‰: *Spirulina*; 6=22°C: 60‰: *Spirulina*; 7=30°C: 30‰: *Spirulina*; 8=30°C: 60‰: *Spirulina*.

Tx	<u>2.81</u>	<u>2.82</u>	3.31	<u>3.55</u>	<u>3.59</u>	<u>3.59</u>	<u>3.81</u>	<u>3.81</u>
	(7)	(8)	(1)	(4)	(6)	(2)	(3)	(5)
Ab	<u>1.96</u>	<u>2.15</u>	2.38	<u>2.88</u>	<u>2.90</u>	<u>3.14</u>	<u>3.23</u>	<u>3.27</u>
	(7)	(8)	(1)	(4)	(2)	(6)	(5)	(3)
LT	<u>4.78</u>	<u>4.98</u>	5.70	<u>6.44</u>	<u>6.49</u>	<u>6.73</u>	<u>7.05</u>	<u>7.08</u>
	(7)	(8)	(1)	(4)	(2)	(6)	(5)	(3)
LT/Tx	<u>1.69</u>	<u>1.71</u>	1.76	<u>1.80</u>	<u>1.80</u>	<u>1.84</u>	<u>1.85</u>	<u>1.87</u>
	(7)	(1)	(8)	(2)	(4)	(5)	(3)	(6)
LT/Ab	<u>2.16</u>	<u>2.18</u>	<u>2.20</u>	<u>2.25</u>	<u>2.25</u>	<u>2.37</u>	<u>2.41</u>	<u>2.45</u>
	(6)	(3)	(5)	(4)	(2)	(8)	(1)	(7)

V. DISCUSION

V. 1 Variabilidad genética

De acuerdo al modelo de Hardy-Weinberg, en la mayoría de los loci/tratamientos se presentaron deficiencias de heterocigotos caso contrario a lo mencionado por Hawkins *et al.* (1988) quien menciona que los heterocigotos poseen una mayor capacidad de resistir perturbaciones debidas a los cambios ambientales. Sin embargo, las diferencias encontradas en las frecuencias alélicas en algunos loci y los niveles de heterocigosis pueden estar basados en mejores desempeños metabólicos del organismo para cada una de las condiciones de cultivo de acuerdo a lo mencionado por Hilbish y Koehn (1985). En este caso, para las diferentes frecuencias alélicas y los distintos niveles de deficiencia de heterocigotos encontrados en *Pgm*, *Lap-2* y *Lap-3*, existen dos posibles explicaciones. La primera es que estas variaciones probablemente se deban a la sobrevivencia selectiva en las diferentes condiciones de cultivo la cual fue entre 18 y 35 % para los alimentados con *Spirulina* y *Dunaliella*, respectivamente. La segunda posibilidad es que se deba a un efecto al azar, sin embargo, este factor se disminuye debido al número de organismos analizados para cada loci, excepto para *Pgm*, donde el azar es más factible que influyera en el análisis estadístico.

Es evidente que se observan cambios significativos en las frecuencias alélicas entre los tratamientos por loci, según lo indican los análisis estadísticos, al rechazarse la hipótesis nula de acuerdo al método de Markov del Genpop. Sin embargo, el análisis multivariado

señala que no son significativas tales diferencias, ni por el efecto de cada uno de los factores, ni por las combinaciones entre estos, ya que los grados de libertad fueron la unidad.

Para tratar de explicar las diferencias observadas en función de las condiciones experimentales, es necesario considerar otros estudios como los de Moon y Hochachka (1971), Graves y Somero (1982), Hochachka y Somero (1984), y Busack (1988) quienes demostraron que existe una correlación entre la temperatura o la salinidad y las frecuencias alélicas y genóticas de las distintas poblaciones y subpoblaciones de una misma especie. Se ha observado que los productos alélicos específicos tienen diferentes actividades catalíticas en función de la temperatura y de la salinidad. En el presente estudio se observa que manteniendo a una misma población en ocho condiciones diferentes, se presentan diferentes grados de heterocigosis que posibilitan a esta población a ajustarse y sobrevivir, consecuentemente con su flexibilidad genética y fisiológica.

En diferentes trabajos se han encontrado relaciones directas o inversas entre las frecuencias de diferentes alelos a condiciones específicas del ambiente. Por ejemplo, se ha demostrado que diferentes alelos de LAP en *Mytilus* tienen diferentes cinéticas enzimáticas que inciden directamente en la producción de aminoácidos libres y, por lo tanto, en la regulación de la presión osmótica (Koehn, 1985). Asimismo, se encontró que existe una sobrevivencia selectiva para aquellos organismos que tienen determinado alelo, como es el caso de *Lap*⁹⁴ en aguas oceánicas. Este alelo específico, tiene una eficiencia relativamente alta en ambientes hiperosmóticos (Koehn, 1985). También Hoffman (1985) demostró que en la anémona *Metridium senile* los productos enzimáticos producidos por diferentes genotipos de

Pgi tienen diferencias en las actividades catalíticas. Resalta que existen incrementos de 2.5 a 3 veces de esta actividad en los genotipos *Pgi*^{ff} con respecto a los *Pgi*^{ss}. Además, encontró diferencias en la glucogénesis (K_m) de la fructosa 6 fosfato que fue ligeramente más alta en *Pgi*^{ff} que en *Pgi*^{ss} en un intervalo de temperatura de 5 a 25 ° C y tuvo un comportamiento inverso en la dirección glicolítica.

Por otro lado, Middleton y Kacser (1983), mencionan que es difícil conocer con exactitud el efecto de un solo locus sobre el control de las complejas vías metabólicas.

En el caso de que se encontraran diferencias cinéticas entre las enzimas de los distintos loci en *A. franciscana*, estas propiedades deben traducirse en diferencias en el metabolismo y probablemente contribuyen verdaderamente a una adaptación provocada selectivamente por el ambiente. Lo que se demuestra en este estudio, es que diferentes condiciones de salinidad, temperatura y alimento muestran distintos niveles de heterocigosis, en algunas significativamente diferentes, en los loci entre los tratamientos debidas a la selección producida en cada uno de los ambientes experimentales. Quizá el reto más grande es entender la extensión en las diferencias genéticamente determinadas en el mantenimiento o conservación del metabolismo como una respuesta a distintos ambientes.

Bajo este enfoque, este trabajo es un primer intento y un primer paso para conocer más a fondo el éxito adaptativo de *Artemia franciscana*. Queda pendiente por resolver la caracterización bioquímica de estas alozimas para poder demostrar en forma definitiva que tales productos alozimáticos de los genes tienen diferentes velocidades catalíticas y que

afectan directamente las tasas de flujo metabólico y que, por lo tanto, le confieren un mejor ajuste y sobrevivencia.

V. 2 Composición proximal

Al comparar los resultados de la composición proximal de *A. franciscana* del Gran Lago Salado del presente estudio con los de otros autores (Tabla VIII), se observa que en relación a las proteínas, el valor fue más alto (excepto para el tratamiento a 22 ° C y 60 ‰) con la dieta *Spirulina* respecto al de Correa-Sandoval *et al.* (1994a) que fue alimentada con *Chaetoceros* y a la población de *Artemia* de San Francisco Bay de Millikin *et al.* (1980). Sin embargo, los valores del presente estudio son inferiores a los reportados por Millikin *et al.* (1980), Gallagher y Brown (1975) y de Good *et al.* (1982) de San Diego y de San Francisco Bay, respectivamente. En lípidos, el porcentaje más alto (33.52 %) se registra en los organismos alimentados con *Dunaliella* a 30°C y 60 ‰ en comparación al resto de las poblaciones de los diversos autores, los cuales varían desde 3.42 % a 32.21 % (Tabla VII). En carbohidratos, el valor más alto (31.77 %) se registra para la población alimentada con *Spirulina* y cultivada a 22 ° C y 60 ‰, en comparación a los otros estudios que varían desde 2.64 % a 24.52 % (Tabla VIII).

Las diferencias bioquímicas registradas en el presente estudio, para la población de *A. franciscana* del Gran Lago Salado, demuestran una gran variabilidad en su composición, no sólo debidas a la calidad de la dieta que se administró, sino también al efecto producido por la salinidad y la temperatura. Por ejemplo, en los cultivos con la dieta de *Dunaliella* a 30 ‰

cultivada a 22 y 30 ° C, existe una diferencia en el contenido de proteínas de 15.55 % entre ambas temperaturas. En los cultivos alimentados con la misma microalga a 30 ° C pero a salinidades de 30 ‰ y 60 ‰, existe una diferencia de 13.93 % de proteínas entre ambas salinidades. De acuerdo con Tobias *et al.* (1980) y con Correa *et al.* (1994a), las disimilitudes en la composición proximal de *Artemia* de una misma población geográfica cultivadas en condiciones de laboratorio, están en función del tipo y calidad del alimento.

Tabla VIII. Composición proximal de adultos de *Artemia franciscana*. Porcentajes en base al total de la fracción orgánica. (A)= alimentada con *Chaetoceros* cultivada en medio f/2; (B)= alimentada con *Chaetoceros* cultivada con fertilizantes agrícolas. G.L.S.= Gran Lago Salado, Utah, ; S.F.B.= San Francisco Bay, California, EE.UU.

Población	Proteínas	Lípidos	Carbohidratos	Autor
G.L.S. (A)	55.62	30.92	13.44	Correa <i>et al.</i> , 1994a
G.L.S. (B)	60.66	32.21	7.11	Correa <i>et al.</i> , 1994a
San Diego	75.65	14.18	10.16	Millikin <i>et al.</i> , 1980
S.F.B.	66.09	14.26	19.63	Millikin <i>et al.</i> , 1980
S.F.B.	73.04	24.30	2.64	Gallagher y Brown, 1975
S.F.B.	72.04	3.42	24.52	Good <i>et al.</i> , 1982

Sin embargo, en este estudio se encontraron, además, diferencias debidas a las condiciones de temperatura y de salinidad a las que fue mantenida una misma población. Una ventaja de este tipo de variación es que se obtienen biomásas de diferente perfil bioquímico, que puedan utilizarse de acuerdo a las necesidades nutricionales de los peces y camarones.

V. 3 Morfometría

Al observar el resultado de la comparación múltiple por rangos (Tabla VII), para las longitudes del tórax, del abdomen y la longitud total, se detecta un patrón común de agrupamiento el cual está conformado por los organismos que se mantuvieron a 30 ‰ de salinidad. En este grupo se registran los mayores promedios obtenidos y que corresponden a los tratamientos 3 y 5. En lo que se refiere al segundo patrón, el cual está relacionado también con la salinidad (60‰), se obtienen los valores intermedios en tallas y corresponde a los tratamientos 4, 6 y 2. El tercer patrón tiene como factor común la temperatura de 30 °C y el alimento *Spirulina*; en este se ubican los tratamientos 7 y 8 los cuales resultaron ser los de menor talla. Se observa también un patrón único el cual corresponde al alimentado con *Dunaliella*, mantenido a 22 °C y a 30 ‰. Este grupo mantiene tallas mayores al grupo 7 y 8. Para las razones longitud total/tórax y longitud total/abdomen, se observan patrones similares, sólo que en la última se forma un grupo más (tratamientos 8 y 1 y 1 y 7) y además se ubican entre las razones más bajas, mientras que para longitud total/tórax, el grupo formado por los tratamientos 7 y 1 se encuentran como las mayores razones y teniendo como factor común la salinidad (30 ‰). Para el grupo 8 y 1 se observa que no existe un factor que los agrupe, ya que pertenecen a tratamientos diferentes en cuanto a alimento, salinidad y temperatura. Para estas mismas razones, el grupo formado por los tratamientos 2, 4 y 5 ó 4, 2 y 5, los dos primeros (2 y 4) tienen como factor común el alimento (*Dunaliella*) y la salinidad (60 ‰) mientras que 2 y 5 el factor de agrupamiento es la temperatura (22 °C).

No existen trabajos en donde, para una misma población, se compare el efecto que tiene la combinación de los tres factores que aquí se probaron, por lo que sólo condiciones similares o cercanas a las del presente estudio pueden ayudar a explicar los resultados obtenidos.

Vanhaecke y Sorgeloos (1980), reportaron el crecimiento de diferentes cepas de *Artemia*, encontrando a las poblaciones del Gran Lago Salado entre las que alcanzan mejores crecimientos a los 7 días de cultivo y alimentadas con *Dunaliella viridis*, a 25 ° C y agua de mar. Lo anterior puede ser comparable con lo obtenido en este trabajo para los organismos alimentados con *Dunaliella* a 30 ° C y 30 ‰, sólo que en el presente estudio a los 10.33 días alcanzaron la mayor talla promedio y la madurez sexual, por lo que la temperatura y el alimento juegan un papel fundamental para obtener estos resultados. Aunque organismos alimentados con *Spirulina* a 22 ° C y 30 ‰ también mostraron longitudes semejantes a los de *Dunaliella* a 30 ° C y 30 ‰, los primeros las alcanzaron en mayor tiempo (26 días). Cabe mencionar que los cultivos en donde el alimento fue *Spirulina* seca, se observó una sobrevivencia más baja (18 %) con respecto a *Dunaliella* (35 %). Lavens *et al.* (1987) mencionaron que niveles mayores a 28 % de proteínas en el alimento proporcionado a los organismos, deterioran la calidad del mismo, afectando negativamente su rendimiento. Ya que ambos alimentos utilizados en este trabajo, sobrepasaron este porcentaje (48 y 78 % para *Dunaliella* y *Spirulina*, respectivamente), este factor pudo influir en la sobrevivencia, más evidentemente en el caso de *Spirulina*.

Castro *et al.* (1995), reportaron el crecimiento de *Artemia franciscana* del Gran Lago Salado alimentada con 3 dietas, una de las cuales contiene una mezcla de *Spirulina* y levadura enriquecida, alcanzando tallas similares a la condición de *Spirulina* a 22 ° C y 30 ‰ de este trabajo, pero con una sobrevivencia aún menor (5.14 %) a la del presente estudio (18%).

El análisis multivariado de no aditividad e interactivo mostró que no existen diferencias significativas entre los tratamientos con respecto a la longitud total. Aunque los grados de libertad fueron la unidad, en la comparación de medias e intervalos de confianza, se observa la existencia de diferencias significativas.

VI. DISCUSION GENERAL

En la Tabla IX, se presenta un resumen de los principales resultados genéticos, bioquímicos y morfométricos de los organismos sometidos a las diferentes condiciones de cultivo en el presente estudio. Al considerar el grado de heterocigosis observada promedio, se observa que los organismos que presentaron los niveles más altos (0.388, 0.273 y 0.241), estuvieron sometidos, en el caso del primero, a temperatura alta y salinidad baja y alimentado con *Dunaliella*, mientras que los otros dos tuvieron las condiciones de temperatura baja y salinidad baja y alta, respectivamente, y alimentados con *Spirulina*. La heterocigosis observada promedio más baja, se manifestó en condiciones de salinidad baja, temperatura baja y con el alimento *Dunaliella* (0.133). Estos resultados, no muestran una tendencia que indique que estas variaciones se puedan atribuir a un solo factor, de manera contundente. Por lo tanto, es probable que exista un efecto sinérgico entre la salinidad y la temperatura, y probablemente el alimento. Al observar las diferentes características fenotípicas, los organismos con mayor grado de heterocigosis, tuvieron la mayor longitud total y velocidad de crecimiento (7.08 y 0.68 mm, respectivamente). Al analizar los cuatro loci por separado (Tablas Xa-Xd), se observan variaciones importantes. Para *Lap-2*, no se observa que algún factor marque las diferencias entre niveles altos o ausencia de heterocigotos, mientras que para *Lap-3*, como en el caso de la heterocigosis promedio, una combinación de temperatura baja y salinidad alta permite la sobrevivencia de organismos con heterocigosis mayor, la cual se refleja, en este caso, en tallas intermedias. En *Pgm*, la heterocigosis observada tampoco se encuentra relacionada de manera clara con algún factor, pero es importante resaltar que los

grados de heterocigosis más altos, se presentan en organismos con talla mayor, por lo que este locus posiblemente es más eficiente en forma heterocigota al destinar su energía para metabolismo básico, y la derivada de las diferentes fracciones del alimento, al crecimiento, comparado con condiciones de cultivo donde no se presentó ningún heterocigoto y en general, menores crecimientos. Para *Pgi*, se observa una relación de los grados mayores de heterocigosis asociados a temperatura alta y salinidad baja, por lo menos en dos de estos. Estos resultados muestran, como se había señalado, que probablemente existe un efecto sinérgico entre las diferentes salinidades y temperaturas en la sobrevivencia de organismos heterocigotos y para los diferentes loci según la función que deben llevar a cabo bajo diferentes condiciones ambientales.

Para el locus *Lap*, se ha demostrado con una serie de trabajos de cinética enzimática, citológicos y de alozimas, que posee diferentes niveles de respuesta a cambios de salinidad en el ambiente. Por ejemplo, en *Mytilus edulis* (Koehn, 1978) se ha encontrado una de las evidencias más importantes de que existe una función adaptativa de este locus en poblaciones naturales. En el presente estudio, los grados de heterocigosis mayores de *Lap-3*, pueden estar relacionados a la presencia de una concentración mayor de sales en el ambiente, permitiendo que estos genotipos tengan alguna ventaja con respecto a los homocigotos, aunque, como se había mencionado, en combinación con la temperatura.

Cossins y Bowler (1987) mencionaron que la temperatura es un factor que causa variación genotípica, actuando como un factor importante en la canalización para producir organismos adultos de diferentes desempeño (definiendo canalización como el estado

fisiológico o las propiedades de un organismo que son influidas por las experiencias térmicas en los primeros estadios de desarrollo, según su experiencia térmica reciente).

Es importante señalar también que los estudios electroforéticos realizados en *Artemia* han mostrado la existencia de altos grados de variación genética (Gajardo *et al.* 1995). Así, los índices que se utilizan normalmente para su cuantificación tales como proporción de loci polimórficos, heterocigosidad esperada y número promedio de alelos por locus, son de los más altos encontrados entre los crustáceos, así como de una variedad de especies de invertebrados, y mencionaron que esta plasticidad genética puede estar asociada con las condiciones ecológicas particularmente impredecibles encontradas en muchos habitats de *Artemia*.

Esto puede apoyar los resultados de que un mayor grado de heterocigosis no siempre se traduce en un mayor crecimiento, pero sí en un mejor ajuste a condiciones extremas, o en un mejor desempeño en la reproducción, como lo señalan Zapata *et al.* (1990), quienes encontraron en *Artemia franciscana* una relación positiva entre el nivel de heterocigosis y el éxito reproductivo de los machos. En forma general, Koehn (1991) mencionó que los organismos con mayores grados de heterocigosis se acercan más a eficiencias máximas por ser funcionalmente intermedios, con la consecuencia de que cambios en los flujos y eficiencias tienen un cambio en el costo, así, efectos fenotípicos de alta heterocigosidad son más grandes bajo condiciones de estrés energético, ya que los requerimientos de energía para el mantenimiento aumentan. Esto también podría explicar que los organismos analizados, desde el punto de vista de su bioquímica o en algunos casos de su crecimiento, no estén

positivamente relacionados a su grado de heterocigosis, pero que estos individuos puedan sobrevivir y reproducirse, derivando la energía proporcionada por el alimento a mantener las funciones vitales más que a crecer o a almacenarlas, y que en última instancia es lo que permite que *Artemia* sea un organismo que se encuentra en ecosistemas que otros organismos no pueden explotar.

Con lo anterior, se deben contemplar líneas de investigación que permitan verificar y reforzar los resultados de que el aumento en las frecuencias de heterocigotos, para diferentes loci en *Artemia franciscana*, se refleja en mejores desempeños, los cuales se traducen en mayores tasas de reproducción y mayores eficiencias metabólicas. Además, estas características pueden proporcionar alguna ventaja a los organismos, tanto a nivel de individuos o de poblaciones, en condiciones naturales y también para su utilización directa en la acuicultura.

Tabla IX. Resumen de resultados de heterocigosis promedio observada (Ho) para 4 loci de *Artemia franciscana* en las diferentes condiciones de cultivo. *Dunaliella* sp. (D), *Spirulina* sp. (S) Longitud total (LT), crecimiento promedio por día, longitud del tórax (Tx.), longitud del abdomen (Ab), razones longitud total/torax (LT/Tx) y longitud total/abdomen (LT/Ab) y porcentaje de proteínas (P), lípidos (L) y carbohidratos (C).

Ho	Temp. °C	Salin. ‰	Dieta	LT mm	Crecim. mm/día	Tx	Ab	Razón LT/Tx	Razón LT/Ab	P %	L %	C %
0.388	30	30	D	7.08	0.68	3.81	3.27	1.85	2.18	63.31	10.87	25.80
0.273	22	30	S	7.05	0.27	3.81	3.23	1.84	2.20	64.62	10.12	25.24
0.241	22	60	S	6.73	0.25	3.59	3.14	1.87	2.16	57.33	10.88	31.77
0.232	30	30	S	4.78	0.18	2.81	1.96	1.69	2.45	68.54	19.88	11.56
0.204	30	60	S	4.98	0.23	2.82	2.15	1.76	2.37	61.49	15.04	23.45
0.158	30	60	D	6.44	0.60	3.55	2.88	1.80	2.25	49.38	33.52	17.09
0.149	22	60	D	6.49	0.23	3.59	2.90	1.80	2.25	45.75	22.04	32.20
0.135	22	30	D	5.70	0.19	3.31	2.38	1.71	2.41	47.76	25.36	26.87

Tabla Xa. Heterocigosis observada (Ho) del locus *Lap-2*, condiciones de cultivo y longitud total (mm) de *Artemia franciscana*.

Ho	Dieta	Temperatura °C	Salinidad ‰	Longitud Total
0.125	S	22	30	7.05
0.086	S	30	60	4.98
0.077	D	30	30	7.08
0.034	D	22	60	6.49
0.029	S	30	30	4.78
0.026	S	22	60	6.73
0.000	D	22	30	5.70
0.000	D	30	60	6.44

Tabla Xb. Heterocigosis observada (Ho) del locus *Lap-3*, condiciones de cultivo y longitud total (mm) de *Artemia franciscana*.

Ho	Dieta	Temperatura °C	Salinidad ‰	Longitud Total
0.125	S	22	60	6.73
0.063	D	22	60	6.49
0.057	S	30	60	4.98
0.026	S	22	30	7.05
0.026	S	30	30	4.78
0.000	D	30	30	7.08
0.000	D	22	30	5.70
0.000	D	30	60	6.44

Tabla Xc. Heterocigosis observada (Ho) del locus *Pgm*, condiciones de cultivo y longitud total (mm) de *Artemia franciscana*.

Ho	Dieta	Temperatura °C	Salinidad ‰	Longitud Total
0.724	D	30	30	7.08
0.190	S	22	30	7.05
0.188	S	22	60	6.73
0.174	D	30	60	6.44
0.083	S	30	60	4.98
0.000	D	22	30	5.70
0.000	D	22	60	6.49
0.000	S	30	30	4.78

Tabla Xd. Heterocigosis observada (Ho) del locus *Pgi*, condiciones de cultivo y longitud total (mm) de *Artemia franciscana*.

Ho	Dieta	Temperatura °C	Salinidad ‰	Longitud Total
0.875	S	30	30	4.78
0.750	S	22	30	7.05
0.750	D	30	30	7.08
0.625	S	22	60	6.73
0.591	S	30	60	4.98
0.542	D	22	30	5.70
0.500	D	22	60	6.49
0.458	D	30	60	6.44

VII. CONCLUSIONES

Artemia franciscana del Gran Lago Salado sometida a diferentes condiciones de cultivo (dos temperaturas, 22 y 30 ° C, dos salinidades, 30 y 60 ‰ y dos alimentos, *Spirulina* seca y *Dunaliella* viva) presentó variaciones desde el punto de vista genético, bioquímico y morfológico de la siguiente manera:

La mayor parte de los tratamientos para los loci *Lap-2* y *Lap-3* presentaron diferentes grados de deficiencias de heterocigotos con respecto al Equilibrio de Hardy-Weinberg. Para el primero, no se observó que los mayores grados de heterocigosis observada se encuentren asociados a algún factor, pero para *Lap-3*, se observa un efecto sinérgico entre temperatura baja y salinidad alta, por lo que estos factores pueden ser determinantes en la selección de heterocigotos para este locus, bajo estas condiciones ambientales.

Las diferencias en los grados de deficiencia de heterocigotos en *Pgm* mostraron un patrón de comportamiento similar que en *Lap-2* y *Lap-3*, sólo que en este locus se presentó desde un exceso moderado de heterocigotos, hasta una deficiencia total de estos, lo que confirma la flexibilidad genética y fisiológica de estos organismos. En lo que se refiere a la heterocigosis observada, tampoco se encontró relacionada con algún factor, pero se reflejó en una mayor longitud total y mayor velocidad de crecimiento (7.08 y 0.68 mm, respectivamente).

En *Pgi* se presentaron diferentes grados de exceso de heterocigotos, lo cual posiblemente este relacionado con la función de este locus en mayor o menor medida en las

diferentes condiciones de cultivo. En cuanto a la heterocigosis observada, se encontró que las mayores se presentaron en tratamientos con temperatura alta y salinidad baja, por lo que existe también un efecto sinérgico de estos factores.

Los organismos de aquellos tratamientos en donde se registró el mayor promedio de heterocigosis observada, para los cuatro loci analizados, se encontraron asociados a temperaturas alta y baja y a salinidad baja. Estos individuos también mostraron las mayores longitudes totales (7.08 y 7.05 mm) y, para los primeros, la mayor velocidad de crecimiento (0.68 mm).

Se encontró que los organismos alimentados con *Spirulina* seca comercial, tuvieron un porcentaje menor de sobrevivencia (18%) que los alimentados con *Dunaliella* viva (35 %), por lo que este constituye un alimento mejor.

Se observaron diferentes perfiles en las fracciones orgánicas de *Artemia franciscana*, debidas a las condiciones de cultivo. Estas variaciones reflejan principalmente la composición del alimento proporcionado, sobre todo en lo que se refiere a las proteínas y los lípidos, pero en los que también se observa la influencia de la salinidad y la temperatura. Se obtuvo el mejor porcentaje de proteínas a temperatura alta y salinidad baja y con el alimento *Spirulina*. Los lípidos se encontraron en mayor porcentaje en organismos a temperatura y salinidad altas con *Dunaliella*. Se observa el porcentaje de carbohidratos más alto en organismos a temperatura baja y salinidad alta, y alimentados con *Spirulina*. Las diferencias registradas en cada una de las fracciones del perfil bioquímico, pueden ser utilizadas según las necesidades

de los cultivos en los que *Artemia* cumple un papel fundamental en la sobrevivencia de estadios larvarios y en el crecimiento y/o la maduración sexual de peces y crustáceos.

En relación al crecimiento de *Artemia*, se encontró que estuvo influenciado por la salinidad, ya que las longitudes del tórax, del abdomen y total fueron mayores a salinidad baja; además, la maduración sexual resultó ser más rápida en los organismos alimentados con *Dumaliella* a temperatura alta y salinidad baja, alcanzando, bajo estas condiciones de cultivo, el estado reproductivo más rápidamente.

LITERTURA CITADA

- Abreu-Grobois, F.A. 1983. Population genetics of *Artemia*. Ph. D. Thesis. University of Wales, Swansca, U.K. 438 p.
- Abreu-Grobois, F.A. y J.A. Beardmore. 1980. International Study on *Artemia*. II. Genetic characterization of *Artemia* population-an electrophoretic approach. En: Persoone G., P. Sorgeloos, O. Roels y E. Jaspers (eds.). The brine shrimp *Artemia*. Universa Press. Watteren, Belgium. 133-146.
- Abreu-Grobois, F.A. y J.A. Beardmore. 1982. Genetic differentiation and speciation in the brine shrimp *Artemia*. En: Barigozzi C. (ed.). Mecanisms of Speciation. Alan R. Liss Inc., New York. 345-376.
- Abreu-Grobois, F.A., R. Briseño-Dueñas, M.A. Herrera y M.L. Malagón. 1991. A model for growth of *Artemia franciscana* cultures based on food ratio-dependent gross efficiencies. *Hidrobiología* 212: 27-37.
- Amat, D. 1980. Differentiation in *Artemia* strains from Spain.. En: Persoone G., P. Sorgeloos. O. Roels and E. Jaspers (eds.). The brine shrimp *Artemia*. Vol. 1. Morfology, Genetics, Radiology, Toxicology Universa Press. Watteren, Belgium. 345 p.
- Arriaga-Haro, M. 1993. Evaluación de dos dietas frescas y una preservada para *Artemia franciscana*, Kellogg, 1906. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, México. 53 p.

- Barigozzi, C. 1974. *Artemia*: A survey of its significance in genetic problems. *Evol. Biol.* 7. 221-252.
- Bligh E. y W. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917.
- Bradley, B. P. 1978. Genetic and physiological flexibility of a calanoid copepod in thermal-stress. En: Thorp, J. H. y J.W. Gibbons (eds.). *Energy and environmental stress in aquatic systems*. Technical Information Center U.S. Department of Energy, U.S.A. 452-469.
- Browne, R.A. y S.T. Bowen. 1991. Taxonomy and population genetics of *Artemia*. En: Browne, R.A., P. Sorgeloos y C.N. Trotman (eds.). *Artemia biology*. CRC Press, Boca Raton, Florida. 221-235.
- Busack, C.A. 1988. Electrophoretic variation in the red swamp (*Procambarus clarkii*) and white river crayfish (*P. acutus*) (Decapoda: Cambaridae). *Aquaculture*. Vol. 69. 211-226.
- Caro-Caro, C. 1991. El efecto del hierro en la oviparidad de una población de *Artemia franciscana*, Kellog, 1906. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, B.C. México. 88 p.
- Castro, T., F.M. Ayala, M.J. Castro, S.A. Malpica, A.R De Lara, y F.R. Gelabert. 1995. Evaluación de tres dietas en el crecimiento y sobrevivencia de *Artemia franciscana* en condiciones controladas. *Oceanología*. Vol. 3: 36-41.

- Claus, C., F. Benijts, G. Vandeputte y W. Gardner. 1979. The biochemical composition of the larvae of two strain of *Artemia salina* (L.) reared on two different algal foods. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. Vol. 36: 171-183.
- Cervantes-Trujano, M. 1996. Evaluación de tres densidades de *Artemia franciscana* cultivada en condiciones de laboratorio y costos de producción. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Autónoma de Baja California. Instituto de Investigaciones Oceanológicas, Ensenada, B. C. México. 77 p.
- Correa-Sandoval, F. 1991. Caracterización biológica y bioquímica de algunas poblaciones de *Artemia franciscana* Kellog, 1906. Tesis de Doctor en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, B. C. México. 117 p.
- Correa-Sandoval, F. y L.F Bückle-Ramírez. 1993a. Morfología y biometría de cinco poblaciones de *Artemia franciscana*. Rev. Biol. Trop. 41: 103-111.
- Correa-Sandoval, F., L.F Bückle-Ramírez y J. de la Rosa-Vélez. 1993b. Hibridación en algunas poblaciones de *Artemia franciscana*. Rev. Biol. Trop. 41: 97-101.
- Correa-Sandoval, F., L.F. Bückle-Ramírez y D. Voltolina-Lobina. 1993c. The biochemical composition of cyst of some mexican populations of *Artemia franciscana*, Kellog, 1906. Comp. Biochemical Physiol. 104 (B): 163-167.
- Correa-Sandoval F., B. Cordero-Esquivel, E. Valenzuela-Espinoza, y R. Escobar-Fernández. 1994a. Biochemical composition of laboratory cultured adults of *Artemia franciscana*, Kellog, 1906. Riv. Italian. Acquac. 29: 63-66.

- Correa-Sandoval, F., D. Voltolina-Lobina, L.F. Bückle-Ramírez y B. Cordero-Esquivel. 1994b. The growth rates of four populations of *Artemia franciscana* (Anostraca: Artemiidae). Rev. Biol. Trop. 42: 605-609.
- Correa-Sandoval, F. y J.de la Rosa-Vélez. 1996. Allozymatic variation in three populations of *Artemia franciscana*, Kellog, 1906, from Mexico. Proceedings of improvement of the Comercial Production of Marine Aquaculture Species. Univ. de los Lagos (Chile) y la Unión Europea.
- Cossins, A.R. y K.T. Bowler. 1987. Temperature biology of animals. Chapman and Hall. 339 p.
- Diehl, W.J., P.M. Gaffney y R. K. Koehn. 1986. Physiological and genetic aspects of growth in the mussel *Mytilus edulis*. I. Oxygen consumption, growth and weight loss. Physiol. Zool. 59: 201-211.
- Dubois, M., K. Gilles, J. Hamilton, P. Rebers y F. Smith. 1956. Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28: 350-356.
- Farber-Lorda, J. 1986. Etudes biologiques, energetiques et biochimiques du krill antarctique *Euphasia superba* et *Thysanoessa macrura* recolecte au cours de la campagne Fibex. Ph. D. Thesis, Universite d'Aix-Marseille II. 214 p.
- Gajardo, G., M. Conceicao, L. Weber y A. Beardmore. 1995. Genetic variability and interpopulational differentiation of *Artemia* strains from South America. Hidrobiologia 302: 21-29.

- Gallagher, M. y W. Browne. 1975. Composition of San Francisco Bay brine shrimp *Artemia*. J. Agric. Food. Chem. 23: 630-632.
- Garton, D.W. 1984. Relationship between multiple locus heterozygosity and physiological energetics of growth in estuarine gastropod *Thais haemostoma*. Physiol. Zool. 57: 530-543.
- Garton, D.W., R.K. Koehn y T.M. Scott. 1985. The physiological energetics of growth in clam *Mulinexa lateralis*: an explanation for the relationship between growth rate and individual heterozygosity. Contribution No. 522 in the Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook.
- Good, L., R. Bayer, M. Gallagher y J. Rittemburg. 1982. Amphipods as a potential diet for juveniles of American lobster *Homarus americanus* (Milne Edwards). J. Shellfish Res. 2:183-187.
- González-Medina, S. 1994. Cultivo de *Artemia franciscana* en agua de salinidad reducida. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, B.C. México. 74 p.
- Gozalbo, A. y F. Amat. 1988. Composición bioquímica de biomasas silvestres de *Artemia* (Crustacea, Brachipoda, Anostraca). Inv. Pesq. 52:375-385.
- Guillard, R.R.L. 1985. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. En: Smith W.L. y M.H. Chanley (eds.). Culture of marine invertebrate animals. Plenum Press N.Y. 29-60 p.

- Guillard, R.R.L. y J.H. Rhyther. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* (Hustedt) and *Detonula confervacea* (Cleve). *Can. J. Microbiol.* 8: 229-239.
- Graves, J. E. y G.N. Somero. 1982. Electrophoretic and functional enzymic evolution in four species of eastern Pacific barracudas from different thermal environments. *Evolution*. Vol. 36, 97-106 pp.
- Hawkins, A.J., B.I. Bayne, A.J. Day, J. Rusin y C.M. Worrall. 1988. Genotype-dependent interrelations between energy metabolism, protein metabolism and fitness. En: Rayland, J. y P. Tyler (eds.). *Reproduction, Genetics and Distribution of Marine Organisms*. Proc. 23rd. European Marine Biology Symposium. Olsen and Olsen. Denmark. pp 283-292.
- Hilbish, T.J. y R.K. Koehn. 1985. Genetic variation in nitrogen metabolism in *Mytilus edulis*. Contribution of Lap locus. En: Gibbs, P.E. (ed.) *Proceedings of the Nineteenth European Marine Biology Symposium*. Plymouth, Devon, U.K. 16-21 September, 1984. Cambridge. 497-504 pp.
- Hochachka, P.W. y G.N. Somero. 1984. *Biochemical Adaptation*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey. 538 p.
- Hoffman, R.J. 1985. Thermal adaptation and properties of phosphoglucose-isomerase allozymes from sea anemones. En: Gibbs P.E. (ed.). *Proceedings of the Nineteenth European Marine Biology Symposium*. Plymouth, Devon, U.K. 16-21. September, 1984. Cambridge. 505-514 pp.
- Jørgensen, C.B. 1992. Heterozygosity and energetics of growth in suspension-feeding bivalves: a re-examination. *Ophelia* 36: 171-186.

- Juárez-Carrillo, E. 1995. Evaluación nutricional de *Artemia franciscana*, Kellog, 1906, (Crustacea: Brachiopoda), alimentada con *Chaetoceros* sp enriquecido con fosfolípidos en emulsión. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, B.C. México. 85 p.
- Koehn, R.K. 1978. Physiology and biochemistry of enzyme variation: the interfase of ecology and population genetics. En: Brussard, P. F. (ed.) Ecological genetics: the interfase. 52-72.
- Koehn, R.K., A.J. Zera, y J.G. Hall. 1983. Enzyme polymorphism and natural selection. En: Nei, M. y R.K. Koehn (eds.). Evolution of Genes and Proteins. Sinauer Associates Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts. 331 p.
- Koehn, R.K. 1985. Adaptative aspects of biochemical and physiological variability. En: Gibbs, P.E.(ed.). Proc. 19th Europ. Mar. Biol. Symp. Plymouth. Cambridge University Press. pp 425-441.
- Koehn, R.K., W.J. Diehl, T.M. Scott. 1988. The differential contribution by individual enzymes of glycolysis and protein catabolism to the relationship between heterozigosity and growth rate in the coot clam, *Mulinia lateralis*. Genetics. 118: 121-130.
- Koehn, R.K. 1991. The cost of enzyme synthesis in the genetics of energy balance and physiological performance. Biol. Jour. of the Linnean Soc. 44: 231-247.
- Lavens, P., A. De Meuleemester, y P. Sorgeloos. 1987. Evaluation of mono-and mixed diets as food for intensive *Artemia* culture. En: Sorgeloos, P., D.A. Bengston, W. Declair

- and E. Jaspers (eds.) *Artemia* Research and its Applications. Ecology, Culturing, Use in Aquaculture. Universa Press, Wetteren, Belgium. 556 p.
- Léger, P., D. Bengston, K. Simpson y P. Sorgeloos. 1986. The use and nutritional value of *Artemia* as a food source. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 24: 521-623.
- Levene, H. 1949. On a matching problem arising in genetics. *Ann. Math. Stat.* 20: 91-94.
- Lowry, O., N. Rosebrough, A. Farr y R. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Maqueda-Cornejo, M. 1990. Variación genética interpoblacional y grado de diferenciación interpoblacional del camarón azul *Penaeus stylirostris* del Golfo de California. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Marinas. Universidad Autónoma de Baja California. México. 71p
- Middleton, R.J. y H. Kacser. 1983. Enzyme variation, metabolic flux and fitness: alcohol deshydrogenase in *Drosophila melanogaster*. *Genetics.* 105: 633-650.
- Millikin, M., G. Biddle, T. Siewicki, A. Frotner, y P. Fair. 1980. Effects of various levels of dietary protein on survival, molting and growth of juvenile blue crab (*Callinectes sapidus*). *Aquaculture.* 19: 149-161.
- Moon, T.W. y P.W. Hochachka. 1971. Temperature and enzyme activity in poikilotherms: Isocitrate deshidrogenase in rainbow trout liver. *Biochem. J.* 123: 695-705.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozigosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics.* 89: 583-590.

- Olivarez-González, E. 1992. Balance energético de los adultos de *Artemia franciscana*, Kellog, 1906, bajo diferentes condiciones de temperatura. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, B.C. México. 72 p.
- Pande, S., R. Khan, y T. Venkitasubramanian. 1963. Microdetermination of lipids and serum total fatty acids. *Anal. Biochem.* 6: 415-423.
- Paniagua-Chávez, C. 1993. Viabilidad, composición proximal y valor alimenticio de *Dunaliella* sp preservada por congelamiento. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación de Ensenada, B.C. México. 74 p.
- Pedrosa, R.L.M.C. 1995. Caraterizacao genética de duas populacoes de *Artemia* (Lagoa de la Mata e Salinas de Aveiro). Dissertacao de Maestrado em Ecologia, Faculdade de Ciencias da Universidade do Porto. 74 p.
- Pough, F.H. 1989. Organismal performance and Darwinian fitness: Approaches and interpretations. *Pysiol. Zool.* 62: 199-236.
- Poulik, M. D. 1957. Starch gel electrophoresis in a discontinuous system of buffers. *Nature.* 180: 1477-1479.
- Raymond, M. y F. Rousset. 1994. GENEPOP. Institut des Sciences de l'Evolution. France.
- Sánchez-Saavedra, M.P. y D. Voltolina. 1995. The effect of different light quality on the food value of the diatom *Chaetoceros* sp for *Artemia franciscana* Kellog. *Rivista Italiana Acquacoltura.* 30: 135-138.

- Sorgeloos, P., P. Lavens, P. Léger, W. Tackaert y D. Versichele. 1986. Manual por the culture and use of brine shrimp *Artemia* in Aquaculture. State University of Ghent, Belgium. Faculty of Agriculture. 319 p.
- Shick, J.M. y H.B. Dowse. 1985. Genetic basis of physiological variation in natural populations of sea anémones: intra-and interclonal analysis of variance. Department of Zoology, University of Maine, Orono Maine 04469, U.S.A.
- Sick, L.V. 1976. Nutritional effects of five species of marine algae on the growth development, and survival of brine shrimp *Artemia salina*. Mar. Biol. 35: 69-78.
- Sokal, R.R., y F.J. Rohlf. 1995. Biometry. The principles and practice of statistics in biological research. 3rd. ed. W. H. Freeman and Co. 887 p.
- Sorokin, C. 1973. Dry weighth, packed cell volume and optical density. En: Stein, J.R.(ed.). Handbook of Phycological Methods, Culture Methods and Growth Measurement, Cambridge University Press, Cambridge. 1-448.
- Swofford, D.L. y R.M. Selander. 1989. BIOSYS-1: a FORTRAN program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in populations genetics and systematics. J. Hered. 72:281-283.
- Tapia-Vázquez, O.M. 1995. Caracterización morfológica, biométrica y reproductiva de *Artemia franciscana* de la Salina del Ejido Nueva Odisea, San Quintín, Baja California, México. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Autónoma de Baja California. México. 104 p.

- Tobias, W., P. Sorgeloos, O. Roels, y B. Sharfstein. 1980. International study on *Artemia* XIII. A comparison of production data of 17 geographical strains of *Artemia* in the St. Croix Artificial Upwellin-Mariculture System. En: G. Persoone, P. Sorgeloos, O. Roels y E. Jaspers (eds.). Brine Shrimp *Artemia*, Universa Press, Watteren, Belgium. 383-392.
- Vanhaecke, P. y P. Sorgeloos. 1980. International Study on *Artemia* XIV. Growth and survival of *Artemia* larvae of different geographical origin in a standard culture test. Mar. Ecol. Prog. Ser. 3: 303-307.
- Vanhaecke, P., S.E. Siddall y P. Sorgeloos. 1984. International Study on *Artemia*. XXXII. Combined effects of temperature and salinity on the survival of *Artemia* of various geographical origin. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 80: 259-275.
- Trujillo-Valle, L. 1993. La colección de microalgas del C.I.C.E.S.E. Informe técnico. Comunicaciones Académicas. B.C., México. CIACT9301. 103 p.
- Watt, W.B. 1985. Bioenergetics and evolutionary genetics: opportunities for new synthesis. Am. Nat. 125:118-143.
- Whyte, J. 1987. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. Aquaculture. 60: 231-241.
- Zapata, C., G. Gajardo y J.A. Beardmore. 1990. Multilocus heterozygosity and sexual selection in the brine shrimp *Artemia franciscana*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 62:211-217.
- Zouros, E. y A.L. Mallet. 1988. Genetic explanations of the growth/heterozygosity correlation in marine mollusks. En: Rayland, J.S. y P.A. Tyler (eds.). Reproduction, Genetic and

Distributions of Marine Organisms. Proc. 23rd. European Marine Biology Symposium.
Olsen and Olsen. Denmark. 317-324.