

DEPARTAMENT BIOLOGIA ANIMAL

CARACTERIZACIÓN DE DIVERSAS POBLACIONES DE
Artemia DESDE EL PUNTO DE VISTA DE SU
COMPOSICIÓN EN ÁCIDOS GRASOS Y DE SUS
PATRONES MOLECULARES

OLGA RUIZ PÉREZ

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2008

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 24 de juliol de 2008 davant un tribunal format per:

- D^a. Maria Natividade Ribeiro Vieira
- D. Javier Díaz Mayans
- D^a. Covadonga Rodríguez González
- D. Carlos Barata Martí
- D. Javier Armengol Díaz

Va ser dirigida per:

D. Juan Carlos Navarro Tárrega

D. Francisco Amat Domenech

©Copyright: Servei de Publicacions

Olga Ruiz Pérez

Depòsit legal:

I.S.B.N.:978-84-370-7340-8

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Artes Gráficas, 13 bajo

46010 València

Spain

Telèfon: 963864115

FACULTAT DE CIÈNCIES BIOLÒGIQUES
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
DEPARTAMENT DE BIOLOGIA I ANTROPOLOGIA
FÍSICA



CARACTERIZACIÓN DE DIVERSAS POBLACIONES DE
***Artemia* DESDE EL PUNTO DE VISTA DE SU**
COMPOSICIÓN EN ÁCIDOS GRASOS Y DE SUS
PATRONES MOLECULARES

Memoria presentada por Olga Ruiz Pérez para optar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas

Fdo.: **Olga Ruiz Pérez**

Valencia, Julio 2008

TESIS DOCTORAL DIRIGIDA POR:

Juan Carlos Navarro Tárrega, Científico Titular del Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (Consejo Superior de Investigaciones Científicas).

Francisco Amat Doménech, Profesor de Investigación del Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (Consejo Superior de Investigaciones Científicas).

Fdo.: Juan Carlos Navarro Tárrega Fdo.: Francisco Amat Doménech

A mis padres

Agradecimientos

Durante los años de realización de esta Tesis Doctoral muchas personas me han apoyado dentro y fuera del trabajo, y a todas ellas quiero expresarles mi gratitud.

En primer lugar quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a mis directores de tesis por todo lo que me han enseñado en estos últimos años. A Francisco Amat la gran oportunidad que me ha dado y la confianza que ha depositado en mí en el decurso de esta tesis. Sus consejos, calidad científica y dedicación han sido fundamentales para dar forma a este trabajo. Mi agradecimiento para Juan Carlos Navarro, porque apostó por este proyecto prestando siempre un gran apoyo y buen humor. Sus críticas, sugerencias y profesionalidad han hecho que esta tesis sea hoy una realidad.

Deseo hacer extensivo este agradecimiento al resto de los miembros del equipo de Especies Auxiliares, Larvicultura y Ecotoxicología del IATS. Gracias a Francisco Hontoria, siempre dispuesto a echar una mano para resolver mis dudas sobre aspectos y problemas que a veces los ordenadores presentan. A Inma Varó, por aconsejarme cuando daba mis primeros pasos en el laboratorio. A Nieves Sanz, por su cariño y atención en todo momento. A mis compis Óscar y Germán, con quienes empecé todo esto, por su cariño recibido y por haber compartido tantos momentos de risas. Quisiera resaltar mi agradecimiento al Dr. Monroig, una persona excepcional siempre dispuesta a ayudar, por leer ese primer borrador de tesis, cuando las palabras aún no tenían sentido, gracias amigo. A Julieta Goenaga porque enseguida surgió entre nosotras una gran amistad, por ser una persona tan dulce y transmitirme siempre esa alegría que le caracteriza. A todos y cada uno de los que han estado y están en el grupo de *Artemia*: Susana Lara, Ana Felpete, Salvatore Moscatello, Hachem Ben Naceur, Douha Boussoufa, Nabila Ghazali, Elena Viciano, Estella Redón y Marta Maccari, por su gran compañerismo y hacer más ameno y agradable el trabajo diario.

A los de “nutrición”, mis compañeros de despacho, porque sin vosotros los momentos de agobio no se habrían traducido en risas. A vosotros: Pedro Gómez, Azucena Bermejo, Laura Benedito y Alfonso Saera. ¡Echo de menos esos almuerzos!

En definitiva, a todos mis compañeros y amigos del IATS, porque habéis hecho que me sienta a gusto y una persona muy querida durante estos años. En especial muchísimas gracias a Ana Rocha, Gregorio Molés y José María Guzmán, por compartir tan buenos

momentos tanto dentro como fuera del IATS. Anita, gracias por estar a mi lado, por tu apoyo y gran amistad.

A Feliciano Fernández por todo el apoyo técnico prestado y, sobre todo, por su gran calidad como persona.

A Miguel Ángel Montolio por su ayuda en los análisis de ácidos grasos y por su palique inagotable que terminaba provocándonos las risas.

A Charo, Luís y Paco, por su cariño hacia mi, ayuda y buen humor en todo momento.

También quisiera darle las gracias al Profesor Abatzopoulos y al equipo que dirige por la gran amabilidad y acogimiento prestados durante mis estancias en la Universidad de Salónica. Fueron meses muy productivos al tiempo que divertidos.

Me gustaría recordar en estas líneas al Dr. Rafael Oltra, fue una gran persona que además me brindó la oportunidad de colaborar con él en el laboratorio de Ecología.

A mis compis de piso: Pepa Díez, Berta Crespo y Sol Ibáñez, que me han aguantado durante todo este tiempo. A ellas les dedico todo mi cariño por lo vivido en unos años inolvidables desde todo punto de vista. A Maz Bagherie, por su estancia intensa, fugaz y divertida en casa. Gracias por tus aportaciones para mejorar mi inglés.

A mis amigas incondicionales: Rocío Ureña, Rosa de Llanos, María Aliaga y Carla Gijón, porque siempre han estado y estarán ahí, dándome cariño y ánimo sin cesar. Muchas gracias chicas, por estar a mi lado y escucharme, haciendo que siempre vea el lado más positivo de las cosas.

A mis primos, Gloria, Álvaro y a la pequeña Julia, por haberme endulzado este largo periodo de escritura. Y a Estrellita, con mucho afecto, una verdadera y gran artista que ha diseñado la portada de esta tesis.

Con mucho cariño y de una manera muy especial quiero agradecer a Toni todo lo que me ha dado, porque sabe lo que es hacer y escribir una tesis y siempre ha demostrado una enorme paciencia y comprensión conmigo.

Por último, a mis padres, si no fuera por ellos no estaría aquí escribiendo, gracias por transmitirme la bondad, constancia y dedicación, valores de los que me siento muy orgullosa. Por vuestro inmenso apoyo y por quererme incondicionalmente, muchas gracias. Esta tesis es también vuestro premio.

Índice de Tablas.....	V
Índice de Figuras.....	VIII
Abreviaturas.....	XI
PRÓLOGO.....	1
1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	5
1.1. Clasificación y sistemática del género.....	7
1.2. Biología de <i>Artemia</i>	7
1.3. Ecología.....	11
1.3.1. Salinidad.....	12
1.3.2. Temperatura.....	13
1.3.3. Oxígeno.....	13
1.3.4. Alimentación.....	14
1.4. Variabilidad en la composición de ácidos grasos de <i>Artemia</i>	15
1.5. Factores condicionantes del perfil de ácidos grasos de <i>Artemia</i>	17
2. OBJETIVOS.....	21
3. MATERIAL Y MÉTODOS COMUNES.....	25
3.1. Recolección y procesado de las muestras.....	27
3.1.1. Quistes de poblaciones silvestres.....	27
3.1.2. Quistes de poblaciones de laboratorio.....	28
3.1.3. Eclosión de quistes de <i>Artemia</i>	28
3.2. Cultivo de <i>Artemia</i>	29
3.3. Cultivo de fitoplancton.....	30
3.4. Control de los parámetros físico-químico y biológicos del medio.....	32
3.4.1. Temperatura.....	32
3.4.2. Salinidad.....	32
3.4.3. pH.....	32
3.4.4. Oxígeno disuelto.....	32
3.4.5. Clorofila <i>a</i>	33
3.4.6. Materia Orgánica.....	33
3.5. Análisis de ácidos grasos.....	34
3.5.1. Extracción de lípidos totales: método de Folch.....	34
3.5.2. Derivatización de ácidos grasos.....	35
3.5.3. Condiciones cromatográficas.....	36
3.6. Análisis estadísticos.....	37
4. DIVERSIDAD EN LA COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE POBLACIONES ARGENTINAS DE <i>Artemia</i>.....	41
4.1. Introducción.....	43
4.1.1. Escasez del recurso <i>Artemia</i> y prospección de fuentes alternativas.....	43
4.1.2. Variabilidad en la composición de ácidos grasos de quistes de <i>Artemia</i>	45
4.2. Material y Métodos.....	46
4.2.1. Localización y características de los biotopos.....	46
4.2.2. Recolección de muestras y análisis de ácidos grasos.....	48

4.2.3. Análisis iónico de las salmueras.....	48
4.2.4. Tratamiento estadístico de los datos.....	50
4.3. Resultados.....	50
4.3.1. Distribución geográfica de las poblaciones argentinas de <i>Artemia</i>	50
4.3.2. Composición en ácidos grasos de las poblaciones argentinas de <i>Artemia</i>	51
4.3.3. Análisis de la composición iónica de las salmueras.....	57
4.4. Discusión.....	59
5. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE DIVERSAS POBLACIONES ARGENTINAS DE <i>Artemia</i>	67
5.1. Introducción.....	69
5.1.1. La molécula de ADN mitocondrial.....	69
5.1.2. Análisis del polimorfismo del ADNmt.....	70
5.1.3. El ADNmt de <i>Artemia</i>	72
5.1.4. Diversidad genética en las poblaciones argentinas de <i>Artemia</i>	73
5.2. Material y Métodos.....	75
5.2.1. Poblaciones analizadas.....	75
5.2.2. Condiciones de cultivo.....	75
5.2.3. Extracción de ADN.....	75
5.2.4. Amplificación del fragmento 16S rRNA del ADNmt.....	77
5.2.5. Digestión del fragmento 16S rRNA con enzimas de restricción....	79
5.2.6. Electroforesis en gel de agarosa.....	79
5.2.7. Análisis de datos.....	80
5.2.7.1. Variabilidad intrapoblacional.....	80
5.2.7.2. Variabilidad interpoblacional.....	81
5.2.7.3. Estructura genética.....	81
5.2.7.4. Relaciones filogenéticas.....	82
5.3. Resultados.....	83
5.3.1. Análisis de los haplotipos.....	83
5.3.2. Divergencias nucleotídicas y heterogeneidad en la frecuencia de haplotipo.....	83
5.3.3. Estructura genética.....	90
5.4. Discusión.....	92
6. EFECTO DE LA DIETA SOBRE LA COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS, SUPERVIVENCIA Y REPRODUCCIÓN DE <i>Artemia</i>.....	99
6.1. Introducción.....	101
6.2. Material y Métodos.....	103
6.2.1. Poblaciones.....	103
6.2.2. Obtención de quistes de poblaciones de <i>Artemia</i> cultivadas con diferentes dietas microalgales.....	104
6.2.2.1. Análisis estadísticos.....	104
6.2.3. Supervivencia, reproducción y periodos de vida.....	105
6.2.3.1. Análisis estadísticos.....	106
6.3. Resultados.....	108
6.3.1. Perfiles de ácidos grasos.....	108
6.3.2. Supervivencia, periodos de vida y variables reproductivas.....	117
6.4. Discusión.....	125
7. EFECTO DE LA TEMPERATURA DE CULTIVO SOBRE LA COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE <i>Artemia</i>.....	133

7.1. Introducción.....	135
7.2. Material y Métodos.....	138
7.2.1. Diseño experimental.....	138
7.2.2. Análisis estadísticos.....	141
7.3. Resultados.....	142
7.3.1. Quistes.....	142
7.3.2. Biomasas.....	149
7.4. Discusión.....	155
8. COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN <i>Artemia</i>: EXPERIMENTOS EN MESOCOSMOS.....	159
8.1. Introducción.....	161
8.1.1. Estudio de la variación estacional en la composición de ácidos grasos de <i>Artemia</i> cultivada en mesocosmos.....	163
8.1.2. Estudio comparativo del perfil de ácidos grasos en dos especies de <i>Artemia</i> en coexistencia.....	165
8.2. Material y Métodos.....	166
8.2.1. Cultivo en mesocosmos.....	166
8.2.2. Estudio de la variación estacional en la composición de ácidos grasos en <i>A. persimilis</i>	167
8.2.2.1. Análisis estadísticos.....	168
8.2.3. Estudio comparativo del perfil de ácidos grasos en dos especies de <i>Artemia</i> en coexistencia.....	170
8.2.3.1. Análisis estadísticos.....	170
8.3. Resultados.....	171
8.3.1. Variación estacional en la composición de ácidos grasos en <i>A.</i> <i>persimilis</i>	171
8.3.1.1. Parámetros físico-químicos y biológicos.....	171
8.3.1.2. Análisis de correlación canónica.....	173
8.3.1.3. Análisis discriminante.....	179
8.3.2. Perfil de ácidos grasos en dos especies de <i>Artemia</i> en coexistencia.....	182
8.4. Discusión.....	186
8.4.1. Estudio de la variación estacional en la composición de ácidos grasos en <i>A. persimilis</i>	186
8.4.2. Estudio comparativo del perfil de ácidos grasos en dos especies de <i>Artemia</i> en coexistencia.....	188
RESUMEN.....	193
CONCLUSIONES.....	199
BIBLIOGRAFÍA.....	203
ANEXO.....	233
Ruiz, O., Medina, G., Cohen, G., Amat, F., Navarro, J.C., 2007. Diversity of the fatty acid composition of <i>Artemia</i> sp. cysts from Argentinean populations. <i>Marine Ecology Progress Series</i> , 335:155–165.	
Ruiz, O., Amat, F., Navarro, J.C., 2008. Comparative study of the fatty acid profile of two <i>Artemia</i> spp. cultured at mesocosm-scale. <i>Journal of Experimental Marine Biology and Ecology</i> , 354:9–16.	
Ruiz, O., Amat, F., Cohen, G., Papeschi, A., Saavedra, C., Baxevanis, A.D., Kappas, I., Abatzopoulos, T.J., Navarro J.C. Genetic characterization of Argentinean <i>Artemia</i> species with different fatty acid profiles. <i>Hydrobiologia</i> (aceptado).	

Índice de Tablas

Tabla 3.1. Composición del medio f / 2 de Guillard y Ryther (1962).....	31
Tabla 4.1. Localización y características de las poblaciones argentinas de <i>Artemia</i> que proporcionaron muestras de quistes naturales.....	49
Tabla 4.2. Composición en ácidos grasos (porcentaje del total de ácidos grasos) de quistes de poblaciones argentinas de <i>Artemia</i>	53
Tabla 4.3. Coeficientes de correlación de cada una de las variables originales con las componentes principales (PC1, PC2) y comunalidades.....	55
Tabla 4.4. Parámetros físico-químicos y composición iónica de las salmueras de algunos de los biotopos hipersalinos argentinos muestreados.....	58
Tabla 5.1. Relación de las muestras de <i>Artemia</i> analizadas.....	76
Tabla 5.2. Estimaciones de la variabilidad en el ADNmt de <i>Artemia</i> ...	85
Tabla 5.3. Divergencia nucleotídica entre haplotipos (debajo de la diagonal).....	86
Tabla 5.4. Diversidad nucleotídica (d_{XY}) (sobre la diagonal) y divergencia nucleotídica (d_A) (debajo de la diagonal) entre las poblaciones de <i>Artemia</i> estudiadas.....	88
Tabla 5.5. Distribución de la frecuencia de haplotipo (Pers1-Pers5) en cada población de <i>A. persimilis</i> analizada.....	90
Tabla 5.6. Matriz de distancias basada en los porcentajes de ácidos grasos (16:0, 16:1n-9, 16:1n-7, 18:0, 18:1n-9, 18:1n-7, 18:2n-6, 18:3n-3, 20:4n-6, 20:5n-3) y en el cociente 16:0/16:1 de los quistes de las poblaciones argentinas de <i>A. persimilis</i> analizadas en el Capítulo 4.....	91
Tabla 5.7. Matriz de distancias basada en el porcentaje de 18:3n-3 y el cociente 16:0/16:1 de los quistes de las poblaciones argentinas de <i>A. persimilis</i> analizadas en el Capítulo 4.....	91
Tabla 5.8. Valores F_{ST} de las poblaciones de <i>A. persimilis</i>	91
Tabla 6.1. Ácidos grasos más abundantes (% respecto al total de ácidos grasos) en los quistes de las distintas poblaciones de <i>Artemia</i> alimentadas con la mezcla de microalgas D/T, y en el propio alimento.....	109
Tabla 6.2. Ácidos grasos más abundantes (% respecto al total) en los quistes de las distintas poblaciones de <i>Artemia</i> alimentadas con monocultivos de las microalgas POR y PHA, y en el propio alimento.....	110

Tabla 6.3. Coeficientes de correlación de cada una de las variables originales con las componentes principales (PC1, PC2) y comunalidades.....	115
Tabla 6.4. Nivel de significación de los diferentes ANOVAs de dos factores realizados sobre los periodos de vida.....	118
Tabla 6.5. Nivel de significación de los diferentes ANOVAs de dos factores realizados sobre las variables reproductivas.....	122
Tabla 6.6. Resumen del análisis canónico de correlaciones.....	122
Tabla 6.7. Correlaciones de las variables demográficas y bioquímicas originales con el primer par de variables canónicas.....	123
Tabla 7.1. Ácidos grasos más abundantes (porcentaje del total de ácidos grasos) de los quistes procedentes de Tibet.....	136
Tabla 7.2. Ácidos grasos más abundantes (porcentaje del total de ácidos grasos) en <i>Dunaliella</i> sp. empleada como alimento para los experimentos de temperatura en <i>Artemia</i>	141
Tabla 7.3. Nivel de significación del ANOVA de dos vías aplicado sobre el porcentaje de ácidos grasos de quistes de las especies <i>A. persimilis</i> y <i>A. franciscana</i> , considerando las tres temperaturas experimentales (28°, 24° y 18°C).....	145
Tabla 7.4. Coeficientes de correlación de cada una de las variables originales con las componentes principales (PC1, PC2) y comunalidades.....	146
Tabla 7.5. Nivel de significación del ANOVA de dos vías aplicado sobre el porcentaje de ácidos grasos de biomazas de las especies <i>A. persimilis</i> y <i>A. franciscana</i> , considerando las tres temperaturas experimentales (28°, 24° y 18°C).....	152
Tabla 7.6. Coeficientes de correlación de cada una de las variables originales con las componentes principales (PC1, PC2) y comunalidades.....	153
Tabla 8.1. Parámetros físico-químicos y biológicos registrados entre Enero de 2005 y Marzo de 2006 en el sistema de mesocosmos.....	172
Tabla 8.2. Análisis de correlación entre las variables estudiadas en el tanque del mesocosmos durante los diferentes periodos experimentales.....	172
Tabla 8.3. Variación estacional en el contenido de ácidos grasos (porcentaje del total) de los diferentes estadios de desarrollo de la población de <i>A. persimilis</i> (ALG) cultivada en mesocosmos.....	175
Tabla 8.4. Resumen del análisis canónico de correlaciones.....	176
Tabla 8.5. Correlaciones de las variables bioquímicas y ambientales originales con el primer par de variables canónicas.....	176

Tabla 8.6. Resultados y significación de las funciones discriminantes obtenidas tras el análisis discriminante de los porcentajes de los 15 ácidos grasos analizados en <i>Artemia</i>	179
Tabla 8.7. Coeficientes estructurales de las funciones discriminantes obtenidas tras el análisis discriminante de los porcentajes de ácidos grasos analizados en <i>Artemia</i>	182
Tabla 8.8. Ácidos grasos más abundantes (porcentaje del total de ácidos grasos) de individuos (P y F) y biomasas (BP y BF) de poblaciones de <i>A. persimilis</i> y <i>A. franciscana</i> coexistiendo en mesocosmos.....	183
Tabla 8.9. Coeficientes de correlación de cada una de las variables originales con las componentes principales (PC1, PC2) y comunalidades.....	184

Índice de Figuras

Figura 1.1. Morfología de <i>Artemia</i> , hembra adulta y detalle de las antenas desarrolladas en un macho adulto.....	8
Figura 1.2. Quistes de <i>Artemia</i> deshidratados.....	10
Figura 1.3. Morfología de un nauplio de <i>Artemia</i>	11
Figura 1.4. Rutas principales de síntesis de ácidos grasos de 20 y 22 carbonos desde sus precursores C18 en las series n-3, n-6 y n-9.....	18
Figura 3.1. Cultivo de diversas poblaciones de <i>Artemia</i> en las instalaciones del IATS.....	30
Figura 3.2. Separación de ésteres metílicos de ácidos grasos mediante una técnica de cromatografía gaseosa (GC) con una columna tubular abierta y detección por ionización de llama de un patrón comercial (37 Component FAME Mix de Supelco).....	37
Figura 4.1. Situación geográfica de las provincias de Argentina.....	47
Figura 4.2. Localización de las poblaciones de <i>Artemia</i> muestreadas.....	52
Figura 4.3. Gráfico de los coeficientes de las variables en los nuevos componentes principales.....	56
Figura 4.4. Gráfico de puntuaciones de los objetos en los nuevos componentes principales.....	57
Figura 4.5. Diagrama Piper de los diferentes iones (% del total de aniones y cationes) presentes en las salmueras de los biotopos hipersalinos muestreados.....	59
Figura 5.1. Mapa genético del ADNmt de <i>A. franciscana</i> (Valverde y cols., 1994).....	72
Figura 5.2. Patrón de corte para la enzima <i>Alu I</i> en el fragmento de 16S rRNA de las poblaciones PBL.....	84
Figura 5.3. Dendrograma obtenido por el método de UPGMA a partir de la matriz de divergencia nucleotídica entre todos los haplotipos de ADNmt de las poblaciones de <i>Artemia</i> estudiadas.....	87
Figura 5.4. Dendrograma obtenido a partir del análisis de UPGMA para las poblaciones de <i>Artemia</i> estudiadas.....	89
Figura 5.5. Dendrograma obtenido a partir del análisis de UPGMA según la matriz de distancias euclídeas del porcentaje de ácidos grasos 16:0, 16:1n-9, 16:1n-7, 18:0, 18:1n-9, 18:1n-7, 18:2n-6, 18:3n-3, 20:4n-6, 20:5n-3 y el cociente 16:0/16:1, analizado en las poblaciones de <i>A. persimilis</i>	92

Figura 6.1. Ácidos grasos más abundantes (% respecto del total) en los quistes originales (ALG, ING), en la progenie (ALG(D/T), ING(D/T), y en el alimento (D/T: <i>Dunaliella</i> sp./ <i>Tetraselmis suecica</i>) suministrado a las poblaciones de (a) ALG: Algarrobo y (b) ING: El Inglés.....	112
Figura 6.2. Ácidos grasos más abundantes (% respecto del total) en los quistes originales (ALG, ING), en la progenie (ALG(PHA), ING(PHA), y en el alimento (PHA: <i>Phaeodactylum tricorutum</i>) suministrado a las poblaciones de (a) ALG: Algarrobo y (b) ING: El Inglés.....	113
Figura 6.3. Ácidos grasos más abundantes (% respecto del total) en los quistes originales (ALG, ING), en la progenie (ALG(POR), ING(POR), y en el alimento (POR: <i>Porphyridium cruentum</i>) suministrado a las poblaciones de (a) ALG: Algarrobo y (b) ING: El Inglés.....	114
Figura 6.4. Gráfico de los coeficientes de las variables en los nuevos componentes principales.....	116
Figura 6.5. Gráfico de puntuaciones de los objetos en los nuevos componentes principales.....	117
Figura 6.6. Supervivencia (porcentaje respecto del número inicial de individuos en la experiencia) durante el periodo prerreproductivo de las hembras de las poblaciones Algarrobo (ALG) y El Inglés (ING) en función de la dieta suministrada (D/T: <i>Dunaliella</i> sp./ <i>Tetraselmis suecica</i> ; PHA: <i>Phaeodactylum tricorutum</i>).....	118
Figura 6.7. Periodo prerreproductivo (a), periodo reproductivo, (b), longevidad (c), tasa diaria de reproducción (d), descendencia total (e), número de puestas (f), descendencia por puesta (g), intervalo entre puestas (h), descendencia ovípara (i) y descendencia ovovivípara (j) de las hembras, calculado para las dos poblaciones de <i>Artemia</i> en función de la dieta.....	120
Figura 6.8. Gráfico de saturaciones en componentes.....	124
Figura 6.9. Localización de las poblaciones de <i>Artemia</i> estudiadas en el espacio definido por el primer par de variables canónicas.....	125
Figura 7.1. Esquema del procedimiento seguido en los experimentos de temperatura con las poblaciones de <i>A. franciscana</i> y <i>A. persimilis</i>	139
Figura 7.2. Ácidos grasos más abundantes (porcentaje del total de ácidos grasos) en los quistes emitidos por <i>A. franciscana</i> y <i>A. persimilis</i> cultivadas a 18°, 24° y 28°C.....	143
Figura 7.3. Gráfico de los coeficientes de las variables en los nuevos componentes principales.....	148

Figura 7.4. Gráfico de puntuaciones de los objetos (quistes) en los nuevos componentes principales.....	148
Figura 7.5. Ácidos grasos más abundantes (porcentaje del total de ácidos grasos) en las biomasas de <i>A. franciscana</i> y <i>A. persimilis</i> cultivadas a 18°, 24° y 28°C.....	150
Figura 7.6. Gráfico de los coeficientes de las variables en los nuevos componentes principales.....	154
Figura 7.7. Gráfico de puntuaciones de los objetos (biomasas) en los nuevos componentes principales.....	155
Figura 8.1. Sistema de tanques situados al aire libre para el cultivo de <i>Artemia</i> en mesocosmos.....	167
Figura 8.2. Detalle del tamiz de malla de 160 µm sumergido en el interior del tanque.....	167
Figura 8.3. Variación estacional en el contenido (porcentaje del total de ácidos grasos) de (a) 16:0, 16:1n-9, 16:1n-7; (b) 18:0, 18:1n-9, 18:1n-7; (c) 18:2n-6, 18:3n-3; (d) 20:4n-6, 20:5n-3; (e) Poliinsaturados (PUFA), n-3 (PUFA n-3), n-6 (PUFA n-6); (f) HUFA n-3 (PUFA n-3 de 20 o más carbonos), HUFA n-6 (PUFA n-6 de 20 o más carbonos) analizado en el seston.....	174
Figura 8.4. Gráfico de saturaciones en componentes.....	178
Figura 8.5. Localización de las poblaciones estudiadas en el espacio definido por el primer par de variables canónicas, cuando se utilizan los estadios de desarrollo y el periodo de muestreo como factores de clasificación.....	178
Figura 8.6. Gráfico de dispersión de los distintos grupos (estadios de desarrollo de <i>Artemia</i>), para las cuatro funciones discriminantes obtenidas tras el análisis discriminante.....	181
Figura 8.7. Centroides de los distintos grupos, para las cuatro funciones discriminantes obtenidas tras el análisis discriminante.....	181
Figura 8.8. Gráfico de los coeficientes de las variables en los nuevos componentes principales.....	185
Figura 8.9. Gráfico de puntuaciones de los objetos en los nuevos componentes principales resultantes tras el PCA de los ácidos grasos analizados (porcentaje del total) en individuos y biomasas de <i>A. persimilis</i> (círculos) y <i>A. franciscana</i> (triángulos).....	185

ADNmt: ácido desoxirribonucleico mitocondrial
AMOVA: análisis molecular de la varianza
ANOVA: análisis de varianza
ARA: ácido araquidónico (20:4n-6)
BHT: hidroxitolueno butilado
CCA: análisis de correlación canónica
céls: células
Chl *a*: clorofila *a*
CV: coeficiente de variación
DA: análisis discriminante
DHA: ácido docosahexaenoico (22:6n-3)
dNTP: desoxinucleósido trifosfato
EFA: ácido graso esencial
EPA: ácido eicosapentaenoico (20:5n-3)
FAME: éster metílico de ácido graso
FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
GC: cromatografía de gases
GSL: *Great Salt Lake* o Gran Lago Salado (Utah, EE.UU.)
HUFA: ácido graso poliinsaturado de cadena larga (20 o más carbonos) y con más de dos insaturaciones
LA: ácido linoleico (18:2n-6)
LNA: ácido linolénico (18:3n-3)
MOP: materia orgánica particulada
OTU: unidades taxonómicas operativas
pb: pares de bases
PC: componentes principales
PCA: análisis de componentes principales
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PUFA: ácido graso poliinsaturado
RFLP: polimorfismos de longitud en los fragmentos de restricción
SFB: *San Francisco Bay* o Bahía de San Francisco (California, EE.UU.)
TBE: tris-borato-EDTA
TDS: total de sólidos disueltos
UPGMA: método no ponderado de grupo par usando promedios aritmético

PRÓLOGO

Los primeros pasos de la acuicultura moderna se dieron en el siglo XIX, cuando se logró reproducir el ciclo vital completo de algunas especies de peces y crustáceos en el laboratorio. El primer problema que se le planteó al acuicultor desde entonces fue la elección del alimento que debía suministrar a los animales objeto de cultivo, agravándose este problema en las fases larvarias por sus necesidades nutritivas más estrictas.

El alimento natural de las larvas de peces y crustáceos, en forma de presas vivas, procede del fitoplancton y del zooplancton, que forman una red trófica de extraordinaria complejidad y gran diversidad. Se ha practicado la captura de plancton natural destinado a la alimentación de las larvas en cultivo, pero ésta presenta una problemática que ya fue sugerida a principios del siglo XX por Fabre-Domergue y Bietrix (1905). Entre estos problemas destacan: un insuficiente rendimiento productivo para satisfacer la enorme demanda de presas vivas que plantea una instalación de cría larvaria (Stottrup, 2000), y la disponibilidad y comodidad de manejo del recurso. Por esto, desde los inicios de la acuicultura, se ha tendido a reproducir artificialmente la cadena trófica natural. Ello ha exigido una simplificación de la misma, utilizando especies de fitoplancton y zooplancton fácilmente cultivables y manipulables en el laboratorio. Los eslabones de esta cadena trófica deben ser aceptados y asimilados con provecho por los animales sujetos a cultivo, y sus cualidades nutritivas adecuadas para la supervivencia y crecimiento de las larvas. Así, la compleja cadena trófica natural, formada por diferentes especies del fitoplancton (microalgas) y del zooplancton: crustáceos (cladóceros, copépodos, etc.), moluscos (bivalvos, gasterópodos, etc.), rotíferos, ciliados, etc., en sus formas larvarias, juveniles y adultas, ha sido reemplazada por el uso de presas vivas obtenidas a partir de los llamados cultivos auxiliares. Las microalgas del fitoplancton constituyen el primer eslabón de la cadena trófica artificial. El siguiente eslabón está formado por rotíferos mixohalinos del género *Brachionus* y el tercero lo constituyen los nauplios de *Artemia*, crustáceo branquiópodo que tiene su habitat natural en cuerpos de agua de salinidad elevada como los lagos salados y las salinas.

Artemia es el alimento vivo acuático más utilizado en el mundo, tanto por las cantidades consumidas como por el número de especies a las que sirve de alimento (Kinne, 1977; Sorgeloos, 1986). La facilidad y rapidez con que se obtienen sus nauplios a partir de un material prácticamente inerte, fácilmente manipulable y almacenable como son los quistes o huevos de resistencia, hacen que en la actualidad el uso de nauplios de *Artemia* siga siendo prácticamente insustituible en acuicultura de especies carnívoras.

Sin embargo, existen varios factores limitantes del uso de los nauplios de *Artemia* como alimento larvario. Uno procede de la variabilidad en su composición en ácidos grasos esenciales, que determina drásticamente el valor nutritivo de *Artemia* para larvas de especies marinas. Por otro lado existe el problema de la propia escasez del recurso.

La demanda de quistes de *Artemia* en el mercado ha ido aumentando progresivamente hasta alcanzar las 2000 Tm anuales requeridas en la actualidad. Existe una dependencia completa del mercado global, dado que la disponibilidad de quistes se basa en su recolección llevada a cabo en algunos grandes ecosistemas hipersalinos, como el *Great Salt Lake* (GSL) de Utah (EE.UU.), que durante el último cuarto de siglo ha sido la principal fuente de quistes destinados al mercado acuícola mundial. Por último hay que señalar la deficiente y muy limitada información disponible sobre los *stocks* de *Artemia* existentes en orígenes muy diversos, habitualmente mal caracterizados desde el punto de vista de la especie a la que pertenecen, así como de su calidad de uso y de su valor nutritivo.

Se impone por lo tanto la necesidad de potenciar planes de investigación destinados a la prospección alternativa del recurso quistes de *Artemia*, a la concreción de su origen, y a su caracterización exhaustiva en términos de biología básica y de utilización científico técnica. El trabajo que a continuación se expone aspira a ampliar la escasa información que existe sobre aspectos ecológicos y fenotípicos que condicionan la composición de ácidos grasos en *Artemia*.

Todos los estudios que se describen en la presente memoria se han realizado durante el disfrute de una beca predoctoral de Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación y Ciencia. Gracias a la concesión de ayudas para estancias breves financiadas por el programa, se ha tenido la oportunidad de aprender algunas técnicas de análisis molecular durante una estancia de cuatro meses en el *Department of Genetics, Development and Molecular Biology* de la Universidad de Salónica (Grecia), bajo la dirección del Dr. T.J. Abatzopoulos.

Hasta la finalización de esta memoria, los resultados obtenidos durante el estudio han generado la publicación de los artículos incluidos en el Anexo.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. CLASIFICACIÓN Y SISTEMÁTICA DEL GÉNERO

El género *Artemia* engloba a un grupo de crustáceos caracterizados por estar dotados de apéndices torácicos en forma de hoja, que ejercen funciones locomotoras, respiratorias y filtradoras (Subclase *Branchiopoda*), y por la ausencia de caparazón rígido (Orden *Anostraca*).

El género está formado por seis especies bisexuales, *A. salina* (Leach, 1819), distribuida por Europa y África, *A. urmiana* (Günther, 1890), considerada exclusiva del lago Urmia (Irán), *A. sinica* (Cai, 1989), procedente de China, *A. tibetiana* (Abatzopoulos, 1998), propia del Tibet (China), *A. franciscana* (Kellog, 1906), distribuida por América, y *A. persimilis* (Piccinelli y Prosdocimi, 1968), confinada a América del Sur. Las poblaciones partenogenéticas se agrupan taxonómicamente bajo una única especie: *A. parthenogenetica* (Artom, 1931), que puede presentar diversas ploidias (di-, tri-, tetraploides, etc.), y que es endémica de Europa, Asia y África. Actualmente existen algunas discrepancias acerca de la taxonomía del género. Algunos autores opinan (Abatzopoulos y cols., 2002) que las poblaciones partenogenéticas no pueden ser clasificadas como una única especie dada la diversidad de clones de diferente ploidía que se han descrito.

Para la identificación y clasificación de las diferentes especies de *Artemia* se han aplicado diversos criterios y métodos, esencialmente biométricos y morfométricos, como los desarrollados por el equipo de Especies Auxiliares y Larvicultura del IATS y que se han venido usando habitualmente (Hontoria y Amat., 1992a, b). Las pruebas de cruzamiento entre diferentes poblaciones sirven como soporte a estos estudios, dada la existencia de aislamiento reproductivo y barreras genéticas entre poblaciones. Recientemente se han incorporado métodos basados en biología molecular (Gajardo y cols., 2004) definiendo y aplicando marcadores moleculares tales como los RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*). Las diferentes especies y poblaciones de *Artemia* se pueden distinguir mediante la comparación de polimorfismos en secuencias determinadas del genoma. Estos resultados refuerzan y confirman los resultados obtenidos con las previas metodologías más clásicas.

1.2. BIOLOGÍA DE *Artemia*

Los branquiopodos han mantenido aproximadamente una estructura común a lo largo de toda su evolución. Con el cuerpo

dotado de una segmentación uniforme, la tagmosis no es tan avanzada como en otros tipos de crustáceos, y han desarrollado apéndices de tipo filopoidal, aplanados y que se disponen a lo largo de un cuerpo principal, siendo su número igual al de los segmentos torácicos. El cuerpo presenta metameria uniforme. Como rasgos morfológicos característicos destacan los siguientes (Figura 1.1): una cabeza formada por cinco segmentos fusionados, en la que se observan los ojos compuestos, un ocelo frontal entre aquellos, las anténulas o antenas secundarias, y las antenas, también llamadas antenas verdaderas, y que en el caso de los machos se hipertrofian en apéndices prensiles. El tórax lo constituyen once segmentos, cada uno de ellos dotado de un par de apéndices foliáceos aplanados, llamados filópodos o toracópodos. El abdomen está constituido por ocho segmentos ápodos, genitales los dos primeros, y el último, llamado telson, provisto de la furca caudal.

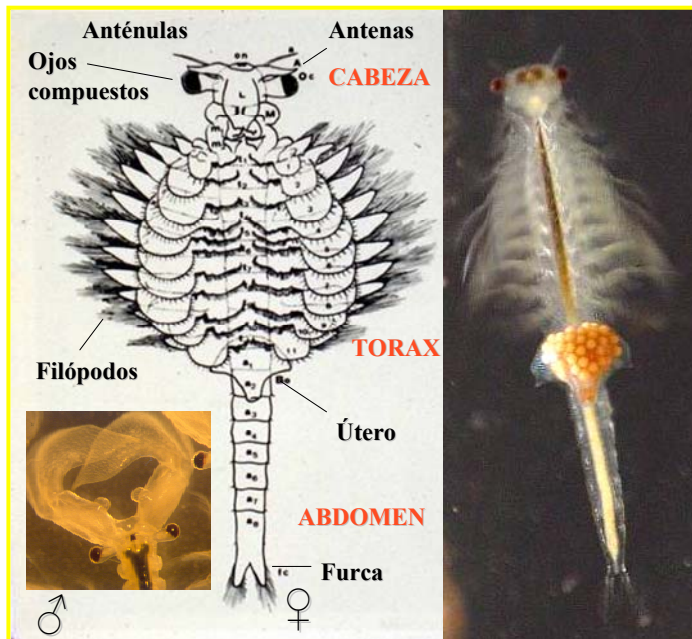


Figura 1.1. Morfología de *Artemia*, hembra adulta y detalle de las antenas desarrolladas en un macho adulto.

Artemia presenta dos tipos de reproducción: bisexual, anfígónica o zigogénica, con presencia de machos y hembras, y partenogénica, donde la presencia de machos es testimonial (Amat,

1985). Ambas modalidades se excluyen y no se ha encontrado ninguna cepa o variedad que pueda alternar cíclicamente ambas formas.

Tanto en las poblaciones bisexuales como en las partenogenéticas las hembras pueden dar lugar a dos tipos de huevos: a) los que completan el desarrollo embrionario en el interior del útero, por lo que resultan en un nauplio completamente formado (proceso ovovivíparo); y b) los que detienen su desarrollo en el estado de blástula avanzada o gástrula incipiente, cubriéndose de un corion resistente procedente de las glándulas de la cáscara y quedando en forma de quiste o huevo cístico, de duración o de “invierno” (proceso ovíparo). Estos, pueden dar una eclosión inmediata con aparición de nauplios poco después de haber sido emitidos por las hembras (llamados quistes subitáneos, Dutrieu, 1960), o entrar en estado criptobiótico o de diapausa. En este caso, no eclosionan inmediatamente, y deben ser activados para ello. Esta activación viene condicionada por una deshidratación previa, debida a los procesos osmóticos que se desencadenan en medios constituidos por fuertes salmueras, o a causa de la acción desecadora del aire y el sol. Cuando los quistes deshidratados son rehidratados de nuevo en agua de baja salinidad, con adecuados niveles de aireación e iluminación, los embriones enquistados continúan su desarrollo hasta eclosionar en forma de nauplio completamente formado.

Cuando los ejemplares alcanzan la madurez sexual, cada macho intenta unirse a una hembra mediante sus apéndices cefálicos prensiles (antenas), por delante del útero, quedando en posición de monta (*riding position*). Ambos se moverán firmemente unidos largo tiempo hasta que la fecundación se haya completado. Ésta sólo será efectiva cuando los óvulos se encuentren en los sacos laterales de los oviductos o en el útero. En las formas bisexuales la hembra debe ser fertilizada en cada puesta, ya que no tiene capacidad de almacenar el esperma introducido por los machos en una fecundación anterior.

La formación de los oocitos se inicia en los ovarios, donde van aumentando de tamaño y acumulando vitelo conforme migran hacia los sacos laterales de los oviductos, y desde aquí hacia el útero, ya como óvulos. En esta etapa los óvulos se encuentran en la primera metafase meiótica, o en fase equivalente para las cepas partenogenéticas. La fecundación de los óvulos tiene lugar en este momento. En el útero se producen las primeras segmentaciones del huevo y se completa el desarrollo embrionario hasta nauplio, o se inicia el proceso de enquistamiento. Una vez completado este proceso la hembra libera al exterior el contenido uterino.

El ciclo de desarrollo de una progenie desde la fase de oocito suele durar de 4 a 6 días. Con esta frecuencia se producen puestas de nauplios o de huevos císticos en número variable y dependiente de la población, de la edad del animal y de otros condicionantes ecofisiológicos. En los casos más favorables pueden superarse los 400 descendientes por puesta.

El quiste de *Artemia* es, por tanto, un embrión en estado de blástula o gástrula incipiente protegido por el corion, una pared exterior gruesa y resistente. El diámetro de los quistes varía entre 200 y 270 μm (Amat, 1982) según la especie y la ploidía de las cepas. Después de una desecación efectiva presentan una forma semiesférica, con un hemisferio casi completamente invaginado en el otro. Cuando se hidratan recuperan su forma totalmente esférica (Figura 1.2).



Figura 1.2. Quistes de *Artemia* deshidratados.

Los quistes son emitidos por las hembras adultas en condiciones críticas para la supervivencia de la población como son la falta de alimento, elevadas salinidades, deficiencias en niveles de oxígeno, etc., que pueden darse en los lagos salados y explotaciones salineras donde habitan.

El corion ofrece espectaculares características protectoras a los quistes de *Artemia*: gran tolerancia a las bajas y altas temperaturas, resistencia a la acción de disolventes orgánicos, protección ante las radiaciones, resistencia a ruptura mecánica, etc. Además, el corion presenta gran higroscopicidad, de tal forma que es capaz de captar agua del ambiente hasta un 200 % de su peso, proceso de hidratación tras el cual el quiste pierde flotabilidad y se reinicia el metabolismo que culminará con la rotura del corion y salida al exterior del nauplio.

El desarrollo de preemergencia parte, como antes se ha indicado, del estado de blástula o gástrula, llegando hasta el nauplio parcialmente formado o prenauplio. A partir de entonces, durante el desarrollo emergente, se forma el nauplio o estado larvario I (instar I) que ya nace nadando libremente en el medio. Tras la primera muda

accede al estado larvario II, en el que ya empieza a capturar alimento externo, y con el que se entra a las formas metanaupliarias que darán paso a las fases juveniles y adultas.

El nauplio de *Artemia* es de color anaranjado por la presencia de carotenos en el vitelo. Presenta tres pares de apéndices: las antenas, que tienen una marcada función locomotora, y cuyos extremos dotados de finas sedas, actúan como filtradores de las partículas alimenticias; las anténulas que desempeñan un papel sensorial y las mandíbulas rudimentarias. En la cabeza se distingue un ojo naupliar débilmente pigmentado, responsable del característico fototactismo positivo del nauplio. Ventralmente se encuentra un gran labio de forma casi rectangular, que recubre la base de los apéndices bucales (Figura 1.3).



Figura 1.3. Morfología de un nauplio de *Artemia*.

El ciclo biológico de *Artemia* dura aproximadamente de 14 a 17 días, aunque se han descrito ciclos más cortos, de hasta 9 días. En *Artemia* el tamaño individual, la rapidez del desarrollo, la frecuencia de las mudas, etc., varían de acuerdo a la especie, y a la influencia de los factores físico-químicos y ambientales, tales como la salinidad, temperatura, concentración de oxígeno, pH, tipo de alimento y/o densidad poblacional.

1.3. ECOLOGÍA

Artemia habita exclusivamente ecosistemas hipersalinos, caracterizados por su escasa diversidad biológica y por la casi ausencia de predadores. Los habitats naturales comprenden salinas y lagos salados, temporales y permanentes, situados en zonas costeras o

en entornos continentales. Aunque la mayoría de los biotopos que coloniza *Artemia* están constituidos por aguas muy someras, en ocasiones puede encontrarse en medios de cierta profundidad y con estratificaciones físicas, químicas y biológicas importantes. Tal es el caso de algunos lagos salados como el Mono Lake en California (EE.UU.). Estas situaciones y las derivadas de la litoralidad o continentalidad de los ecosistemas en los que se encuentra *Artemia*, permiten confirmar su gran capacidad de adaptación y tolerancia a muy diversas condiciones ecológicas.

1.3.1. Salinidad

Artemia se caracteriza por soportar el mayor intervalo de salinidad entre los metazoos acuáticos. Se han encontrado poblaciones en salinidades inferiores a la del mar y en salmueras próximas a la saturación (Bhargava y cols., 1987; Bowen y cols., 1988; McDonald y Browne, 1989). Esta eurihalinidad, que le permite vivir en intervalos de salinidad comprendidos entre 10-20 g l⁻¹ y más de 300 g l⁻¹ se debe a su gran capacidad de osmorregulación. Su hemolinfa se mantiene hipotónica con respecto al medio ambiente (Croghan, 1958) gracias a la excreción activa de sales al medio acuoso por parte de los exopoditos de los toracópodos. En condiciones naturales, los límites inferiores de salinidad en los que se desarrollan sus poblaciones vienen condicionados por la posibilidad de la presencia de depredadores (Kristensen y Hulscher-Emeis, 1972; Persoone y Sorgeloos, 1980; Bhargava y cols., 1987).

Más sorprendentes que los niveles de salinidad pueden ser las diversas composiciones iónicas de las salmueras en las que vive *Artemia*. Así se pueden encontrar poblaciones de este crustáceo en lagos salados clorurados, sulfatados, carbonatados, potásicos, etc., en los que las proporciones entre los principales iones no sólo son diferentes a las que presenta el agua de mar (aguas atalasoalinas), sino que los iones pueden ser totalmente distintos a los que se encuentran en los medios marinos (Cole y Brown, 1967; Bowen y cols., 1985; Comín y Alonso, 1988).

Los habitats de *Artemia* en el continente sudamericano, a los que nos referiremos ampliamente en este trabajo, se caracterizan por presentar condiciones climáticas e hidrológicas muy diversas. Lamentablemente la bibliografía disponible sobre las características químicas de sus aguas es muy escasa. Recientes trabajos (Medina et al., 2007) sobre la eficacia biológica de las dos especies de *Artemia* halladas en Argentina, han demostrado que las poblaciones de *A.*

franciscana toleran un rango más amplio de salinidades que las de *A. persimilis*.

1.3.2. Temperatura

La temperatura vital óptima de *Artemia* está alrededor de 25-27°C. En términos generales los umbrales mínimo y máximo de supervivencia pueden establecerse entre 5 y 35°C, aunque estos límites no son fijos y están ligados a las características de cada población.

En Argentina pueden encontrarse poblaciones de *Artemia* viviendo desde los 18-20°C de temperatura media anual en la región de la Llanura Chaco-Pampeana (Amat y cols., 2004) hasta temperaturas inferiores a 8-9°C en la región de la Meseta Patagónica (Medina y cols., 2007). Además, en este último estudio, se han encontrado evidencias que indican que *A. persimilis* se adapta mejor a bajas temperaturas que *A. franciscana*, la cual, por el contrario, presenta un rango de tolerancia mayor a temperaturas más altas. Esto daría explicación a la distribución de las dos especies en Argentina, donde *A. franciscana* se distribuye por el Norte mientras que *A. persimilis* parece confinada al Sur del país.

Es importante destacar que entre las poblaciones de *Artemia* hasta ahora halladas a escala global, las mejor adaptadas a vivir en los rangos más bajos de temperatura proceden del Tibet (China). Se han descrito unas 16 localizaciones de esta especie (*A. tibetiana*) en la Meseta Qinghai-Tibet (Xin y cols., 1994; Zheng y cols., 1997), ecosistemas caracterizados por su gran altitud (hasta 4990 m.s.n.m) y bajas temperaturas (media anual entre -5 y 1°C).

1.3.3. Oxígeno

La simple consideración de la correlación inversa que existe entre salinidad y temperatura, y la solubilidad del oxígeno, puede dar idea de los bajísimos niveles de este gas que puede encontrar *Artemia* en sus biotopos naturales. *Artemia* tolera normalmente salmueras con niveles de oxígeno de 1 g l⁻¹, hasta porcentajes de saturación superior al 100%. Al igual que en otros invertebrados, en ambientes con carencia de oxígeno, desarrolla una intensa coloración rojiza debida a un incremento en la concentración de hemoglobina en su hemolinfa, incremento que posibilita captar mayor cantidad de oxígeno sin una elevación apreciable de su tasa respiratoria (Gilchrist, 1954; Dutrieu, 1960).

1.3.4. Alimentación

Artemia es un crustáceo filtrador pasivo que basa su alimentación en la captura de bacterias, algas unicelulares, pequeños protozoos y detritos del medio en que vive, lo que lleva a cabo mediante el batido rítmico de sus apéndices, ya que los telopoditos de los toracópodos actúan como aparato filtrador. Estos movimientos crean dos corrientes en direcciones opuestas: anal y oral; la segunda de las cuales conduce al alimento hasta la boca del animal. Este mecanismo es evidente en las formas adultas de *Artemia*. Las formas naupliarias se nutren de las reservas vitelinas acumuladas en el llamado “órgano nupal”, hasta el estado II (Heath, 1924), a partir de entonces el alimento es capturado por filtración mediante las segundas antenas. A medida que los telopoditos de los filópodos se van desarrollando paulatinamente, se incorporan a estas funciones.

Los mecanismos de alimentación de *Artemia* han sido referenciados extensivamente (Provasoli y Shiraishi, 1959; Reeve, 1963 a, b, c; Barlow y Sleigh, 1980; Dobbeleir y cols., 1980) describiendo a este género como un continuo filtrador simple, obligado y no selectivo, que ingiere partículas en un rango de tamaño de 1 a 50 μm . Sin embargo se ha visto que *Artemia* es capaz de modificar su comportamiento alimenticio; así, por ejemplo se han observado poblaciones de *Artemia* alimentándose sobre el sustrato de los sedimentos en el GSL (Eardley, 1938), sobre nódulos de cianobacterias en el Lago Albert, Oregón (EE.UU.) (Conte y Conte, 1988) y, tal y como se ha demostrado más recientemente (Savage y Knott, 1998), sobre las diatomeas bénticas depositadas en el fondo de lagos no estratificados poco profundos.

En los biotopos donde habita *Artemia* las arqueobacterias suelen representar la biota predominante, constituida principalmente por los géneros *Halobacterium* y *Halococcus*, desarrolladas a partir de los elevados contenidos en materia orgánica de las salmueras. Las microalgas halófilas suelen estar representadas por *Dunaliella* sp. y *Asteromonas* sp. Además puede aparecer una gran variedad de otros grupos como diatomeas (*Bacillariophyceae*) y cianofíceas (*Cyanophyceae*).

Aunque en la última década se ha avanzado mucho en el estudio de medios hipersalinos (ver www.isslr.org), los conocimientos actuales sobre las relaciones tróficas entre *Artemia* y el medio en que vive son relativamente pobres, escaseando los trabajos de campo. Los avances en la investigación sobre *Artemia*, ya sea en aspectos de su alimentación, bioquímica o genética, como de su uso práctico en la

acuicultura, dependerán en gran parte del conocimiento que se tenga de la ecología de sus poblaciones.

1.4. VARIABILIDAD EN LA COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE *Artemia*

Desde que en los años 30 autores norteamericanos y noruegos (Seale, 1933; Rollefson, 1939) pusieran de manifiesto la idoneidad de los nauplios de *Artemia* como alimento larvario de peces, su uso se ha convertido en un eslabón prácticamente insustituible en la larvicultura marina y dulceacuícola (Kinne, 1977). Sin embargo, durante los años 60 y 70 aparecieron en la literatura científica datos preocupantes acerca de masivas mortalidades ocurridas en cultivos de larvas de peces y crustáceos, especialmente cuando se empleaban nauplios procedentes de determinados *stocks* de quistes de diferentes razas o variedades de *Artemia* (Watanabe y cols., 1978a; Schauer y cols., 1980; Fujita y cols., 1980). Se habló de variaciones en el nivel nutritivo de los nauplios obtenidos de quistes de diferente origen geográfico, aunque también se detectaban calidades nutricionales muy dispares entre distintas muestras o recolecciones de quistes de una misma población en diferentes épocas del año (Schauer y cols., 1980).

De entre las muchas explicaciones que se adujeron a este fenómeno, pronto se mostró como más relevante la que relacionaba el valor nutritivo con la presencia de adecuados niveles de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, esenciales al menos para animales marinos (Watanabe y cols., 1978b; Léger y cols., 1986).

El estudio de los perfiles lipídicos de nauplios de distintas especies de *Artemia*, y con diferente origen geográfico, revela que éstas pueden clasificarse en dos grandes grupos (Watanabe y cols., 1978a): el tipo dulceacuícola ("*freshwater-type Artemia*"), con altos niveles de ácido linolénico (18:3n-3, LNA) y ausencia o escasa presencia de ácido eicosapentaenoico (20:5n-3, EPA); y el tipo marino ("*marine type Artemia*") con menores contenidos del primero y presencia apreciable del segundo. Es de señalar, sin embargo, que los altos contenidos de EPA hacen referencia a cantidades que no sobrepasan el 13% del total de los ácidos grasos, mientras que el LNA, en el tipo dulceacuícola, puede rebasar el 30% (como en el caso de algunas muestras de GSL).

El EPA, junto con el ácido docosahexaenoico (22:6n-3, DHA), ausente, o presente en ínfimas cantidades, en nauplios de *Artemia* (Schauer y cols., 1980; Léger y cols., 1986; Cowgill y cols., 1987; Navarro, 1990), se encuentra en el zooplancton y fitoplancton

marinos, alimentos naturales de los animales en este medio, por lo que éstos no han desarrollado un equipo enzimático capaz de sintetizarlos a partir de otros precursores, radicando aquí la esencialidad de los mismos.

Los ácidos grasos más importantes encontrados en nauplios, quistes, y ejemplares adultos de *Artemia* son: el 16:0 (palmítico), el 16:1n-7 (palmitoleico), el 18:1n-9 (oleico), el 18:2n-6 (linoleico), el LNA y el EPA, que comprenden alrededor del 80% del total. La revisión más exhaustiva acerca de los perfiles de los ácidos grasos más abundantes en nauplios y quistes de *Artemia* se debe a Léger y cols. (1986), que incluyen datos de muestras de quistes de varios países, y a Navarro (1990), que ofrece una amplia información acerca del valor nutritivo de las poblaciones españolas de *Artemia*.

Es de destacar la extensa labor caracterizadora, desde el punto de vista de la composición en ácidos grasos, que se ha llevado a cabo en las poblaciones del GSL y de la Bahía de San Francisco en California (SFB, EE.UU.), dos de las principales fuentes de quistes comercializados en acuicultura. La especie presente en ambos ecosistemas es la superespecie *A. franciscana*, considerada ya en la actualidad como una especie exótica invasora (Amat y cols., 2005), con una gran capacidad de dispersión (Green y cols., 2005) que, presumiblemente, ha sido potenciada por inoculaciones, deliberadas o no, de las propias empresas salineras o dedicadas al sector de la acuicultura.

Los quistes procedentes del GSL presentan un perfil típicamente dulceacuícola mientras que los procedentes de SFB son adscribibles al tipo marino. Del trabajo de Léger y cols. (1986) se evidencia la elevada variabilidad que presentan los quistes de SFB en su perfil lipídico de lote a lote, incluso dentro del mismo año e idéntica localidad de recolección. Contrariamente, las muestras de GSL son menos variables, mostrando niveles de EPA remarcablemente constantes. Aunque, por este hecho, se ha catalogado a la población de GSL como del tipo dulceacuícola, Navarro (1990) observó que ciertos quistes procedentes de la región suratlántica de la Península Ibérica, que presentaban un típico perfil marino, permitían obtener poblaciones adultas en el laboratorio que, mediante estudios morfológicos y electroforéticos se podían asimilar al biotipo americano de *Artemia* del GSL.

1.5. FACTORES CONDICIONANTES DEL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DE *Artemia*

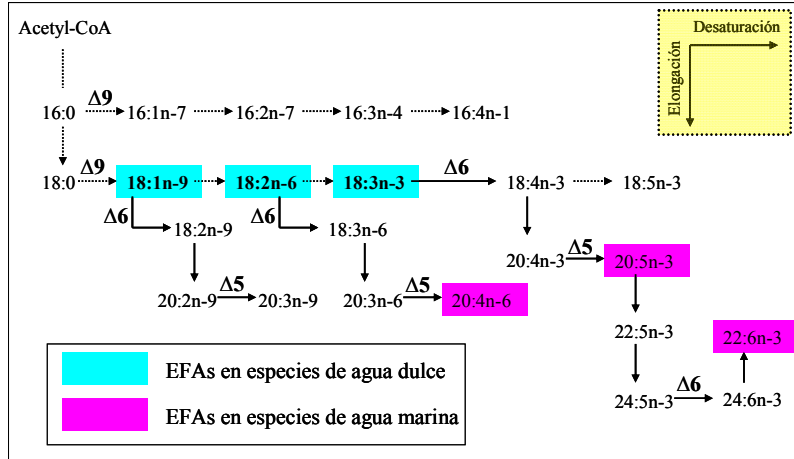
Todavía no se ha dilucidado a qué son debidas las diferencias en la composición de ácidos grasos entre las poblaciones de distinto origen geográfico, e incluso entre distintas muestras pertenecientes a una misma población.

Parece que la composición del alimento disponible en el medio en que viven las hembras ovíparas tiene gran influencia en la cantidad y calidad de los ácidos grasos de dichos quistes (Lavens y cols., 1989; Navarro y Amat, 1992). A pesar de ello, no hay evidencias documentales claras que permitan descartar un componente genotípico determinante del valor nutritivo, especialmente desde el punto de vista de la composición en ácidos grasos (Navarro y Amat 1992). Lo que a grandes rasgos parece claro, es que las poblaciones que se desarrollan en ecosistemas hipersalinos costeros tienen EPA, y que las propias de ecosistemas hipersalinos continentales o de interior presentan elevados contenidos de LNA. Sin embargo, Navarro y cols. (1992) encontraron quistes procedentes de ecosistemas de interior con niveles de LNA propios de muestras del tipo dulceacuícola, mostrando a la vez cantidades de EPA propias de muestras del tipo marino. En la literatura no se encuentran evidencias de quistes procedentes de ecosistemas costeros con perfiles típicamente dulceacuícolas.

En general, el perfil de ácidos grasos de *Artemia* está más próximo al de los insectos terrestres (Thompson, 1973) que al de crustáceos como los copépodos marinos, constitutivos del alimento natural de las larvas de peces marinos (Witt y cols., 1984). De hecho, el género *Artemia* está filogenéticamente entroncado con el medio dulceacuícola, como lo demuestran, entre otros, argumentos relacionados con su osmorregulación (Croghan, 1958).

Generalmente, sólo las plantas son capaces de biosintetizar *de novo* PUFAs de las series (n-3) y (n-6), aunque se han descrito casos en los que algunos invertebrados y protozoos también pueden hacerlo (Gurr y Harwood, 1991; Cook, 1996; Pond y cols., 1997 a, b, 2002). En especies de agua dulce, los ácidos grasos que ocupan la categoría de esenciales (EFAs) son el ácido linolénico (LNA, 18:3n-3) y el ácido linoleico (LA, 18:2n-6), a partir de los cuales pueden sintetizarse otros ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (*Highly Unsaturated Fatty Acids*, HUFAs) mediante elongaciones de la cadena hidrocarbonada (catalizada por elongasas) e insaturaciones (catalizadas por desaturasas) (Figura 1.4). El género *Artemia*, con origen dulceacuícola y adaptado a condiciones de salinidad extrema

como único mecanismo de supervivencia ante la presión de predadores, muestra cierta capacidad de biosintetizar HUFAs como el ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3) (Watanabe y cols., 1978a; Schauer y Simpson, 1985; Navarro y cols., 1991; Ito y Simpson, 1996). También se han descrito algunas especies de insectos que pueden sintetizar ácidos grasos de la serie (n-6) (Cripps y cols., 1986).



(Dalsgaard y cols., 2003; Zheng y cols., 2004)

Figura 1.4. Rutas principales de síntesis de ácidos grasos de 20 y 22 carbonos desde sus precursores C18 en las series n-3, n-6 y n-9. Las flechas discontinuas muestran las rutas biosintéticas exclusivas de productores primarios. La flecha vertical hacia arriba representa el acortamiento de la cadena que tiene lugar en los peroxisomas. La enzima $\Delta 6$ desaturasa actúa en dos pasos, mientras que la $\Delta 5$ lo hace en uno solo. EFAs: ácidos grasos esenciales.

Los lípidos contenidos en un quiste o en un nauplio de *Artemia* proceden de sus reservas de vitelo, que procede, a su vez, de las hembras ovíparas, las cuales sintetizan, transforman y catabolizan los ácidos grasos que obtienen de la dieta. Por lo tanto, los factores condicionantes de un determinado perfil de ácidos grasos en *Artemia* serán tanto ambientales como genotípicos. Dependiendo de los factores genéticos propios de una determinada especie o población de *Artemia*, como de las condiciones ambientales donde habite, este crustáceo presentará un determinado perfil en su composición de ácidos grasos. Los individuos adultos de una población, así como los quistes que produzcan, deberían reflejar la composición de la dieta, al menos en ciertos ácidos grasos bioindicadores de eslabones tróficos (Navarro y cols., 1991). Así, la abundancia relativa de poliinsaturados

(n-6) señalaría la presencia de protozoos y organismos bentónicos en la dieta; los 16:0, 16:1n-7, 18:3n-3 y 20:5n-3 denotarían la influencia de una dieta fitoplanctónica y el 15:0 y el 17:0 se asociarían a lípidos del sedimento (Desvillettes y cols., 1994).

Otro de los factores que podría estar condicionando la composición en ácidos grasos de *Artemia* es la temperatura del medio donde habita. Todas las poblaciones de *A. tibetiana* (propias de ecosistemas hipersalinos continentales a gran altitud) descritas en la literatura, muestran unos perfiles de ácidos grasos típicamente marinos (con altos contenidos en HUFAs). La teoría que explicaría este hecho estaría vinculada al mantenimiento de la fluidez en la estructura de las membranas (Sinensky, 1974), tal y como ha sido descrito en algunas especies de copépodos marinos (Nanton y Castell, 1999) o bien, por un aumento en los HUFA en el fitoplancton del que se alimentan estas poblaciones de *Artemia*, por una mayor incidencia de las radiaciones ultravioleta, como señalan Van Stappen y cols. (2003).

Hay que señalar que la mayoría de resultados experimentales obtenidos sobre el efecto de la dieta fitoplanctónica en la composición de ácidos grasos de *Artemia*, se han llevado a cabo en un número reducido de especies. De entre ellas destaca *A. franciscana* procedente del GSL, que es la especie mejor caracterizada en este sentido, principalmente por su extendido uso en las prácticas de enriquecimiento para la alimentación de larvas de peces (Monroig, 2006). Sin embargo, queda mucho por investigar en especies tan poco estudiadas hasta la fecha como es el caso de *A. persimilis* y *A. franciscana* procedentes de los biotopos argentinos.

Las experiencias acerca del efecto de la dieta sobre la composición de ácidos grasos en *Artemia* se han realizado, en la mayoría de los casos, en condiciones controladas de laboratorio en las que el alimento es suministrado *ad libitum*, reflejando unas condiciones que se podrían denominar de “alimentación forzada”. Dada la gran plasticidad fenotípica de *Artemia*, bajo estas condiciones el efecto genotípico que pudiera haber sobre su composición en ácidos grasos quedaría enmascarado por el efecto del alimento.

Surge la necesidad, por lo tanto, de diseñar experimentos que reflejen las condiciones naturales donde vive *Artemia*, ajena a cualquier situación experimental que pudiera enmascarar de algún modo los factores que condicionan su perfil de ácidos grasos. En este sentido los estudios en mesocosmos serían los más adecuados, ya que se trata de un paso intermedio entre un estudio en ambientes naturales, donde es difícil seguir e interpretar todas las posibles variables que

pueden influir en la composición de ácidos grasos de *Artemia* y, un estudio en laboratorio (microcosmos) donde se fijan todas las variables (temperatura, salinidad, alimento etc.) que serían obligadas y continuas en el tiempo. Estos ambientes artificiales, en los que los parámetros ambientales están controlados de manera constante, permitirían evaluar de una manera más real su efecto sobre la composición de ácidos grasos de las poblaciones de *Artemia*.

Aunque *Artemia* refleja en gran medida el perfil de ácidos grasos de la dieta suministrada, Navarro y Amat (1992) encontraron ciertos niveles de EPA en quistes de *Artemia* cuyas poblaciones adultas habían sido alimentadas con una dieta carente en este ácido graso, y sugirieron una influencia genética en estos resultados.

Se sabe que el fenotipo es el resultado del efecto del genotipo, del ambiente y de la interacción de ambos. Por tanto, en el caso de *Artemia*, el fenotipo de las poblaciones sería el perfil, marino o dulceacuícola, y aunque el efecto ambiental (dieta) es muy notable, todavía no se conoce si existe la influencia de algún efecto genotípico y, aunque exista, hasta qué punto contribuye al fenotipo. Esta caracterización no resulta tarea fácil. La existencia de un gen concreto podría no ser condición necesaria y suficiente para explicar el perfil marino/dulceacuícola (podría tratarse de varios genes), y además, la influencia del ambiente podría estar actuando sobre el efecto de esos genes, modificando su expresión (variable). Es decir, se estaría ante situaciones complejas de carácter multifactorial donde, además, no se conocen los fundamentos moleculares del fenotipo marino/dulceacuícola. No se sabe si los patrones de herencia se ajustan a modelos mendelianos sencillos, principalmente debido a que el efecto ambiental, sobre todo el tipo de alimento, estaría actuando de manera muy marcada y continua sobre las poblaciones. Ante una situación como esta, la única estrategia posible consiste en el análisis de marcadores genéticos polimórficos de carácter aleatorio, tales como los RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*), que permitan establecer la base genética de los perfiles marino/dulceacuícola.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

Los principales objetivos planteados en el presente trabajo están enmarcados en los proyectos de investigación “Caracterización de nuevas poblaciones como origen del recurso natural quistes de *Artemia* para Acuicultura” (Ref. MCYT AGL2001-1969), y “Biodiversidad de *Artemia*: fuentes actuales y su explotación sostenible” (Ref. ICA4-CT-2001-10020). La amplia diversidad de muestras de quistes de *Artemia* disponible a raíz de la ejecución de dichos proyectos, procedentes de poblaciones de diferentes especies (*A. tibetiana*, *A. franciscana* y, especialmente, *A. persimilis*), así como su procedencia de biotopos muy diversos (salinas marinas, lagos y lagunas de diverso tamaño, etc.) han proporcionado abundante material y tema de investigación para la memoria de la presente Tesis Doctoral.

Se ha llevado a cabo un exhaustivo estudio sobre la localización de *Artemia* en Argentina, que ha proporcionado información sobre la existencia de un buen número de poblaciones de *A. persimilis* y *A. franciscana* en dicho país. La prospección de estos ecosistemas ha permitido reunir una gran cantidad de muestras representativas de numerosas áreas geográficas. Estas muestras proceden de biotopos hipersalinos tanto costeros como continentales, algunos de ellos de suficiente entidad (miles de Ha) para producir cantidades importantes de quistes con destino a la acuicultura, y que puedan, a corto plazo, ayudar a aliviar la crisis debida a la actual escasez del recurso.

Hasta la fecha, el estudio del valor nutritivo como uno más dentro de los diversos aspectos a tener en cuenta en la caracterización de una determinada población de *Artemia* se ha centrado en el análisis de la composición de ácidos grasos con el propósito de su aplicación a al cultivo larvario. Se podría decir que se ha prestado mucha atención a los aspectos productivos sin considerar los factores que contribuyen a la calidad de los quistes. De hecho, existe muy poca información acerca de los factores que condicionan la presencia de un determinado perfil de ácidos grasos en una población y/o especie de *Artemia*. Es precisamente en este contexto donde se enmarca el presente trabajo. El objetivo general de la presente memoria se centra en la prospección de nuevas poblaciones de *Artemia*, en su caracterización bioquímica y molecular y en el estudio de los principales factores ecológicos y/o ambientales que condicionan el perfil de ácidos grasos de las poblaciones.

Los objetivos particulares planteados en este trabajo fueron:

1. Prospeccionar fuentes alternativas de *Artemia* con origen en Argentina. Se analizan los perfiles de ácidos grasos de un gran

número de poblaciones de *Artemia* silvestres halladas en Argentina, procedentes de lagos, salinas y lagunas de diverso origen, adscribiéndolas a los tipos marino/dulceacuícola y continental/costero, y se elaboran hipótesis que puedan dar explicación a la variabilidad encontrada.

2. Caracterizar diversas poblaciones argentinas de *Artemia* mediante marcadores moleculares (RFLPs). Esta técnica permite obtener patrones moleculares de identidad, a la vez que ofrecer información sobre la diversidad tanto inter- como intraespecífica que puede relacionarse con los perfiles de ácidos grasos encontrados en *Artemia*.

3. Estudiar del efecto de la dieta sobre la composición de ácidos grasos, supervivencia y parámetros reproductivos en *Artemia*. Se estudia la influencia del alimento suministrado a las poblaciones sobre la composición de ácidos grasos de la descendencia y sobre determinados parámetros demográficos como son la supervivencia, variables reproductivas y periodos de vida de las hembras en cultivos individuales.

4. Estimar el efecto de la temperatura sobre la composición de ácidos grasos de biomasas y quistes de *Artemia*. Se evalúa el efecto de los cambios de la temperatura de cultivo sobre la composición de ácidos grasos de biomasas y quistes de *Artemia*.

5. Evaluar la variabilidad en la composición de ácidos grasos de *Artemia* cultivada en mesocosmos. Se estudia el efecto de la variación estacional en la composición de ácidos grasos de *A. persimilis* en sus diferentes estadios de desarrollo, así como su correlación con los parámetros físico-químicos y ambientales. Además, se examina la variabilidad inter- e intraespecífica en la composición de ácidos grasos de dos especies de *Artemia* que coexisten en un mismo hábitat, y se estudian sus relaciones tróficas a través de los ácidos grasos biomarcadores.

CAPÍTULO 3

MATERIAL Y MÉTODOS COMUNES

3.1. RECOLECCIÓN Y PROCESADO DE LAS MUESTRAS

Los quistes de *Artemia* objeto de este estudio proceden de:

1) Poblaciones silvestres desarrolladas en ecosistemas naturales que, en algunos casos, pueden estar intervenidos por la actividad humana como es el caso de las lagunas saladas o salinas dedicadas a la extracción de sal.

2) Cultivos desarrollados en las propias instalaciones del Instituto de Acuicultura de Torre la Sal (IATS) que, a su vez, pueden tener distinta procedencia: producidos por biomasas cultivadas en laboratorio donde se controla el tipo de nutrición microalgal (prácticamente monoaxénica), u obtenidos de poblaciones cultivadas en mesocosmos, al aire libre donde el control del alimento disponible es limitado (Capítulo 8).

3.1.1. Quistes de poblaciones silvestres

En los lagos, lagunas o salinas en que se desarrollan las poblaciones de *Artemia* que les dan origen, los quistes flotantes son empujados por el oleaje y los vientos dominantes hacia las orillas. Allí se acumulan en capas de varios centímetros de espesor, ocupando a veces grandes extensiones. La constancia de los vientos facilita la acumulación en la superficie de salmuera o en las orillas, desde donde se procede a su recogida.

Los quistes suelen mezclarse con arena, fango y otros residuos, por ello es necesario un procesado más exhaustivo. Una vez en el laboratorio, el tratamiento más inmediato consiste en un tamizado y una flotación en salmuera concentrada (250-300 g l⁻¹) en recipientes de base cónica. Tras una intensa agitación por burbujeo de aire, los quistes, cáscaras vacías y otros materiales ligeros se acumulan en la superficie de la salmuera, una vez detenida la agitación. Seguidamente se procede a una separación por tamizado de esta fase superficial, que permite la retención de las fracciones gruesas de los residuos acompañantes y el paso de los quistes y cáscaras. Suelen utilizarse telas de nylon de 0,5 a 1 mm de luz de malla. Tras el tamizado se recogen en mallas de 100 a 150 µm que retienen los quistes y permiten eliminar las fracciones más finas formadas por limos. Los quistes que aún presentan impurezas son resuspendidos de nuevo en salmuera para facilitar una nueva separación. El segundo paso requiere separar los quistes de las cáscaras. Para ello se somete todo el material flotante en salmuera a una intensa agitación por

burbujeo de aire, en agua destilada. Al detener la agitación, las cáscaras vacías y demás residuos ligeros flotan en la superficie, mientras que los quistes aprovechables decantan en el fondo del recipiente desde donde se recuperan mediante sifonado. Acto seguido se escurren en una malla de luz apropiada (60 μm) con el fin de eliminar la mayor parte de agua intersticial. Posteriormente se deshidratan y secan en estufa a 38-40°C durante 24 h. Una vez bien secos se procede a su envasado en bolsas de plástico al vacío y con sellado térmico para evitar el efecto del oxígeno y de la humedad sobre la viabilidad de los embriones enquistados. Habitualmente suelen ser almacenados a 4°C hasta el momento de su uso.

3.1.2. Quistes de poblaciones de laboratorio

Para la producción de quistes de laboratorio a partir de poblaciones en cultivo se emplearon tanques troncocónicos o bandejas de 150 l y 4 l de capacidad, respectivamente, dotados de aireación. La magnitud de los cultivos dependió de la cantidad de quistes precisa para la experimentación.

Los cultivos se iniciaron a partir de nauplios eclosionados de quistes procedentes de poblaciones naturales. Los animales se alimentaron durante el plazo determinado para cada experiencia con cultivos microalgales de diversas especies: *Dunaliella* sp., *Tetraselmis suecica*, *Porphyridium cruentum* y *Phaeodactylum tricornerutum* procedentes de la colección del IATS.

Las microalgas se añadían a los tanques de cultivo periódicamente con la intención de mantener una concentración que permitiera una alimentación *ad libitum* para *Artemia*, excepto en los periodos de inducción al oviparismo. Dicha inducción se llevó a cabo mediante la reducción del alimento y el aumento de la salinidad y, en ocasiones, eliminando la aireación. Cuando se observaba la presencia de quistes en la superficie del cultivo y en las paredes de los recipientes se retiraban del modo más adecuado. Una vez tamizados y procesados se almacenaron en salmuera concentrada (250 g l⁻¹) y a 4°C, hasta el momento de su análisis.

3.1.3. Eclosión de quistes de Artemia

Como eclosionador se utilizó un recipiente de 60 l de capacidad dotado de un calentador termostático. En él se dispusieron 12 tubos cilíndricos de cristal, de base cónica, de 1 l de volumen, 6,5 cm de diámetro y 48 cm de altura, en los que se efectuaron las eclosiones.

La obtención de nauplios se llevó a cabo según el protocolo que se describe a continuación:

- Los tubos de cristal semisurmegidos en el eclosionador se llenaron con agua de mar:agua destilada (1:1, v/v) y se aclimataron a la temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$.

- Se incubaron 100 mg de quistes (cantidad que pudo variar en función de la disponibilidad de muestra) y se sometieron a una agitación vigorosa por medio de aireación continua. Un tubo fluorescente proporcionaba al sistema una iluminación constante de 1500 lux sobre la superficie del agua.

- Tras periodos de incubación de 24 o 48 h se detuvo la aireación con la finalidad de separar los nauplios de las cáscaras y quistes no eclosionados.

- Aprovechando el fototactismo positivo de los nauplios se dispuso un foco de luz cerca del fondo del tubo de eclosión donde los nauplios se concentraban.

- Los nauplios acumulados en el fondo de los tubos de eclosión se extrajeron mediante sifonado, y se recogieron en una malla de plancton de luz de 100 μm . Posteriormente se lavaron abundantemente en agua dulce y se transfirieron a un nuevo tubo lleno de agua dulce con el fin de eliminar la mayor cantidad de quistes sin eclosionar que habían decantado con los nauplios recién eclosionados. Dichos nauplios eran nuevamente sifonados y transferidos a recipientes de cultivo para proceder a la obtención de biomásas de metanauplios, juveniles y adultos empleados en diferentes diseños experimentales.

3.2. CULTIVO DE *Artemia*

El cultivo de *Artemia* en laboratorio se llevó a cabo en recipientes carentes de circuito y con aporte manual de los cultivos de microalgas. Para llevar a cabo las experiencias se eligieron recipientes con una capacidad de 4 l (en caso de no especificarse lo contrario) dotados de aireación mediante tubo de varilla de vidrio que facilitaba la distribución uniforme del medio y el aporte de oxígeno (Figura 3.1).

Los recipientes contenían 3 l de medio cada uno, con una densidad poblacional aproximada de 100 individuos l^{-1} . El medio era renovado tres veces por semana con la adición de nuevos cultivos microalgales. De forma periódica se eliminaron los animales muertos que yacían en el fondo de los recipientes mediante sifonado, con el fin

de evitar el acumulo de materia orgánica que pudiera resultar nociva para el cultivo.

La temperatura fue de $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ y el fotoperiodo de 12:12 h, luz:oscuridad. Estas condiciones estándar se fijaron gracias a una cámara climática. La salinidad se mantuvo entre 60-70‰ (refractómetro Shibuya® S-1, Optical Co. Ltd, Saitama, Japan). Este equipo permitió cambiar las condiciones de cultivo cuando fue preciso.



Figura 3.1. Cultivo de diversas poblaciones de *Artemia* en las instalaciones del IATS.

3.3. CULTIVO DE FITOPLANCTON

Se partió de cultivos de cepas puras de especies fitoplanctónicas, aisladas en el centro u obtenidas de otros laboratorios, que se mantienen en cámara termostaticada. Los inóculos iniciales se sembraron en frascos Erlenmeyer de 250 ml, en agua de mar o salmuera, filtrada (0,4 a 4,5 μm de luz de malla) y esterilizada mediante rayos ultravioleta, a las que se añadieron los nutrientes necesarios (medio f / 2 de Guillard y Ryther (1962), Tabla 3.1). Se utilizaron salmueras de 90-100 g l^{-1} para el cultivo de especies microalgales halófilas como *Dunaliella salina* y *Dunaliella* sp..

A partir de estos cultivos microalgales en pequeño volumen, una vez alcanzada la fase de crecimiento exponencial, se sembraron volúmenes mayores, habitualmente matraces esféricos de 2 l de

Tabla 3.1. Composición del medio f / 2 de Guillard y Ryther (1962). Pesos que se disuelven en un litro de agua de mar esterilizada y filtrada.

NUTRIENTES ESENCIALES		mg
Na NO ₃		75,000
Na H ₂ PO ₄ H ₂ O		5,000
Cl NH ₄		26,500
METALES TRAZA		
Na ₂ EDTA		4,360
Fe Cl ₃ 6H ₂ O		3,150
Cu SO ₄ 5H ₂ O		0,010
Zn SO ₄ 7H ₂ O		0,022
Co Cl ₂ 6H ₂ O		0,010
Mn Cl ₂ 4H ₂ O		0,180
Na Mo O ₄ 2H ₂ O		0,006
VITAMINAS		µg
Tiamina HCL		0,100
Biotina		0,500
B ₁₂		0,500

capacidad, dotados de aireación mediante difusores para evitar la sedimentación de las células.

Los Erlenmeyer de 250 ml y los matraces de 2 l se mantuvieron en una cámara de cultivo isotérmica, a temperatura constante de $21 \pm 1^\circ\text{C}$, con iluminación continua mediante tubos fluorescentes.

Los cultivos fitoplanctónicos desarrollados en pequeños volúmenes en la cámara se utilizaron para inocular recipientes cilindro-cónicos de metacrilato de 80 l de capacidad. Estos estaban provistos de intensa aireación desde el fondo, y su ubicación les permitía iluminación natural, suplida con baterías de fluorescentes a voluntad. La temperatura fue estrictamente la ambiental, salvo en el caso de indicarse lo contrario. El agua de mar o la salmuera se esterilizaron por medio de luz ultravioleta y el medio nutritivo fue el mismo que el utilizado en los inóculos.

Con el fin de mantener el cultivo en fase exponencial, en función de la temperatura ambiental o de la especie microalgal, se eliminaban las dos terceras partes del medio de dos a tres veces por semana y se reponían con medio fresco, de modo que el volumen de fitoplancton residual actuara como nuevo inóculo.

La determinación de la cantidad inicial de microalgas que se suministraba a los cultivos de *Artemia* se contabilizó mediante el cálculo de la concentración celular utilizando una cámara de contaje

Neubauer. La recolección de las muestras de fitoplancton para los análisis de ácidos grasos y clorofila se llevó a cabo filtrando un volumen de 0,5-2 l de cultivo a través de filtros de fibra de vidrio Wathmann GF/C (Whatman, Maidstone, Reino Unido) en matraz Kitasato, previo tamizado a través de una malla de 60 μ m de luz. Las muestras de fitoplancton retenidas en los filtros se congelaban a -80°C y se liofilizaban antes del análisis de ácidos grasos o, se preservaban en acetona al 90% a 4°C, previo al análisis de pigmentos.

3.4. CONTROL DE LOS PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS DEL MEDIO

En las distintas localidades y estaciones de muestreo en las que se recolectaron quistes y/o biomasas de *Artemia* naturales y en los cultivos experimentales (mesocosmos), se registraron la temperatura, la salinidad, el pH, y el oxígeno disuelto. Asimismo se tomaron muestras de 1 a 2 l destinadas al análisis de clorofila *a* y materia orgánica en los experimentos desarrollados en mesocosmos.

3.4.1. Temperatura

La temperatura de las salmueras se registró con un termómetro digital (Hanna Instruments, Rhode Island, EE.UU.) y, alternativamente, con un termómetro de columna de mercurio. Los registros se hacían en superficie en el caso de estanques someros en salinas. Para estanques y evaporadores más profundos, o en los cultivos experimentales, con una acentuada estratificación, se registraron los valores medios entre el fondo y la superficie.

3.4.2. Salinidad

Se tomó *in situ* con un refractómetro Shibuya[®] S-1 (Optical Co. Ltd, Saitama, Japón).

3.4.3. pH

Se determinó *in situ* mediante un pH-metro de campo modelo Hanna[®] (Hanna Instruments, Rhode Island, EE.UU.).

3.4.4. Oxígeno disuelto

Se midió la concentración en mg l⁻¹ y en porcentaje de saturación mediante un oxímetro (Hanna Instruments, Rhode Island, EE.UU.).

3.4.5. Clorofila *a*

Habitualmente se determina la clorofila *a* (Chl *a*) por ser el pigmento de síntesis más rápida aunque también más lábil, dado que es el que mejor caracteriza a las poblaciones fitoplanctónicas (Margalef, 1983) ante la necesidad de poner en evidencia su productividad.

Al tiempo que las muestras recogidas del medio se filtraban mediante filtros de fibra de vidrio (ver descripción en apartado 3.3), se iban añadiendo unas pocas gotas de una suspensión de carbonato magnésico al 1% (p/v) con la finalidad de prevenir la acidificación de la muestra de fitoplancton. Una vez plegados, los filtros se introdujeron en tubos de vidrio de 15 ml a los que se les añadió entre 4 y 5 ml de acetona al 90% (v/v), disolvente utilizado para la extracción de los pigmentos. Tras la incubación de los tubos en oscuridad, a -4°C durante 24 h, los filtros se homogeneizaron mecánicamente con homogeneizadores de vidrio de punta esmerilada, con el fin de maximizar la extracción del pigmento. El contenido de cada tubo se filtró a través de un filtro de papel (Whatman, Maidstone, Reino Unido) para separar la acetona y los pigmentos, de los restos de los filtros de fibra de vidrio.

La concentración de Chl *a* se determinó de acuerdo con el método de Strickland y Parsons (1972), leyendo la extinción en un espectrofotómetro (Spectrophotometer Hitachi U-2001, Hitachi Instruments, INC. Tokyo, Japón) a longitudes de onda de 664, 647, 630 y 750 nm. Las medidas de extinción de cada longitud de onda fueron corregidas por una pequeña turbidez del blanco mediante sustracción de la lectura a 750 nm sobre las absorciones de 664, 647 y 630 nm. El contenido de Chl *a* se calculó mediante la ecuación:

$$\text{Chl } a \text{ (}\mu\text{g ml}^{-1}\text{)} = 11.85 E_{664} - 1.54 E_{647} - 0.08 E_{630}$$

$$\text{Chl } a \text{ (}\mu\text{g l}^{-1}\text{)} = (\text{Chl } a \text{ (}\mu\text{g ml}^{-1}\text{)} * v) / (V * 10)$$

E = absorbancia a las diferentes longitudes de onda corregidas por la lectura a 750 nm.

v = volumen de acetona en ml.

V = volumen de muestra filtrada en l.

3.4.6. Materia Orgánica

En un medio acuático la materia orgánica particulada (MOP) está formada por una combinación de partículas detríticas, bacterias, fitoplancton y restos del zooplancton que representa una fuente

potencial de alimento para los organismos heterótrofos (Biddanda y Pomeroy, 1988) por lo que su determinación es importante desde el punto de vista de transferencia energética en la cadena trófica donde habita *Artemia*.

En el caso del cultivo en mesocosmos, alrededor de 4 h antes de la toma de las muestras se removía el medio con la finalidad de homogeneizarlo y de que la medida de concentración de MOP fuera representativa de todo el sistema. Se tomaron muestras de 2 l, que se filtraron a través de una malla de nylon de 60 μm de luz. La MOP formada por partículas de talla menor de 60 μm se recuperó sobre filtros de fibra de vidrio tipo Whatman GF/C (Whatman, Maidstone, Reino Unido) previamente sometidos a 425°C en la mufla y pesados. Los filtros con la MOP se secaron en una estufa a 100°C hasta el día siguiente, momento en el que se realizó una nueva pesada. Para poder determinar la fracción de materia orgánica e inorgánica de la muestra, los filtros se introdujeron nuevamente en la mufla durante 4 h para eliminar la fracción orgánica, con lo que en ellos sólo quedaban los restos de la materia inorgánica. Tras una nueva pesada se obtuvo el contenido de materia orgánica de la muestra inicial. Todas las muestras se analizaron por triplicado.

3.5. ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS

3.5.1. Extracción de lípidos totales: método de Folch

La extracción de lípidos totales en muestras de quistes y biomásas de *Artemia* se realizó mediante una modificación del método propuesto por Folch y cols. (1957).

Previamente a la extracción de los lípidos, los quistes se descapsularon con el fin de facilitar la homogeneización de su contenido (embrión) tras eliminar la cáscara o corion. La descapsulación consiste en la disolución de la cubierta lipoproteica externa del quiste (corion) mediante su tratamiento con hipoclorito. Antes de proceder a la descapsulación, los quistes son hidratados con agua destilada durante 2 h para que adquieran la forma esférica idónea que facilita la actuación del reactivo en toda su superficie. Como agente descapsulante se utilizó lejía (hipoclorito sódico) aplicando la metodología basada en los trabajos de Bruggeman et al., (1979).

Una vez sometidos a la acción del hipoclorito, al observarse el cambio del color pardo original de los quistes a un tono anaranjado, propio de los carotenos del embrión, se finalizaba el tratamiento y se procedía a su lavado sobre una malla de 150 μm de luz. Se requieren

repetidos lavados con agua dulce para eliminar totalmente los residuos de descapsulante.

El peso seco y el contenido de humedad de los quistes descapsulados se determinó a partir de tres submuestras o réplicas, convenientemente escurridas, mantenidas durante 24 h a 100°C (Mettler Toledo, L'Hospitalet de Llobregat, España, precisión 0,01 mg).

Los quistes descapsulados se homogeneizaron mecánicamente en homogeneizadores tipo Potter, con una mezcla de cloroformo:metanol (2:1, v/v) que contenía el antioxidante hidroxitolueno butilado (BHT, Sigma, Alcobendas, España) a una concentración de 0,01% (p/v). Al volumen total de homogeneizado se le añadía una cuarta parte de una disolución acuosa 0,88 KCl (p/v). Tras la agitación de la mezcla y posterior centrifugación durante 2 min a 600 g se retiraba el sobrenadante, filtrando la fase orgánica infranadante a través de un filtro de papel (Whatman, Maidstone, Reino Unido). Se repetía el mismo proceso con el *pellet*, con el fin de maximizar la extracción de lípidos de la muestra. Las dos fases orgánicas filtradas en ambas extracciones se secaban bajo flujo de N₂. El extracto de lípidos se trasvasaba a un vial de vidrio previamente pesado en el que se realizaba el secado completo con N₂. La masa de lípidos totales obtenidos de la muestra inicial se obtenía por gravimetría. Las muestras de extractos lipídicos se conservaron disueltas a una concentración conocida en una mezcla de cloroformo:metanol (2:1, v/v) que contenía 0,01% (p/v) de BHT. El aire presente en el vial era desplazado con N₂ seco con el fin de minimizar la oxidación de las muestras durante su almacenamiento.

3.5.2. Derivatización de ácidos grasos

El análisis de los ácidos grasos se realizó por cromatografía gaseosa a partir de los ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAMES) obtenidos por derivatización de las muestras de extracto lipídico.

Este proceso de derivatización, que se conoce por transmetilación catalizada por ácido (Christie, 1982), consiste en añadir una cantidad conocida de extracto lipídico a 1 ml de tolueno y 2 ml de una disolución 1% H₂SO₄ en metanol, y someterla a 50°C durante un periodo aproximado de 16 h. Tras este proceso, los FAMES se recuperaban mediante dos extracciones líquido:líquido consecutivas. La primera se realizaba sobre la muestra incubada, añadiendo 5 ml de agua destilada y 5 ml de una disolución de hexano:éter dietílico (1:1, v/v). Tras la agitación de la mezcla y centrifugación durante 2 min a 600 g se recogía la fase sobrenadante,

sobre la cual se llevaba a cabo la segunda extracción. Para ello, se añadía 1,5 ml de una disolución acuosa 2% (p/v) de KHCO_3 , se agitaba y se centrifugaba durante 2 min a 600 g. La fase sobrenadante era trasvasada a otro tubo donde se secaba con N_2 seco. Finalmente la muestra era transferida a viales, donde se conservaba disuelta en un volumen aproximado de 140 μl de hexano:éter dietílico, como paso previo a la purificación de los FAMES.

La purificación se llevaba a cabo mediante cromatografía de capa fina en placas de gel de sílice G 60 de 20x20 cm (Merck, Darmstadt, Alemania), eluidas con un solvente compuesto por hexano:éter dietílico:ácido acético glacial (85:15:1,5, v/v/v). La elución de un estándar en la misma placa y su posterior revelado con una disolución de yodo resublimado 1% (p/v) en cloroformo, permitía estimar la posición de la fracción de los FAMES de las muestras. La fracción correspondiente a cada muestra era recuperada mediante el rascado del gel de sílice correspondiente al área donde se hallaba la fracción de ésteres metílicos. Los FAMES presentes en el gel de sílice se resuspendían en hexano:éter dietílico mediante agitación y posterior centrifugación de 2 min a 600 g. La fracción líquida se trasvasaba a otro tubo donde se llevaba a cabo el secado completo con N_2 seco. Finalmente, los ésteres metílicos purificados se trasvasaban a viales de vidrio mediante su resuspensión con hexano (2 mg ml^{-1}) que contenía BHT (0,01%, p/v). De esta forma, las muestras estaban preparadas para ser inyectadas en el cromatógrafo de gases.

3.5.3. Condiciones cromatográficas

Los ácidos grasos se analizaron en un cromatógrafo Fisons Instruments (GC 8000 Series, Fisons Instruments, Rodano, Italia) equipado con una columna tubular abierta de 30 m x 0,25 mm (Tracer, TRWAX, espesor de capa: 0,25 μm , Teknokroma, Barcelona, España). Las muestras, inyectadas en frío por el sistema de inyección en columna, se eluyeron con helio como único componente de la fase móvil, bajo un gradiente térmico de 50 a 220°C. Las señales procedentes de un detector de llama (Fisons Instruments, Rodano, Italia) se recogían en un sistema informático equipado con la aplicación *Chrom-Card for Windows* (CE Instruments, Milán, Italia), durante los 40 min que duraba la elución de las muestras. La identificación de los diferentes ácidos grasos se realizó por comparación de los cromatogramas de las muestras con estándares conocidos como el que aparece en la Figura 3.2.

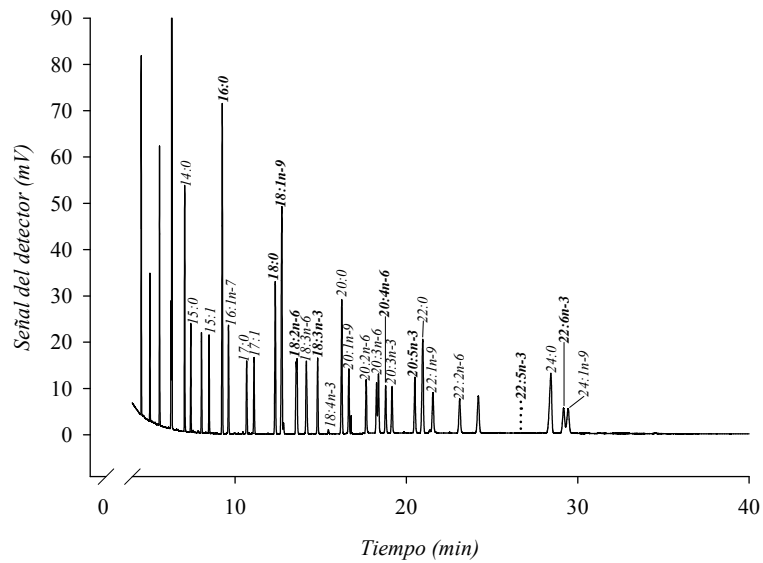


Figura 3.2. Separación de ésteres metílicos de ácidos grasos mediante una técnica de cromatografía gaseosa (GC) con una columna tubular abierta y detección por ionización de llama de un patrón comercial (37 Component FAME Mix de Supelco).

3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el programa SPSS versión 13.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, EE.UU.).

Se analizó la condición de normalidad de todas las variables consideradas mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov (Sokal y Rohlf, 1981) y se realizaron las transformaciones más adecuadas en aquellas variables que no presentaban una distribución normal. La homogeneidad de las varianzas (homocedasticidad) se comprobó mediante la prueba de Levene. Las diferencias entre medias de variables evaluadas en dos tratamientos experimentales (dos niveles de un solo factor de variación) se comprobaron mediante la prueba t de Student para muestras independientes. Las diferencias entre medias de variables evaluadas en más de dos tratamientos experimentales (más de dos niveles en un sólo factor de variación) se determinaron mediante el análisis de la varianza (*Analysis of Variance*, ANOVA) y posterior prueba de Tukey para la comparación múltiple de medias (Sokal y Rohlf, 1981). Las diferencias entre medias de variables evaluadas en más de dos tratamientos experimentales y dos factores de

variación se comprobaron mediante un análisis de la varianza de dos vías (*two way ANOVA*) para poder estudiar adicionalmente el nivel de significación de la interacción entre los diversos niveles de ambos factores. En el caso de existir heterogeneidad de varianzas, se usaron las pruebas robustas de Welch para determinar diferencias entre medias, y de Games-Howell para el establecimiento de diferencias entre grupos. Como criterio general se tomó el 5% de nivel de significación. En caso contrario se especifica el nivel exacto obtenido al término del análisis.

En los casos en que hubo que tratar un amplio banco de datos (observaciones) como consecuencia de haber medido un elevado número de variables, se aplicó un análisis de componentes principales (*Principal Component Analysis, PCA*). El PCA es una técnica multivariante encuadrada dentro del grupo de técnicas de simplificación o reducción de la dimensión. Este análisis permite transformar un grupo inicial de variables correlacionadas en otro de variables ortogonales denominadas componentes principales (PC).

El propósito del PCA es hallar componentes principales que sean combinaciones lineales de las variables originales que describen a cada muestra. Los PC se eligen de modo que la primera componente principal (PC1) recoge la mayor parte de la variación que hay en el conjunto de datos, la segunda (PC2) recoge la siguiente mayor parte de la variación y así sucesivamente. Por consiguiente, cuando hay correlación significativa, el número de PC útiles será mucho menor que el número de variables originales.

Los primeros PC recogen la mayor parte de la variación en el conjunto de datos. Como resultado, los datos se pueden representar en dos dimensiones en lugar de en las totales de origen.

En términos matemáticos los PC son los autovalores propios de la matriz de correlación y la técnica para encontrar estos autovalores se llama análisis propio. A cada PC (es decir, a cada autovector) le corresponde un autovalor que proporciona la cantidad de varianza en el conjunto de datos que se encuentra explicada por esa componente principal (Vandeginste y cols., 1998).

Hay diversos criterios para decidir el número razonable de factores que permita definir la estructura correcta de los datos y que posibilite su posterior interpretación. Los criterios más importantes son el porcentaje de la varianza explicada y el contraste de caída o gráfico de sedimentación (*screeplot*) de Cattell (1966).

Como paso previo al PCA, es necesario analizar la idoneidad estadística utilizando para ello la prueba de esfericidad de Bartlett y la

medida de Kaiser-Meyer-Okin (KMO). Concretamente, la prueba de Bartlett permite contrastar la hipótesis nula de que la matriz de correlaciones es una matriz de identidad, cuya aceptación implicaría el replanteamiento de la utilización del PCA. Por su parte, la medida de adecuación de KMO es útil para comparar los valores de los coeficientes de correlación observados con los coeficientes de correlación parcial, de tal forma que valores pequeños indican que el PCA no es aconsejable. Kaiser (1970) recomienda como límite de aceptación de este índice KMO valores superiores a 0,6.

CAPÍTULO 4

DIVERSIDAD EN LA COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE POBLACIONES ARGENTINAS DE *Artemia*

4.1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de la producción larvaria y alevinaje de peces y crustáceos marinos en todo el mundo ha provocado una amplia generalización de uso del crustáceo *Artemia* como dieta viva más común. Sin embargo hay dos factores que limitan el uso de *Artemia* en acuicultura marina. El primero radica en la propia escasez del recurso a raíz de las periódicas crisis ocurridas en el Gran Lago Salado de Utah (*Great Salt Lake*, GSL), ecosistema que se ha convertido en el primer productor de quistes de *Artemia* a nivel mundial. El segundo se relaciona con la composición en ácidos grasos de los quistes y/o nauplios, ya que determina el valor nutritivo de los diferentes *stocks* de *Artemia* como alimento para las larvas de peces y crustáceos marinos.

4.1.1. Escasez del recurso *Artemia* y prospección de fuentes alternativas

Al principio de la década de los 50's se dispuso de los primeros *stocks* comerciales de quistes procedentes principalmente de la Bahía de San Francisco (California, EE.UU.) y del Gran Lago Salado de Utah (*Great Salt Lake*, GSL). En aquellos tiempos el precio de los quistes era relativamente bajo, pero las progresivas exigencias derivadas de su uso en la acuicultura en auge y de las irregulares cosechas, empezaron a provocar pequeñas crisis en el sector. En 1976, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (*Food and Agriculture Organization*, FAO) señaló la disponibilidad de quistes de *Artemia* como un factor limitante en el desarrollo de la acuicultura a nivel mundial constituyendo un importante "cuello de botella".

Aunque en la década de los 80's empezaron a aparecer en el mercado quistes procedentes de salinas y lagos salados localizados en Brasil, Australia, Canadá, Colombia, Francia o China, su calidad era muy variable debido a que estos *stocks*, al proceder de distintos países y latitudes, mostraban la presencia de distintas especies de *Artemia*. Del mismo modo, un procesado estándar no garantizaba igual calidad en los *stocks* de procedencia y composición específica diversa. En este momento se incrementaron los esfuerzos de explotación en el GSL, multiplicándose por diez el volumen de las cosechas en relación a campañas anteriores, asegurando un procesado estandarizado más económico y rápido, y una mayor calidad del producto. Ante esta situación, y desde mediados de los años ochenta, el GSL ha monopolizado el 90% del recurso natural de quistes de *Artemia*

consumidos en casi todo el mundo, especialmente en Occidente, de manera que cualquier episodio de baja producción del lago significa una crisis para la acuicultura mundial. La sobreexplotación del ecosistema y las alteraciones meteorológicas derivadas del fenómeno “El Niño”, que provocan un descenso considerable en la salinidad del lago afectando a la producción de quistes de *Artemia*, así como diversos impactos antropogénicos (construcciones de diques y carreteras), han originado una preocupante situación de escasez del recurso, que tiene sus orígenes en 1997.

En estos momentos no todos los quistes de *Artemia* existentes en el mercado proceden de GSL. Se están obteniendo de otras localidades en Rusia y China, principalmente, sin que esto resuelva los problemas de escasez y calidad mencionados. El reflejo inmediato de esta situación se manifiesta en el incremento desmesurado de los precios, la baja calidad del material, la ausencia de información sobre su origen, las precarias condiciones de procesado y envasado, y la existencia de dudas razonables sobre el cumplimiento de unos estándares de composición lipídica (ácidos grasos poliinsaturados esenciales) exigibles para una adecuada nutrición de larvas de especies marinas.

Por todo ello, se ha planteado la necesidad de prospectar adecuadamente biotopos salinos en busca de poblaciones de *Artemia* que permitan su aprovechamiento sostenible como quistes o como biomasa, tras una adecuada labor de caracterización que asegure su idoneidad para las prácticas de acuicultura (Lavens y Sorgeloos, 2000).

En este sentido Argentina se presenta como un país con interesantes perspectivas, caracterizado por una amplia diversidad de lagos salinos, lagunas y salinas de diversa naturaleza, costeros y continentales, de gran extensión y susceptibles de presentar poblaciones de *Artemia*.

Las primeras referencias de poblaciones de *Artemia* halladas en Argentina proceden de Birabén (1954), Guiñazu (1960), Piccinelli y Prosdocimi (1968) y Bucher (1992). Posteriormente, Amat y cols. (1994) y Cohen y cols. (1999) prospectaron las provincias de Buenos Aires (Salinas Chicas) y La Pampa (Salinas Grandes de Hidalgo, Colorada Chica, Callaqueo) y constataron la presencia de la especie *A. persimilis* en las cuatro poblaciones estudiadas. Hasta la última década del siglo pasado se creía en la presencia exclusiva de *A. persimilis* en Argentina y Chile (Gajardo y cols., 1999). Sin embargo, después de los estudios citogenéticos llevados a cabo por Papeschi y cols. (2000), se evidenció por vez primera la existencia de *A. franciscana* en dos

poblaciones argentinas pertenecientes a la provincia de Córdoba (Mar Chiquita y Las Tunas). Más tarde Lipko y cols., 2004 confirmaron la presencia de *A. franciscana* en el país mediante análisis citogenéticos, mientras que Amat y cols. (2004) verificaron la presencia de esta especie en las lagunas de Mar Chiquita, Las Tunas y Salinas Grandes (provincia de Córdoba) a través de análisis morfométricos.

4.1.2. Variabilidad en la composición de ácidos grasos de quistes de *Artemia*

Tal y como se ha comentado en el Capítulo 1, el factor determinante del valor nutritivo de los nauplios de *Artemia* como alimento larvario de peces y crustáceos marinos es la presencia de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (PUFAs). *Artemia* presenta una composición de ácidos grasos muy variable. Los nauplios carecen o muestran cantidades traza de ácido docosahexaenoico (22:6n-3, DHA) (Léger y cols., 1986; Navarro, 1990; Navarro y cols., 1991) y presentan contenidos variables de ácido eicosapentaenoico (20:5n-3, EPA). Watanabe y cols. (1978a), en su clasificación de *Artemia* tipo marino/tipo dulceacuícola, establecen que la ausencia o bajo contenido de EPA suele ir asociada a la presencia de altos niveles de ácido linolénico (18:3n-3, LNA). El carácter marino o dulceacuícola de una determinada población puede relacionarse, respectivamente con el carácter litoral o continental del biotopo del que procede (Navarro y cols., 1992), pero no de un modo estricto. Lo que parece claro es que las cepas propias de ecosistemas costeros suelen tener elevados porcentajes de EPA, y que las propias de ecosistemas continentales o de interior presentan elevados contenidos de LNA (Vos y cols., 1984). Sin embargo, ello no impide que haya cepas de ecosistemas de interior que produzcan quistes con niveles de LNA propios de muestras del tipo dulceacuícola y cantidades de EPA propias de muestras del tipo marino (Navarro y cols., 1991; Navarro y Amat, 1992).

La naturaleza hipersalina de los lagos, lagunas y sistemas hídricos cerrados puede ser muy diversa, siendo sus aguas de diferente origen y de composición química muy dispar. Cole y Brown (1967) describen algunos sistemas lagunares cuyas salmueras pueden clasificarse en tres tipos diferentes: cloruradas, sulfatadas y carbonatadas. Las características ecológicas que definen cada laguna pueden condicionar la presencia de determinados grupos microalgales (Davis y Giordano, 1996; Wängberg y cols., 1999; Jiang and Gao, 2004) cuya composición en ácidos grasos varía en función del grupo taxonómico al que pertenecen (Volkman y cols., 1998). Sargent y cols. (1988) propusieron ciertos ácidos grasos como biomarcadores de

distintos grupos microalgales en los ecosistemas marinos naturales. En la literatura disponible se señala que el perfil de ácidos grasos de *Artemia* refleja el de la dieta consumida por la generación parental (Léger y cols., 1986; Watanabe, 1987; Navarro y Amat, 1992). Por lo tanto, mediante el uso de los ácidos grasos biomarcadores se pueden identificar las distintas fuentes de alimentación de *Artemia* que determinarán, en parte, su perfil de ácidos grasos. Este puede estar asociado a su vez, a la naturaleza química de las salmueras.

Hasta el momento todos los estudios llevados a cabo se centran en la presencia y/o ausencia de determinados ácidos grasos en la composición lipídica de *Artemia*. Sin embargo los factores subyacentes que condicionan un determinado perfil de ácidos grasos todavía son desconocidos.

A la vista de todo lo anterior, este capítulo tiene como objetivo aportar nueva información acerca de la existencia de biotopos hipersalinos en Argentina con presencia de poblaciones de *Artemia* y evaluar el perfil de ácidos grasos de quistes de dichas poblaciones para su posible uso en acuicultura. Esto permitirá ofrecer una visión, hasta el momento inexistente, acerca del valor nutritivo de las poblaciones argentinas de *Artemia*. Esta información se complementará con la adscripción de las muestras a los tipos marino/dulceacuícola y a la localización costera/interior. Dada la gran variabilidad de los ecosistemas estudiados, se llevará a cabo un estudio de correlación entre perfiles lipídicos, la composición química de las salmueras y la localización geográfica de las poblaciones de *Artemia* muestreadas.

4.2 MATERIAL Y MÉTODOS

4.2.1 Localización y características de los biotopos

Desde 1992 hasta 2003 se muestrearon un total de 12 poblaciones entre las provincias de Santiago del Estero, Córdoba, Santa Fe, Buenos Aires, La Pampa, Rio Negro, Chubut y Santa Cruz (Figura 4.1). Las provincias situadas más al noroeste no pudieron ser prospectadas por razones logísticas. Sin embargo las poblaciones analizadas son un reflejo amplio y representativo de las principales áreas de distribución de *Artemia* en Argentina.



Figura 4.1. Situación geográfica de las provincias de Argentina.

En la mayoría de los biotopos muestreados se encontraron poblaciones de *Artemia* en forma de biomasa viva o acumulaciones de quistes en las orillas. Las poblaciones que proporcionaron muestras de quistes se especifican en la Tabla 4.1. Las lagunas de Mar Chiquita y Las Tunas, aunque descritas anteriormente por Amat y cols. (2004), han sido incluidas también en el presente trabajo por su potencial productivo y como referencia para las nuevas muestras obtenidas en las últimas campañas.

Los biotopos hipersalinos argentinos son extremadamente diversos, la mayoría de ellos son lagunas o lagos de distribución continental, alejados del mar, y un número menor pertenece a ecosistemas litorales (El Inglés, Caleta Olivia y San Julián). Estos ecosistemas son de extensión muy diversa variando entre las pocas hectáreas (Ha) de algunas pequeñas salinas o salitrales como Salitral de la Vidriera, Caleta Olivia y San Julián y algunos miles de Ha como Palos Blancos, El Inglés, Piedras, Algarrobo, o llegando hasta extensiones comparables a pequeños mares de interior como en el

caso de la laguna Mar Chiquita cuya superficie variable comprende entre las 200.000 y 500.000 Ha (Reati y cols., 1997; Amat y cols., 2004). En términos generales la mayoría de ecosistemas cubren superficies de aguas muy someras y temporales, mientras que otros son salitrales encerrados en depresiones del terreno (“bajos”) que funcionan según un régimen hídrico dominado por la secuencias de evaporación-precipitación.

4.2.2. Recolección de muestras y análisis de ácidos grasos

La recolección y procesado de los quistes se efectuaron *in situ* en la propia salina, según se detalla en el Apartado 3.1.1. El análisis de ácidos grasos se realizó a partir de los extractos lipídicos según la metodología descrita en el Apartado 3.5.

4.2.3. Análisis iónico de las salmueras

Cuando fue posible, se recogieron muestras de 0,5 a 2 l de salmuera, previamente filtrada por una malla de 50 μm de luz y se transportaron al laboratorio para su análisis iónico. Los carbonatos y bicarbonatos se determinaron por titulación con ácido sulfúrico 0,05 N usando como indicadores la fenolftaleína y heliantina. Esta técnica consiste en emplear un ácido de concentración conocida para valorar una base de concentración desconocida o viceversa. Para determinar el punto final (o de equivalencia) de la reacción se utilizan indicadores colorimétricos o potenciómetros.

Los cloruros y sulfatos se determinaron por titulación con nitrato de plata (AgNO_3) y cloruro de bario (BaCl_2), respectivamente. Para el análisis de sulfatos se empleó sodio rodizonato ($\text{C}_6\text{Na}_2\text{O}_6$) como indicador en medio agua-acetona. Esta técnica se fundamenta en la detección química colorimétrica basada en la identificación de cristales de bario y plomo. Los iones calcio y magnesio se analizaron mediante espectrofotometría de absorción atómica con nitrato de lantano en medio ácido clorhídrico (HCl), y los de sodio y potasio, en las mismas condiciones que los anteriores, mediante espectrofotometría de emisión atómica. Las determinaciones se llevaron a cabo en duplicado y el error relativo siempre fue menor del 1% en todas ellas.

El total de sólidos disueltos (TDS) se calculó como la suma de todas las concentraciones iónicas.

Estos análisis se realizaron en el Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de Buenos Aires.

Tabla 4.1. Localización y características de las poblaciones argentinas de *Artemia* que proporcionaron muestras de quistes naturales.

Provincia	Localidad	Abreviaturas	Especie	Extensión (Ha)	Localización	Coordenadas
Santiago del Estero	El Saladillo	EST	<i>A. franciscana</i>	6100	Interior	28° 20' S; 62° 70' O
Córdoba	Mar Chiquita	CHI	<i>A. franciscana</i>	500000	Interior	30° 20' S; 62° 10' O
Córdoba	Las Tunas	TUN	<i>A. franciscana</i>	1700	Interior	33° 45' S; 62° 32' O
La Pampa	Colorada Chica	CCH	<i>A. persimilis</i>	1100	Interior	38° 23' S; 63° 36' O
La Pampa	S.G. de Hidalgo	HID	<i>A. persimilis</i>	3900	Interior	37° 13' S; 63° 26' O
La Pampa	Colorada Grande	CGR	<i>A. persimilis</i>	6740	Interior	38° 18' S; 63° 42' O
La Pampa	Callaqueo	CAL	<i>A. persimilis</i>	2140	Interior	38° 34' S; 63° 32' O
La Pampa	Salitral Negro 2S	SN2	<i>A. persimilis</i>	2400	Interior	38° 44' S; 63° 13' O
La Pampa	Salitral Negro 3S	SN3	<i>A. persimilis</i>	2400	Interior	38° 45' S; 63° 27' O
Buenos Aires	Piedras	PIE	<i>A. persimilis</i>	2200	Interior	40° 41' S; 62° 40' O
Buenos Aires	Algarrobo	ALG	<i>A. persimilis</i>	200	Interior	40° 36' S; 62° 56' O
Buenos Aires	El Inglés	ING	<i>A. persimilis</i>	200	Costera	40° 43' S; 62° 28' O
Buenos Aires	Palos Blancos	PBL	<i>A. persimilis</i>	300	Interior	39° 28' S; 62° 45' O
Buenos Aires	Salinas Chicas	SCH	<i>A. persimilis</i>	3460	Interior	38° 43' S; 62° 56' O
Buenos Aires	Salitral de la Vidriera	VID	<i>A. persimilis</i>	5000	Interior	38° 42' S; 62° 40' O
Río Negro	Gualicho	GUA	<i>A. persimilis</i>	32800	Interior	40° 24' S; 65° 13' O
Santa Cruz	Caleta Olivia	COL	<i>A. persimilis</i>	30	Costera	46° 27' S; 67° 32' O
Santa Cruz	San Julián	SJU	<i>A. persimilis</i>	42	Costera	49° 17' S; 67° 46' O
Santa Cruz	Ruta3 Km 2035	RU3	<i>A. persimilis</i>	12	Interior	47° 28' S; 67° 16' O

Ha : hectáreas; S.G.: Salinas Grandes.

4.2.4. Tratamiento estadístico de los datos

Los datos de porcentajes de ácidos grasos se analizaron mediante el análisis multivariante de componentes principales (PCA) descrito en la metodología general. Las variables del estudio fueron los porcentajes de los siguientes ácidos grasos: palmítico (16:0), esteárico (18:0), palmitoleico (16:1n-7), *cis*-7-hexadecenoico (16:1n-9), *cis*-vaccénico (18:1n-7), oleico (18:1n-9), linoleico (18:2n-6), linolénico (18:3n-3, LNA), eicosapentaenoico (20:5n-3, EPA), así como la relación 16:0/16:1.

La composición iónica de las muestras se representó en un diagrama Piper (Piper, 1944) que permite reflejar claramente muchos análisis en un mismo gráfico. Las aguas químicamente semejantes se encuentran agrupadas y pueden clasificarse por su ubicación en el diagrama, con el beneficio adicional de poder identificar posibles mezclas hidroquímicas en una misma muestra. Para construir el diagrama se utiliza un triángulo donde se representan las proporciones de los cationes (Ca^{2+} , Mg^{2+} , $\text{Na}^+ + \text{K}^+$) y otro de los aniones (Cl^- , SO_4^{2-} , $\text{CO}_3\text{H}^- + \text{CO}_3^{2-}$). La proporción de cada catión se incrementa en el sentido de las agujas del reloj y los aniones en el sentido antihorario. En un diagrama romboidal integrador se representan la suma de los cationes ($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ y $\text{Na}^+ + \text{K}^+$) en un par de lados paralelos y complementarios, mientras que en el otro par de lados se representan la suma de aniones ($\text{HCO}_3^- + \text{CO}_3^{2-}$) y sus complementarios ($\text{Cl}^- + \text{SO}_4^{2-}$). La clasificación por su ubicación en el diagrama responde a los siguientes tipos de aguas:

- a) aguas sulfatadas y/o cloruradas, cálcicas y/o magnésicas
- b) aguas bicarbonatadas cálcicas y/o magnésicas
- c) aguas cloruradas y/o sulfatadas sódicas
- d) aguas bicarbonatadas sódicas.

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Distribución geográfica de las poblaciones argentinas de *Artemia*

De acuerdo con los estudios morfométricos, citogenéticos y moleculares llevados a cabo, la población de El Saladillo (EST), y las poblaciones de Mar Chiquita (CHI) y Las Tunas (TUN), se identifican con la especie *A. franciscana*. El resto de poblaciones pertenecen a *A. persimilis* (Tabla 4.1).

Las dos especies de *Artemia* encontradas en Argentina se distribuyen tal y como se muestra en la Figura 4.2. Se pueden

diferenciar dos grandes grupos. El primero de ellos está localizado al Norte de la latitud 36°S, representado por la especie *A. franciscana* y el segundo grupo, situado al Sur de la latitud 37°S, se caracteriza por la exclusiva presencia de *A. persimilis*. La mayoría de las poblaciones presentan una localización continental, en salinas interiores y/o lagunas endorreicas. Sin embargo, tres poblaciones pertenecientes a la especie *A. persimilis* están localizadas en biotopos costeros que tienen o tuvieron algún tipo de conexión con el mar (Tabla 4.1).

4.3.2. Composición en ácidos grasos de las poblaciones argentinas de *Artemia*

Los perfiles de ácidos grasos de los quistes de *Artemia* se muestran en la Tabla 4.2. Entre las poblaciones de *A. franciscana* los quistes de Mar Chiquita (CHI) y Las Tunas (TUN) pueden adscribirse al tipo marino (con alto contenido en EPA, bajo LNA y la relación $16:0/16:1 \leq 1$; Navarro y cols., 1992), mientras que la población de Santiago del Estero (El Saladillo) presenta un perfil tipo dulceacuícola (alto contenido en LNA y bajo en EPA). El grupo de poblaciones perteneciente a *A. persimilis* muestra perfiles de tipo marino (Salitral de la Vidriera, Palos Blancos, Algarrobo, Ruta 3 y San Julián) y de tipo dulceacuícola (Hidalgo, Colorada Grande, Callaqueo, Salitral Negro2S-3S, Salinas Chicas, Colorada Chica, Piedras, El Inglés, Gualicho y Caleta Olivia) presentando, en este caso, cocientes $16:0/16:1 \approx 2$ o mayores de 2 como en el caso de Gualicho. El ácido palmítico (16:0) está presente en todas las muestras en proporciones relativamente constantes (rango entre 11,8-19,7 %), excepto en la población de Gualicho donde alcanza un valor de 28,9%. Las poblaciones que presentan un perfil de tipo marino muestran niveles de ácido palmitoleico (16:1n-7) mayores que aquellas con un perfil de tipo dulceacuícola. El ácido araquidónico (20:4n-6, ARA) está presente en todas las muestras de quistes con perfil de tipo marino, mientras que en las poblaciones de tipo dulceacuícola no se halla presente o muestra sólo pequeñas proporciones, salvo en la población de Caleta Olivia cuyo valor es más elevado.

El contenido en HUFAs n-3 es mayor en los quistes con perfil de tipo marino que en los de tipo dulceacuícola, de nuevo con la excepción de Caleta Olivia que presenta valores más parecidos a las poblaciones con perfil de tipo marino (Tabla 4.2). Como es de esperar, el DHA no se halla presente o lo está en cantidades traza en algunas muestras. Sólo la población de Ruta 3 muestra un porcentaje considerablemente alto (1,5%) para este ácido graso.



Figura 4.2. Localización de las poblaciones de *Artemia* muestreadas.

Tabla 4.2. Composición en ácidos grasos (porcentaje del total de ácidos grasos) de quistes de poblaciones argentinas de *Artemia*. Los valores son la media de tres replicados (n=3). En todos los casos la variabilidad fue menos del 10 %.

Ácido Graso	Poblaciones																	
	Tipo dulceacuicola									Tipo marino								
	EST	HID	CGR	CCH	CAL	SN2	SN3	PIE	ING	SCH	GUA	COL	^b TUN	^b CHI	VID	ALG	PBL	RU3
14:0	nd	0,7	0,6	0,7	0,7	0,5	1,0	0,7	0,5	2,6	0,7	1,1	1,3	1,7	1,6	0,7	4,5	1,9
14:1	nd	1,8	nd	2,1	nd	nd	1,4	1,9	1,4	1,3	nd	1,2	0,6	1,4	1,2	0,6	1,0	nd
15:0	0,6	0,3	0,2	0,3	0,2	0,1	0,3	0,4	0,4	0,2	0,4	0,3	0,9	0,5	0,8	0,5	0,9	1,1
15:1	1,0	1,7	0,7	1,4	0,5	0,7	0,5	nd	nd	1,3	nd	0,7	0,3	nd	nd	nd	nd	0,2
16:0	15,7	14,6	13,8	12,4	13,3	13,7	11,8	17,1	14,0	12,8	28,9	13,4	12,7	15,6	17,8	14,7	15,2	19,7
16:1n-9	0,9	0,5	0,4	0,1	0,4	0,5	0,5	0,4	0,3	0,1	0,1	1,2	nd	0,6	1,1	nd	2,5	0,4
16:1n-7	6,0	5,7	4,9	7,4	5,1	4,9	5,4	6,3	7,1	4,3	7,2	6,0	10,8	10,1	15,8	20,8	26,4	13,4
16:2	nd	0,2	0,4	0,4	0,2	0,5	0,3	nd	0,2	0,1	0,4	0,3	0,6	0,3	0,7	0,6	0,5	1,1
17:0	1,9	0,4	0,8	0,1	0,8	1,0	0,8	0,5	0,6	0,1	0,6	0,7	nd	nd	1,0	0,8	0,6	1,2
16:3	1,7	1,4	1,7	1,1	1,6	1,4	1,2	2,2	1,2	1,0	2,8	0,9	4,1	1,5	1,5	0,9	0,9	1,3
18:0	4,1	4,7	4,1	4,4	4,0	4,1	3,7	4,5	4,4	3,9	5,7	4,1	3,7	3,7	4,8	4,7	4,1	5,0
18:1n-9	17,5	14,2	15,4	13,5	14,9	15,2	14,3	14,0	13,7	12,8	16,3	18,3	16,2	18,9	13,5	12,7	11,4	15,0
18:1n-7	8,1	7,8	6,6	10,9	7,1	6,2	7,3	7,8	8,6	6,4	5,2	9,3	9,4	7,1	12,5	12,3	12,5	9,3
18:2n-6	10,5	3,8	5,5	5,3	5,7	5,7	5,3	4,2	4,0	4,3	3,6	4,0	3,3	4,1	1,8	1,8	1,7	2,3
18:3n-6	nd	nd	nd	nd	nd	0,1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,3	0,1	0,3	0,2	0,2	0,2
18:3n-3 (LNA)	15,5	23,6	24,6	21,7	24,4	24,0	25,2	26,9	24,0	30,2	12,5	17,0	8,8	14,9	2,1	1,8	6,5	1,4
18:4n-3	2,1	5,4	5,6	4,6	5,6	5,6	5,7	5,1	5,9	7,0	2,3	4,8	0,8	3,3	1,1	1,0	1,9	1,5
20:0	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,3	nd	nd	nd	0,3	0,2
20:1n-9	0,3	0,3	0,3	0,1	0,3	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,8	0,3	0,3	0,3	0,4	0,3	0,3	0,9
20:1n-7	0,3	nd	nd	nd	nd	0,1	nd	nd	nd	0,2	nd	nd	0,1	nd	0,1	nd	0,1	nd
20:2n-6	nd	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	nd	0,1	0,2	0,1	nd	0,1	0,2	nd	nd	nd	nd
20:3n-6	nd	0,2	nd	0,1	nd	nd	nd	nd	0,2	0,2	0,1	tr	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,3
20:3n-3	nd	0,5	0,6	0,2	0,5	0,7	0,5	0,2	0,3	0,6	0,2	0,3	nd	0,2	nd	nd	0,2	nd
20:4n-6 (ARA)	0,5	0,1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,2	0,1	0,1	0,8	1,8	1,1	1,6	0,6	1,8	1,3

(Continúa en la página siguiente)

(Continuación Tabla 4.2)

Ácido Graso	Poblaciones																	
	Tipo dulceacuicola					Tipo marino					Tipo							
EST	HID	CGR	CCH	CAL	SN2	SN3	PIE	ING	SCH	GUA	COL	TUN	CHI	VID	ALG	PBL	RU3	SJU
(l)	(l)	(l)	(l)	(l)	(l)	(l)	(l)	(C)	(l)	(l)	(C)	(l)	(l)	(l)	(l)	(l)	(l)	(C)
20:4n-3	0,6	0,7	0,8	0,6	0,8	0,8	0,4	0,6	0,8	0,3	0,8	0,2	0,7	0,4	0,3	0,4	0,3	0,4
20:5n-3 (EPA)	3,6	0,2	0,1	0,1	0,5	0,1	0,2	1,4	0,3	1,1	10,1	11,6	8,7	14,4	16,0	11,0	9,7	14,2
22:0	0,4	nd	0,1	0,2	0,3	0,1	0,3	0,2	nd	0,4	0,2	0,2	nd	nd	nd	nd	nd	0,3
22:5n-3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,1	nd	0,3	nd	nd	nd	0,3	nd	nd	0,6	nd
22:6n-3 (DHA)	nd	nd	nd	nd	0,2	nd	nd	nd	nd	tr	tr	nd	tr	nd	nd	tr	1,5	tr
24:1n-9	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
total	91,3	89,3	87,5	88,1	87,2	86,3	85,2	92,8	89,	93,1	93,7	90,1	94,4	93,8	94,1	96,5	95,4	92,4
Saturados	22,7	20,7	19,5	18,0	19,3	19,6	17,4	23,5	20,3	17,5	38,4	18,4	21,2	26,0	22,3	21,0	31,4	25,2
Monoinsaturados	34,1	32,3	28,4	36,0	28,3	27,7	28,3	30,0	31,9	26,8	31,1	39,4	37,8	44,0	47,3	51,7	42,8	40,3
Poliinsaturados	34,5	36,3	39,6	34,2	39,6	39,0	39,6	39,3	38,0	44,7	23,6	32,0	35,1	23,8	24,5	23,9	21,2	26,9
Total n-3	21,3	30,4	31,8	27,2	31,9	31,2	32,2	32,8	32,2	38,9	16,7	21,4	27,7	18,2	19,2	19,9	14,5	19,0
Total n-6	11,0	4,3	5,7	5,6	5,9	5,8	5,5	4,3	4,6	4,7	3,8	5,6	5,5	3,5	3,9	2,7	4,3	5,7
HUFA n-3	4,2	1,5	1,6	0,8	2,0	1,6	1,6	0,8	2,3	1,7	2,0	11,2	11,9	9,5	15,0	16,4	12,0	14,8
HUFA n-6	0,5	0,3	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,0	0,4	0,2	0,1	0,8	2,0	1,3	1,4	1,8	0,8	2,0
16:0/16:1	2,3	2,4	2,0	1,7	2,4	2,6	2,0	2,7	1,9	2,9	4,0	1,9	1,1	1,4	1,1	0,7	0,6	1,2

^aClasificación descrita por Watanabe y cols. (1978 a, b; 1980)

^bPoblaciones descritas por Amat y cols. (2004)

tr: cantidades traza; nd: no detectado (<0,05%)

HUFA n-3: PUFA n-3 de 20 o más carbonos; HUFA n-6: PUFA n-6 de 20 o más carbonos

Para llevar a cabo el estudio comparativo de las poblaciones en función de su composición en ácidos grasos se redujo el número de variables, tratando de este modo de hallar componentes que explicaran la mayor parte de la varianza total de los datos. El análisis previo al PCA de los datos incluidos en la Tabla 4.2 mostró un valor de KMO de 0,65, excediendo el valor recomendado de 0,6. La prueba de Bartlett resultó estadísticamente significativa ($P=0,000$), asumiendo la factibilidad de la matriz de correlaciones para el PCA. Éste reveló tres componentes con autovalores que excedían la unidad, y que explicaban respectivamente el 49, 22 y 15% de la varianza total. Siguiendo el criterio de extracción de factores según el *screeplot* de Cattell (1966), se decidió retener los dos primeros componentes, explicativos del 71% de la varianza total, para llevar a cabo los análisis posteriores.

La Tabla 4.3 muestra los coeficientes de los ácidos grasos en el primer y segundo componente, así como las comunalidades. Los ácidos grasos 16:0, 16:1n-7, 18:0, 18:1n-7, 18:3n-3, 20:5n-3 y 16:0/16:1 presentan los valores de comunalidad más elevados, lo que significa que explican la mayor parte de la varianza, y por lo tanto son los que mayor información aportan al analizar el gráfico de puntuaciones.

Tabla 4.3. Coeficientes de correlación de cada una de las variables originales con las componentes principales (PC1, PC2) y comunalidades.

<i>Ácido graso</i>	PC1	PC2	Comunalidad
16:0	-0,01	0,95	0,91
16:1n-9	0,12	-0,17	0,04
16:1n-7	-0,95	0,05	0,90
18:0	-0,16	0,92	0,87
18:1n-9	0,40	-0,01	0,16
18:1n-7	-0,91	-0,20	0,87
18:2n-6	0,81	-0,26	0,73
18:3n-3	0,88	-0,25	0,84
20:5n-3	-0,91	-0,08	0,83
16:0/16:1	0,85	0,48	0,95
Varianza explicada (%)	49,05	21,95	-

En la Figura 4.3 se representa el gráfico de puntuaciones donde se observa que los ácidos grasos 16:1n-7, 18:1n-7, 18:2n-6, 18:3n-3, 20:5n-3 y el cociente 16:0/16:1 muestran elevada correlación con el componente 1 (eje horizontal) mientras que el 16:0 y 18:0

muestran elevada correlación con el componente 2 (eje vertical). Las puntuaciones con signo positivo en el PC1 están representadas por: 16:1n-9, 18:1n-9, 18:2n-6, 18:3n-3 y 16:0/16:1, mientras que las variables 16:0, 16:1n-7, 18:0, 18:1n-7 y 20:5n-3 presentan valores negativos.

Las puntuaciones de las observaciones respecto a los dos factores se representan gráficamente en la Figura 4.4. En este gráfico se puede observar la agrupación de las poblaciones de acuerdo a las puntuaciones que han tomado las variables en los nuevos PC. Las poblaciones con perfil dulceacuícola están localizadas en la mitad derecha del eje que representa el PC1, y las de tipo marino se agrupan en el lado izquierdo de dicho eje. Entre ambas agrupaciones se identifica un nuevo grupo considerado como “tipo intermedio” entre el perfil marino y dulceacuícola. La población de Gualicho muestra el valor más alto en el PC2, con una desviación estándar de la media de 3,4. Dicha población puede considerarse como un caso atípico (*outlier*) debido a un valor considerablemente alto en la relación 16:0/16:1. Las poblaciones aparecen agrupadas esencialmente

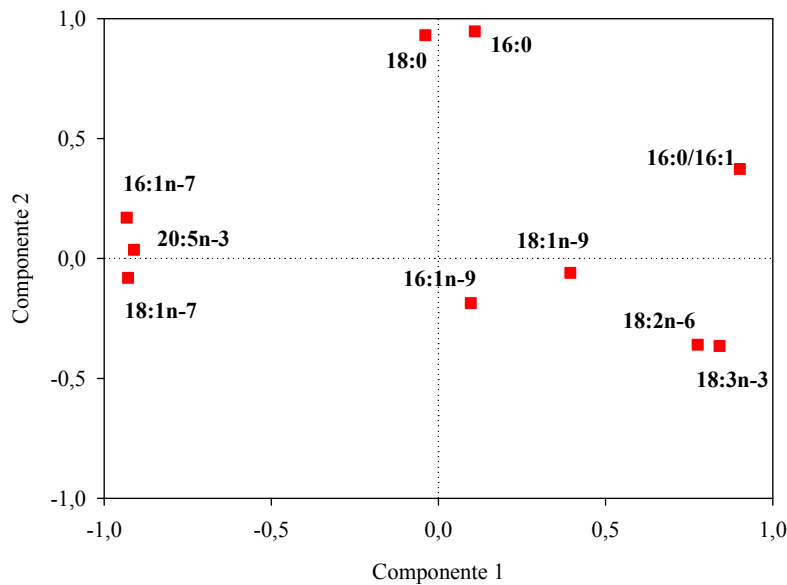


Figura 4.3. Gráfico de los coeficientes de las variables en los nuevos componentes principales.

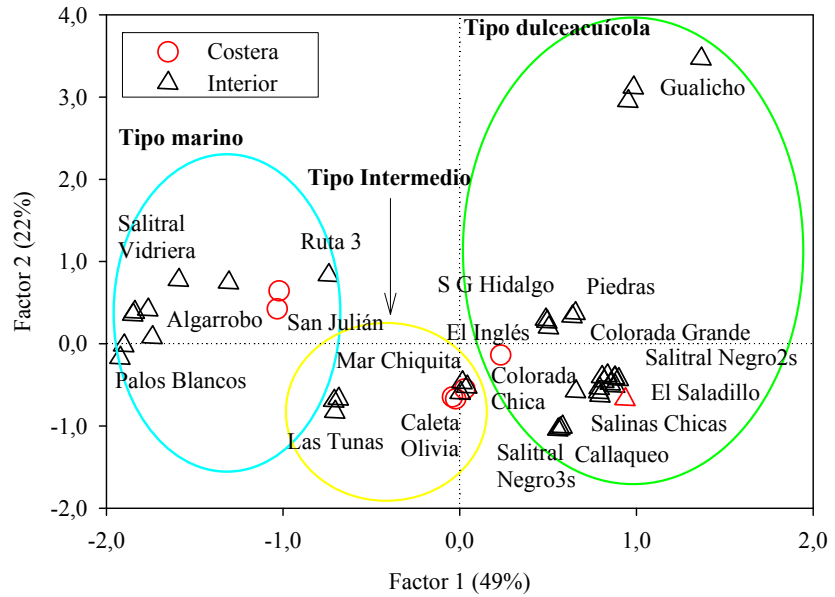


Figura 4.4. Gráfico de puntuaciones de los objetos en los nuevos componentes principales.

de acuerdo a su perfil de ácidos grasos y no presentan ninguna asociación en relación a su localización interior/costera. En los tres grandes grupos en que se pueden separar hay poblaciones costeras y de interior.

4.3.3. Análisis de la composición iónica de las salmueras

En la Tabla 4.4 se presentan las concentraciones de los principales iones hallados en las salmueras, expresados como concentraciones (ppm) y porcentajes del total de cationes y aniones. De entre todos los cationes el Na^+ es generalmente dominante. Entre los demás, el patrón frecuentemente hallado es $\text{Mg}^{2+} \geq \text{K}^+ \geq \text{Ca}^{2+}$ o $\text{Ca}^{2+} \geq \text{Mg}^{2+} \geq \text{K}^+$. El anión dominante en todas las salmueras es el Cl^- , excepto en las de El Saladillo donde el HCO_3^- presenta el mayor porcentaje.

Las concentraciones de cationes y aniones de las salmueras de los distintos biotopos hipersalinos, proyectadas en los diagramas triangulares (Figura 4.5), representan aguas dominadas por los iones Na^+ y Cl^- , por lo que la mayoría se clasifican como salmueras sodio-cloruradas típicas de lagunas profundas de origen marino o tálasico. Sólo un biotopo (El Saladillo) presenta un predominio de iones Ca^{2+} y HCO_3^- , propios de sistemas atalásicos poco profundos condicionados por la evaporación de las aguas encerradas en las cuencas endorreicas.

Tabla 4.4. Parámetros físico-químicos y composición iónica de las salmueras de algunos de los biotopos hipersalinos argentinos muestreados. Los datos se expresan como ppm (mg l^{-1}) y como porcentaje (%) del total de cationes y aniones.

	^a Mar chiquita (Chaco- Pampa)	^a Tunas (Chaco- Pampa)	^b El Saladillo (Chaco- Pampa)	^b Hidalgo (Chaco- Pampa)	Salina Piedras (Patagonia)	Salina Chica (Chaco- Pampa)	Sal. Vidriera (Chaco- Pampa)	Palos Blancos (Chaco- Pampa)	Caleta Olivia (Patagonia)	Ruta3 (Patagonia)	San Julian (Patagonia)
T (°C)	30	34	-	-	18	19,9	24	26	9	7,50	6
S (g L^{-1})	48	40	185	300	345	-	280	270	230	12	80
pH	8,1	9	7,72	-	7	7,77	7,1	6,7	7,68	8,80	8,40
Ca ²⁺	21100	20000	524	11900	969	857	826	9890	684	68	1522
Mg ²⁺	8000	172000	3,1	33000	15120	2112	9168	6864	3826	10	1320
Na ⁺	317900	299400	77,4	361000	97431	111600	105613	102789	84728	1904	25585
K ⁺	29600	22300	1,5	3800	3591	4156	2693	765	1004	40	206
Σ cationes (ppm)	376600	513700	606	409700	117111	118725	118300	120308	90242	2022	28633
% Ca ²⁺	5,60	3,89	86,47	2,90	0,83	0,62	0,70	8,22	0,76	3,36	5,32
% Mg ²⁺	2,12	33,48	0,51	8,05	12,91	7,94	7,75	5,71	4,24	0,49	4,61
% Na ⁺	84,41	58,28	12,77	88,11	83,20	86,05	89,28	85,44	93,89	94,16	89,35
% K ⁺	7,86	4,34	0,25	0,93	3,07	5,40	2,28	0,64	1,11	1,98	0,72
CO ³ H	700	3400	444	100	461	193,4	461	179	824	95	293
SO ₄ ²⁻	171000	246000	56,6	62200	1	23040	19200	960	24960	768	13440
Cl ⁻	444300	386400	87,2	556900	190000	173597	174000	193000	123380	2587	35820
Σ aniones (ppm)	616000	635800	587,8	619200	190462	185290,4	193661	194139	149164	3450	49553
% CO ³ H	0,11	0,53	75,54	0,02	0,24	0,10	0,24	0,09	0,55	2,75	0,59
% SO ₄ ²⁻	27,76	38,69	9,63	10,05	0,00	10,90	9,91	0,49	16,73	22,26	27,12
% Cl ⁻	72,13	60,77	14,83	89,94	99,76	88,96	89,85	99,41	82,71	74,99	72,29

^aDatos obtenidos de Amat y cols. (2004).

^bDatos obtenidos de Angelelli y cols. (1976).

(1) Lagunas pertenecientes a la región argentina de la Llanura Chaco-Pampeana, según Quirós y Dragó (1999).

(2) Lagunas pertenecientes a la región de la Meseta Patagónica (Quiros y Dragó, 1999).

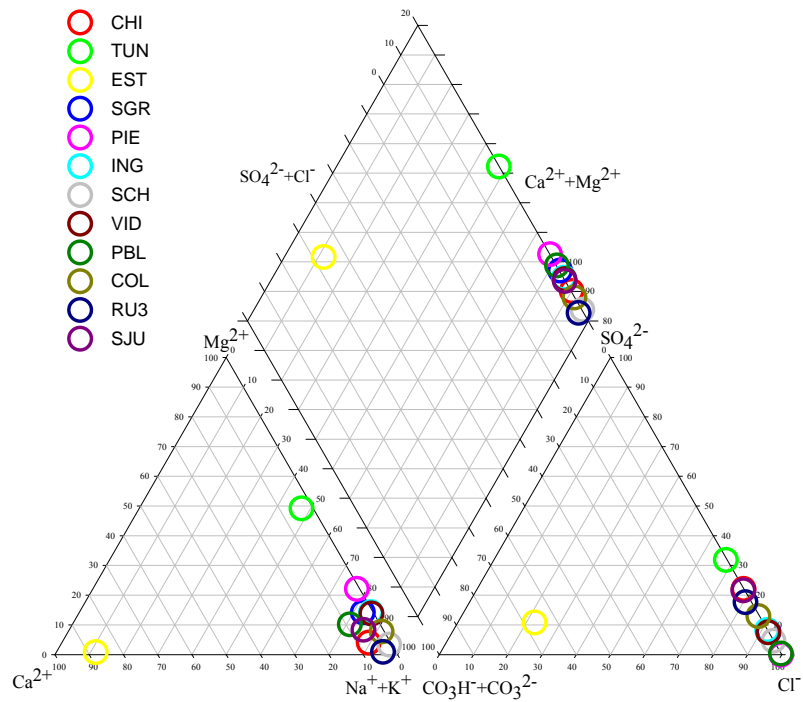


Figura 4.5. Diagrama Piper de los diferentes iones (% del total de aniones y cationes) presentes en las salmueras de los biotopos hipersalinos muestreados: CHI = Mar Chiquita, TUN= Las Tunas, EST = El Saladillo, SGR = Salinas Grandes, Piedras = Salina Piedras, ING = El Inglés, SCH = Salinas Chicas, VID = Salitral Vidriera, PBL = Palos Blancos, COL = Caleta Olivia, RU3 = Ruta 3, SJU = San Julián.

4.4. DISCUSIÓN

Numerosos autores han puesto de manifiesto las variaciones del perfil de ácidos grasos en diversas especies y poblaciones de *Artemia* (Schauer y cols., 1980; Watanbe y cols., 1978b; Leger y cols., 1986; Watanabe, 1987, Navarro, 1990). Las muestras argentinas objeto de este estudio también presentan tal variación, mostrando perfiles tanto de tipo marino como de tipo dulceacuícola según la clasificación de Watanabe y cols. (1978a). Vos y cols. (1984), Léger y cols. (1986) y Lavens y cols. (1989) sugirieron que la variación en el contenido de HUFAs entre diversas muestras de quistes podría ser

debida a la diversidad en la composición de microalgas disponible en el medio como alimento para las poblaciones parentales de *Artemia*, de tal manera que, hasta cierto punto, el perfil de ácidos grasos de los quistes se podría considerar como un biomarcador de la composición microalgal consumida por las poblaciones adultas del crustáceo.

Sargent y cols. (1988) definieron los biomarcadores como componentes químicos de los organismos que se pueden analizar directamente del medio ambiente, y que pueden ser interpretados cuantitativa y cualitativamente en términos de cantidad de biomasa de aquellos organismos *in situ*. Algunas clases de algas tienen altos contenidos en determinados ácidos grasos, o grupos de ellos, y pueden resultar útiles como trazadores de estas clases algales. Así, en un determinado ecosistema, la diversidad y abundancia de las distintas especies fitoplanctónicas, que pueden variar dependiendo de las características ambientales del medio donde viven, tales como la salinidad, temperatura y fotoperiodo, influirían en el porcentaje de los ácidos grasos predominantes (Fraser y cols., 1989)

Los ácidos grasos pueden ser utilizados como biomarcadores no sólo en términos de cantidad de biomasa presente en el ecosistema, sino también a mayor escala, para caracterizar biotopos de interior y/o costeros tal y como describen Navarro y cols. (1992). En *Artemia* los tipos marino y dulceacuícola se asocian al origen geográfico de los ecosistemas de procedencia, al tipo de salmueras y a la mayor o menor diversidad específica en microalgas de dichos biotopos. Según estos argumentos los perfiles lipídicos de tipo marino corresponderían a poblaciones de *Artemia* procedentes de medios hipersalinos de origen marino o costero, mientras que los de tipo dulceacuícola, estarían asociados a poblaciones de *Artemia* procedentes de medios hipersalinos interiores o continentales. Navarro y cols. (1992) señalan el LNA como un indicador fenotípico de los quistes de *Artemia* procedentes de biotopos continentales o de interior, y corroboran los resultados obtenidos por Léger y cols. (1986) en el estudio de la composición de ácidos grasos de dos poblaciones continentales de *A. franciscana*, originales de Canadá y del GSL. El carácter del LNA como bioindicador de las poblaciones propias de ecosistemas de interior es también evidente en los estudios realizados por Amat y cols. (2004). Así se desprende del análisis de ácidos grasos de dos de las poblaciones argentinas incluidas en el presente trabajo: Mar Chiquita y Las Tunas, que pertenecen a ecosistemas continentales y presentan elevados niveles de LNA.

Las muestras analizadas en este estudio evidencian la presencia de poblaciones típicas continentales o de interior

pertenecientes a la especie *A. persimilis* (Salitral de la Vidriera, Algarrobo y Ruta 3), que no presentan los altos niveles de LNA descritos por otros autores, o que presentan una proporción moderada como en el caso de la población Palos Blancos (6,5%), aunque sin llegar a los valores de 20% (Watanabe y cols., 1978a; Watanabe, 1987) característicos de cepas propias de biotopos de interior. En este caso, a pesar de que Palos Blancos es una laguna que no se considera costera por localizarse a una distancia considerable del océano (50-60 Km), se sabe que en el pasado tuvo algún tipo de conexión con el mar (Angelelli y cols., 1976). Actualmente las muestras de salmuera tomadas en esta salina reflejan una composición típica de ambientes talásicos, aunque la composición iónica podría encontrarse alterada por los aportes de agua de los sistemas de irrigación local del Río Colorado.

Por otro lado, se ha evidenciado la presencia de quistes procedentes de biotopos costeros con altos contenidos en LNA (Caleta Olivia y El Inglés) pudiéndose afirmar que, por vez primera, se han identificado quistes con perfil dulceacuícola en ecosistemas costeros de *Artemia*. Aunque la diferencia en el contenido de LNA entre las poblaciones consideradas de interior y costeras, es indicativa de su carácter marino o dulceacuícola, no es determinante para su adscripción a esta localización.

Watanabe (1987) señaló que el ARA estaba asociado al tipo marino de *Artemia*. En efecto, todas las poblaciones de tipo marino descritas en el presente estudio muestran valores más elevados de ARA que las de tipo dulceacuícola, a diferencia de los resultados obtenidos por Navarro y cols. (1992), de manera que este ácido graso está presente independientemente de la localización interior (tipo dulceacuícola) o costera (tipo marino) de las poblaciones.

En cuanto a la relación 16:0/16:1, Navarro y cols. (1993) constataron que los valores hallados en las poblaciones con perfil marino eran mayores que en los de las de perfil dulceacuícola. Este resultado se confirma en los encontrados en el presente trabajo, ya que la relación 16:0/16:1 presenta valores comprendidos entre 0,5 y 1 en las poblaciones catalogadas como tipo marino y valores iguales o cercanos a 2 en las poblaciones de tipo dulceacuícola (Tabla 4.2). Puede concluirse que la relación 16:0/16:1 es un biomarcador idóneo para adscribir las poblaciones de quistes a los dos tipos o categorías (marino vs dulceacuícola). Así, por ejemplo, los quistes procedentes de la laguna de Caleta Olivia, que muestran un elevado contenido en LNA (17%) y en EPA (10,1%), son clasificados como tipo intermedio, sin embargo, el porcentaje de 16:0/16:1 que muestra (1,9),

permitiría su adscripción al tipo dulceacuícola. Se puede decir que Caleta Olivia es una población cuyos quistes pertenecen al tipo dulceacuícola, aunque con altos contenidos en EPA.

Los diversos biotopos argentinos estudiados difieren según los condicionantes climáticos locales, altitud y composición iónica de sus salmueras. Quirós y Dragó (1999) hicieron un estudio hidroquímico y geomorfológico sobre Argentina y establecieron seis regiones con notables diferencias: 1) Puna, 2) Llanura Chaco- Pampeana, 3) Sierras Peri-Pampeanas, 4) Patagonia Andina 5) Meseta Patagónica y 6) Meseta Misiones. Estos autores determinaron que la descomposición de los minerales de la cuenca hidrográfica es la que controla principalmente la composición química de los cuerpos de agua continentales, mientras que los procesos de evaporación-precipitación regirían los cuerpos de agua costeros.

Los ecosistemas prospectados en este trabajo se encuadrarían en dos de las regiones citadas: Llanura Chaco-Pampeana y Meseta Patagónica (Tabla 4.4). El análisis comparativo entre la composición iónica de las salmueras analizadas y aquella presentada por Quirós y Dragó (1999) en el estudio de diferentes lagos argentinos representativos de las regiones citadas, permiten adscribir los biotopos de El Saladillo, Salinas Grandes de Córdoba, Mar Chiquita, Las Tunas, Salinas Grandes de Hidalgo, Colorada Grande, Colorada Chica, Callaqueo, Salinas Chicas, Salitral Negro, Salitral de la Vidriera y Palos Blancos a la región Chaco-Pampeana. La composición química típica de cuerpos endorreicos sería la más representativa de la región Patagónica, y es la que podría describir el resto de lagunas (El Inglés, Piedras, Algarrobo, Gualicho, Caleta Olivia, Ruta 3 y San Julián).

En general, la fracción aniónica presente en las salmueras de los diferentes biotopos está dominada por el Cl^- , mientras que la fracción catiónica muestra una clara dominancia del Na^+ . Estas salmueras serían pues consideradas como propias de cuerpos hipersalinos derivados de la evaporación de agua de mar, siendo denominadas soluciones talásicas o talasohalinas. Sólo la laguna de El Saladillo presenta una composición iónica diferente a las demás, con una mayor proporción en HCO_3^- y Ca^{2+} , por lo que se trataría de un ecosistema de naturaleza atalásica, caracterizado por presentar una proporción de iones diferente a la del agua de mar. Las aguas atalásicas serían típicas de áreas continentales formadas posiblemente por inundaciones de mares antiguos que han ido concentrando sales de diverso origen, en este caso posiblemente andino.

De todo lo comentado se puede resumir que las salmueras de los biotopos prospectados son sodio-cloruradas (excepto una que es calcio-bicarbonatada) independientemente de la región geomorfológica a la que pertenecen, y por lo tanto no es posible establecer una asociación entre un perfil particular de ácidos grasos de las poblaciones de *Artemia* (marino vs dulceacuícola) y una determinada composición iónica.

Es sabido que la biodiversidad disminuye a salinidades altas por la mera exclusión de los organismos menos tolerantes (Davis, 1990). De esta forma *Artemia* filtrará una diversidad de alimento microparticulado, en cuya composición, y de acuerdo a la salinidad creciente (Davis y Giordano, 1996), se encontrará un menor número de especies microalgales y bacterianas de diversa composición en PUFAs. Los elevados y variables niveles de salinidad favorecen la preponderancia de ciertas especies de algas verde-azules y de flageladas que, contrariamente a las diatomeas y flageladas propias de aguas de menor salinidad, presentan bajos niveles en HUFAs n-3 (Scott y Middleton, 1979). Las lagunas de Mar Chiquita y Las Tunas registran una salinidad considerablemente baja (alrededor de 40 g l⁻¹), hecho que podría explicar, desde la perspectiva de una influencia ambiental, la presencia de elevados niveles de HUFAs n-3 en los quistes pertenecientes a estas poblaciones.

Navarro y Amat (1992) señalaron una posible influencia genotípica en el perfil de ácidos grasos de *Artemia* dada la presencia y proporción de algunos ácidos grasos en sus quistes, independientemente de los niveles encontrados en el alimento consumido por las poblaciones adultas. El fenotipo es el resultado de la interacción de los genes con el medio ambiente. Sin embargo, en un estudio descriptivo como este, resulta difícil esclarecer la contribución de ambos componentes al fenotipo marino/dulceacuícola de una población. Esta cuestión es investigada en parte en los siguientes capítulos de este estudio, y los resultados indican un importante efecto ambiental de la dieta.

Todas estas consideraciones permiten hipotetizar que uno de los factores condicionantes del valor nutritivo de los quistes de *Artemia* tendría que ver con las variaciones en la composición fitoplanctónica en el medio, debidas, a su vez, a cambios en las condiciones ambientales como la temperatura, luz y nutrientes. La biosíntesis de lípidos en algas está fuertemente influida por el estado fisiológico del organismo y por las condiciones ambientales (Sargent y cols., 1988a). Pohl y Zurheide (1979) observaron, por ejemplo, que las algas cultivadas bajo condiciones de altas intensidades de luz

presentaban un incremento en las concentraciones de PUFAs n-3 en sus lípidos totales. Del mismo modo, temperaturas más bajas, tienden a incrementar los niveles de PUFAs n-3 en los lípidos totales de las células (Ackman y Tocher, 1968). En algunos estudios se han observado variaciones, tanto a nivel intra como interespecífico, en los ácidos grasos biomarcadores del fitoplancton presente en el medio (Chuecas y Riley, 1969; St. John y Lund, 1996).

Los estudios llevados a cabo por Jones y Flynn (2005) indican que el crecimiento de las poblaciones de copépodos alimentados con una dieta mixta (diatomeas y dinoflagelados) es mayor que el obtenido mediante la alimentación basada en una monodieta. Estos autores señalaron la importancia de la filtración selectiva de los copepodos, que les asegura una dieta mixta, y consecuentemente, un mayor rendimiento en su crecimiento. Además, constataron que la presencia de un *bloom* fitoplanctónico mono-específico no significa que este organismo sea la fuente principal de alimentación para los copépodos, dado que estos organismos son capaces de seleccionar a sus presas. Probablemente *Artemia* desarrolle también una filtración selectiva como respuesta a un ramoneo (*grazing*) preferencial bajo condiciones ambientales naturales de escasez de alimento. De hecho, se puede comprobar la actividad de ramoneo de *Artemia* cuando se alimenta de las acumulaciones algales depositadas en el fondo o paredes de los tanques de cultivo, donde proliferan las diatomeas ricas en HUFAs n-3 (EPA). Este hecho contribuiría a apoyar la hipótesis del efecto ambiental como explicación a los factores que condicionan la presencia de un determinado perfil de ácidos grasos en *Artemia*.

Elevados contenidos en HUFA, son característicos de los quistes de *A. tibetiana*, mostrando valores de EPA entre 16 y 21% (Van Stappen y cols., 2003). Van Stappen y cols. (2003) señalan que existe una relación entre los patrones de HUFA hallados en el fitoplancton y el incremento de la radiación ultravioleta (UV) propio de ecosistemas de gran altitud. Argumentan que los perfiles ricos en HUFA característicos de los quistes de *A. tibetiana* podrían reflejar el alimento consumido por las poblaciones adultas en este ecosistema. En los biotopos tibetanos (situados por encima de los 4,500 m sobre el nivel del mar) *Dunaliella salina* y *Chlamydomonas* sp. (*Chlorophyta*) son las especies algales dominantes (Zheng, 1997), y éstas han sido descritas como pobres en HUFAs cuando son cultivadas bajo condiciones ambientales similares a las naturales (Poerschmann y cols., 2004). Desde este punto de vista parece difícil intentar correlacionar el perfil de ácidos grasos encontrado en los quistes de *A. tibetiana* con la especie microalgal dominante en el medio. Desde otra perspectiva, se ha sugerido que ciertos PUFAs afectan a la fisiología

animal a través de su impacto en la fluidez de la membrana celular, de manera que actúan como un “anti-congelante” de membrana. La capacidad para ajustar la fluidez de la membrana lipídica es una característica ventajosa para aquellos organismos que permanecen activos a bajas temperaturas (Pruitt, 1990). Esto se ha observado en varias especies de invertebrados acuáticos, en cladóceros de agua dulce y en copépodos de agua dulce y marina (Farkas, 1979). Estos organismos estarían modificando la proporción entre ácidos grasos insaturados y saturados con objeto de mantener un estado de fluidez adecuado en la membrana, como adaptación a cambios de temperatura: a altas temperaturas, aumenta la proporción de ácidos grasos saturados, mientras que a bajas, aumenta la de los insaturados. Puede ser que esta sea la explicación para los altos niveles de HUFAs hallados en los quistes de poblaciones *A. tibetiana* que habitan estos biotopos de gran altitud y de temperaturas muy bajas (Van Stapen y cols, 2003). En la misma línea este argumento podría explicar el perfil de ácidos grasos encontrado en los quistes de la población de San Julián, ya que se trata de la población localizada a mayor latitud, y por tanto sometida a temperaturas más bajas, además de estar expuesta a una mayor intensidad de radiación UV debido a la disminución de la capa de ozono en las altas latitudes meridionales del cono Suramericano.

Debe señalarse que el metabolismo lipídico de *Artemia* es prácticamente desconocido y puede suponer una causa importante de variación en el perfil de ácidos grasos de las poblaciones. Así, se han sugerido características inusuales como la capacidad de bioconversión de ácido linoleico (18:2n-6, LA) (Schauer y Simpson, 1985; Ito y Simpson, 1996) a EPA (ver introducción general). La diferente actividad enzimática relacionada con la elongación y desaturación de las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos podría estar influida por factores externos. En este sentido, se ha demostrado que la dieta suministrada afecta a la capacidad enzimática para desaturar y elongar PUFAs hasta HUFAs en peces como el salmón atlántico (Zheng y cols., 2004).

Como resumen de lo que se ha discutido en el presente capítulo, el perfil de ácidos grasos de las poblaciones de *Artemia* vendría condicionado por una serie de factores, tales como: 1) la variabilidad en las condiciones externas del medio ambiente (temperatura, salinidad, composición iónica de las salmueras, intensidad de la radiación UV, composición microalgal, etc.) en los diferentes biotopos estudiados donde habita este organismo y que condicionan el tipo de alimento consumido; 2) la alimentación selectiva preferencial por un determinado sustrato de acuerdo a la

disponibilidad de alimento en el medio, 3) las características genéticas de cada población o especie y/o 4) una combinación de todos ellos.

La variabilidad hallada en la composición de ácidos grasos de *Artemia* hace necesaria una investigación más exhaustiva acerca de los factores que condicionan el perfil de ácidos grasos de una población y/o especie, cuestiones que son estudiadas con detalle a lo largo de la presente tesis.

CAPÍTULO 5

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE DIVERSAS POBLACIONES ARGENTINAS DE *Artemia*

5.1. INTRODUCCIÓN

5.1.1. La molécula de ADN mitocondrial

La estimación de la variación genética dentro y entre poblaciones y/o especies ha sido posible gracias al descubrimiento de diversas técnicas que permiten la investigación directa de genotipos individuales. Así, por ejemplo, el análisis de polimorfismos a nivel de ADN se considera una herramienta muy importante en los estudios de ecología evolutiva, genética y sistemática de poblaciones (Avise, 1994). En los últimos tiempos, el desarrollo de marcadores moleculares para el estudio de numerosos aspectos que tienen que ver con la identificación de especies y sus relaciones evolutivas, se ha visto facilitado mediante el estudio de una pequeña molécula de ADN contenida en las mitocondrias de las células de los animales.

El genoma mitocondrial consiste en una única molécula de ADN circular de doble hélice (ADNmt) cuyo tamaño varía en un determinado rango dependiendo del tipo de organismo (15-20Kb), con una media de 16Kb (Hartl and Clark, 1989). A nivel celular se localiza en las mitocondrias del citoplasma y, al igual que el ADN nuclear, posee propiedades autorreplicativas.

La configuración genética en el ADNmt es generalmente estable (tanto en la talla como en el contenido génico), aunque se han encontrado diferencias en el orden de los genes en algunos organismos como en los erizos de mar (Roberts y cols., 1983) y gusanos nematodos (Okimoto y cols., 1992). Casi todo el genoma mitocondrial tiene una función codificante: no hay intrones o largas secuencias de ADN repetitivo, pocas secuencias espaciadoras intergénicas y, excepto en la región control, pocos ejemplos de inserciones o deleciones (Harrison, 1989). Existen grandes variaciones en la longitud del ADNmt, especialmente en invertebrados (Densmore y cols., 1985; Rand y Harrison, 1989). Estas variaciones son a menudo debidas a diferencias en el número de copias de las repeticiones en tándem, normalmente localizadas en la región control de la molécula. Un posible mecanismo de variación en la longitud del ADNmt ocurre por el deslizamiento de las hebras de ADN complementarias durante el proceso de replicación, lo que induce inserciones o deleciones a través del desapareamiento de los elementos repetidos (Densmore y cols., 1985).

A pesar de su estabilidad genética, el ADNmt es una molécula que evoluciona rápidamente a nivel de su secuencia nucleotídica, probablemente como consecuencia de la carencia de mecanismos de

reparación de las mutaciones tras la replicación (Wilson y cols., 1985). Se ha comprobado que el ADNmt evoluciona en vertebrados de cinco a diez veces más rápidamente que el ADN nuclear (Brown y cols., 1979; Moritz y cols., 1987), estimándose una tasa del 2% de sustituciones en la secuencia por millón de años (Gyllensten y Wilson, 1986).

Entre las características básicas del ADNmt está la ausencia de recombinación y, por lo tanto, desde un punto de vista genético, es comparable a un único marcador molecular con múltiples alelos. Por lo tanto, los genotipos del ADNmt se conocen como clones o haplotipos que representan caracteres no recombinantes, transmitidos asexualmente por las hembras a través de organismos que se reproducen sexual o asexualmente. Consecuentemente, sus relaciones evolutivas se interpretan como estimadoras de la filogenia matriarcal (Awise y cols., 1979).

5.1.2. Análisis del polimorfismo del ADNmt

El estudio del polimorfismo del ADNmt se viene efectuando con diversas técnicas, entre ellas: hibridación ADN-ADN, comparación directa de las secuencias de nucleótidos (secuenciación) o el análisis de los fragmentos de restricción. La elección de un determinado tipo de marcador está relacionada con las ventajas y desventajas de su uso, las cuales deben ser evaluadas de acuerdo al tipo de análisis a realizar, a la naturaleza de la información que se quiere obtener y de acuerdo a consideraciones económicas y de prioridades institucionales. El análisis de los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*, RFLPs) resulta una técnica sencilla y relativamente económica, que permite obtener información de la cantidad y distribución de variación dentro y entre poblaciones, así como investigar importantes aspectos en diversas áreas de la ecología molecular y biología evolutiva (Awise, 1994; Beebe y Rowe, 2003).

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) (Mullis y Faloona, 1987) es una técnica de clonación enzimática que permite la amplificación de cualquier fragmento de ADN (sujeto a límites de tamaño) mediante el uso de cebadores sintéticos. Estos cebadores, empleados para iniciar el proceso de la PCR, son pequeñas secuencias de bases (20-30 nucleótidos de longitud) con alta complementariedad respecto a la secuencia que presentan las regiones que delimitan el fragmento que quiere amplificarse (Awise, 1994).

En general, el ADN se extrae del organismo en cuestión, y mediante la PCR se puede amplificar una región determinada de la molécula de ADNmt a partir del ADN total obtenido. Así, se consiguen millones de copias de una zona deseada para su estudio (amplificación). Es sobre esta zona sobre la que se procederá a la digestión con enzimas de restricción. La función de las enzimas endonucleasas (enzimas de restricción) es cortar el ADN en una posición constante dentro de una determinada secuencia de bases (normalmente entre 4 y 6 pares de bases) que son capaces de reconocer. Estas enzimas fueron aisladas en bacterias, donde realizan una importante función de eliminación de ADN extraño, conociéndose alrededor de 400 de ellas.

Los fragmentos de ADN obtenidos tras la digestión se someten a electroforesis aprovechando que la desoxirribosa que constituye la cadena de ADN está cargada negativamente en un medio de pH neutro. Cuanto mayor sea el fragmento mayor será la carga relativa de la molécula y, por tanto, migrará más en un campo eléctrico. Sin embargo, el tamaño de poro del gel de electroforesis en el que se someten a migración (agarosa o poliacrilamida) dificultará más este desplazamiento a aquellos fragmentos de mayor tamaño que a los pequeños. La conjugación de ambos factores, carga y tamaño, va a contribuir a discriminar con bastante precisión fragmentos desiguales en un gel. Se puede establecer el tamaño de cada fragmento, en número de pares de bases, utilizando como referencia fragmentos de tamaño conocido y comparando su migración. Un método para hacer visibles los fragmentos de ADN es la tinción directa. Para ello se pueden utilizar diversos reactivos como el bromuro de etidio o el nitrato de plata, que difieren en su sensibilidad para detectar distintas cantidades de ADN.

El número y tamaño de los fragmentos varía en función de dónde se haya producido el reconocimiento de la secuencia de ADN. Las diferencias en estos “perfiles de digestión” entre individuos van a reflejar cambios en la secuencia de ADN, fundamentalmente debidas a reorganización de la secuencia, adición o pérdida de fragmentos de ADN, o a la sustitución de alguna base en la zona de reconocimiento.

La utilidad de esta técnica resulta evidente tras lo comentado en párrafos anteriores. En primer lugar, la mayor tasa de evolución del ADNmt va a permitir descubrir diferencias genotípicas, permitiendo abordar filogenias, debido a su herencia clonal (Avise, 1989; Avise y cols., 1992). En segundo lugar, el estudio de la diversidad genética permitirá evaluar su relación con características fenotípicas, uno de los

fundamentos de los que trata la ecología molecular (Burke y cols., 1992).

Los análisis de restricción del ADNmt se aplican normalmente a nivel de poblaciones coespecíficas y especies muy próximas. Un resultado común obtenido de diversos estudios en mamíferos, reptiles, anfibios y peces de agua dulce es la alta diversidad clonal del ADNmt dentro de especies y las diferencias genéticas entre poblaciones (Awise y cols., 1979; Lansman y cols., 1983; Wright y cols., 1983; Awise y cols., 1984; Bermingham y Awise, 1986). Esto mismo se ha hallado en diversas especies de invertebrados (Latorre y cols., 1986; Saunders y cols., 1986; Reeb y Awise, 1990; Kappas y cols., 2004).

5.1.3. El ADNmt de *Artemia*

Valverde y cols. (1994) publicaron la secuencia completa del genoma mitocondrial de *A. franciscana*, la primera secuencia completa de ADNmt determinada dentro de la clase *crustacea*. El ADNmt de *Artemia* se compone de 15822 nucleótidos y constituye uno de los genomas animales más pequeños. Codifica para dos RNAs ribosómicos (12S y 16S) y 22 RNAs de transferencia. Además, también codifica para 13 polipéptidos, todos ellos subunidades de los complejos respiratorios de la membrana mitocondrial: tres subunidades de la citocromo *c* oxidasa (CO I, II y III), dos subunidades de ATP sintetasa (ATPasa 6 y 8), el citocromo *b* (Cyt *b*), y siete subunidades de la NADH deshidrogenasa (ND 1 a 6 y 4L) (Figura 5.1).

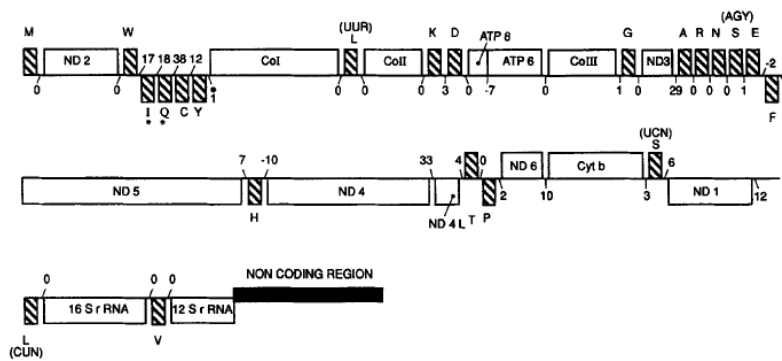


Figura 5.1. Mapa genético del ADNmt de *A. franciscana* (Valverde y cols., 1994).

5.1.4. Diversidad genética en las poblaciones argentinas de *Artemia*

Como ya se ha comentado en el capítulo anterior, el género *Artemia* está representado por dos especies bisexuales en el Nuevo Mundo: *A. franciscana*, presente en el Norte, Centro y Sur de América, y *A. persimilis*, hasta ahora hallada en algunos biotopos hipersalinos en Argentina (Amat y cols., 1994; Cohen y cols., 1999; Amat y cols., 2004) y en el Sur de Chile (Gajardo y cols., 1999; 2004). Generalmente, la diferenciación entre ambas especies a través de estudios alozímicos y citogenéticos (Abreu-Grobois, 1987; Badaracco y cols., 1987; Baratelli y Barigozzi, 1990; Colihueque y Gajardo, 1996; Gajardo y cols., 1998; Rodríguez Gil y cols., 1998) concuerda con los resultados obtenidos a través del análisis discriminante multivariante de los caracteres morfométricos (Hontoria y Amat, 1992a, b; Cohen y cols., 1999).

Las nuevas poblaciones descritas en el Capítulo 4 están siendo analizadas morfológicamente y mediante diversas pruebas de cruzamiento, y los resultados confirman la presencia de *A. persimilis* en el sur de Argentina (Amat, comunicación personal). Sin embargo, es necesaria una caracterización de las poblaciones mediante el análisis molecular del ADN, con el fin de verificar los resultados encontrados y establecer una evaluación de los patrones de diferenciación genética.

La diversidad en la composición de ácidos grasos hallada en las poblaciones argentinas de *Artemia*, procedentes de biotopos muy diversos (Capítulo 4), ha permitido establecer una serie de hipótesis acerca de los factores que condicionan el perfil lipídico de *Artemia*, entre los cuales no pueden excluirse los de tipo genético. El genotipo de un individuo está formado por todo el conjunto de genes que lo constituyen, mientras que el fenotipo es todo el conjunto de características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y comportamentales del individuo. La variabilidad entre individuos surge de los efectos combinados de las diferencias genotípicas y de las influencias ambientales y, por lo tanto, la variación fenotípica no es necesariamente heredada según la teoría mendeliana.

Como ya se ha comentado en la introducción de esta tesis, *Artemia* se diferencia en dos grandes grupos o tipos según su contenido en ciertos ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs): el tipo dulceacuícola, con altos niveles de 18:3n-3 y ausencia o escasa presencia de 20:5n-3; y el tipo marino, con menores contenidos del primero y presencia apreciable del segundo (Watanabe y cols., 1978a).

Estos fenotipos pueden ser el resultado de factores genéticos y ambientales. La plasticidad fenotípica, o la habilidad de un genotipo individual para responder a las influencias ambientales y generar diferentes fenotipos, es probablemente el resultado de la selección natural (West-Eberhard, 1989).

Los caracteres polimórficos bioquímicos detectados en *Artemia* (marino/dulceacuícola) pueden estar fuertemente influidos por la selección natural, el ambiente local, o ambos. En general, la ecología molecular estudia la identificación y el uso de marcadores genéticos neutros, regiones del genoma que pueden ser informativas con respecto a la estructura poblacional, sin la influencia de los factores ambientales. Los marcadores moleculares tienen la capacidad de resolver cuestiones en ecología, que son difíciles de resolver por otras vías. Una primera ventaja es que los marcadores, y las variaciones entre ellos, pueden ser cuantificados con una mayor precisión que otros tipos de medidas ecológicas. Esto, a su vez, proporciona mejores datos para llevar a cabo comparaciones estadísticas. Por lo tanto, para el desarrollo de la ecología molecular ha sido de crucial importancia el aislamiento y caracterización de una amplia variedad de marcadores moleculares, con diferentes niveles de polimorfismo, apropiados para resolver cuestiones específicas de interés.

Los objetivos de este capítulo son, en primer lugar, la caracterización genética de las poblaciones de *Artemia* halladas en Argentina, con la adición de una población localizada al sur de Chile, por ser la más meridional hallada en Suramérica. En segundo lugar, se aborda el estudio de la estructura genética de las poblaciones de *A. persimilis*, con el propósito de discernir si los diferentes haplotipos se correlacionan con los patrones bioquímicos (ácidos grasos) hallados en las poblaciones (marino/dulceacuícola). La investigación se llevó a cabo en el gen 16S rRNA del ADNmt a través del análisis de RFLPs, utilizados eficazmente como un método rápido y de fácil identificación de especies y poblaciones de *Artemia* (Baxevanis y Abatzopoulos, 2004; Gajardo y cols., 2004; Baxevanis y cols., 2005, 2006) y para el estudio de la estructura y diversidad genética de poblaciones (Palumbi, 1996).

5.2. MATERIAL Y MÉTODOS

5.2.1. Poblaciones analizadas

Las poblaciones estudiadas en el presente capítulo se resumen en la Tabla 5.1. En ellas se incluye la procedente de la laguna Los Cisnes, que es la población de *Artemia* hasta ahora localizada más al sur del continente americano, procedente de la región de Tierra de Fuego. En total se investigaron 12 poblaciones, incluyendo las muestras de referencia de *A. franciscana* (San Francisco Bay, SFB) y *A. persimilis* (Buenos Aires, BAI) (Gajardo y cols., 2004). Es de destacar la presencia de todas las combinaciones posibles de localización (costera/interior; C/I) y de perfiles de ácidos grasos (marino/dulceacuícola, M/D) en las poblaciones de *A. persimilis*, según los resultados del Capítulo 4.

5.2.2. Condiciones de cultivo

La eclosión de los quistes y el cultivo de las poblaciones se describen en los Apartados 3.1 y 3.2. Cuando fue evidente la madurez sexual en hembras (ovisaco desarrollado) y en machos (antenas desarrolladas), se muestreó el mismo número de individuos adultos de ambos sexos y se preservaron en etanol absoluto (Merck) a 4°C hasta la extracción de ADN.

5.2.3. Extracción de ADN

Para la obtención de ADN total a partir de un individuo se empleó el método descrito por Estoup y cols. (1996).

El protocolo se detalla a continuación:

Los individuos se depositan en tubos tipo Eppendorf de 1,5 ml, se añaden 600 µl de agua destilada y se agitan en un rotor durante 5 h para lavar y retirar los restos de alcohol.

Trancurrido este tiempo se retira el agua destilada y se añaden entre 400-500 µl del reactivo Chelex (6%, Bio-Rad, California, EE.UU.), calentado a 60°C, y se procede al homogeneizado de las muestras con la ayuda de una varilla esterilizada con etanol absoluto.

Se agitan los tubos en el vortex durante 1 min, tras lo cual se procede a la adición de la proteinasa K (*PrK*) (20mg/ml) cuya función es desnaturalizar las proteínas. La relación PrK-Chelex es 7:100 (v/v).

A continuación se introducen los tubos en un baño termostático a una temperatura de 55-60°C y se van agitando cada 2

Tabla 5.1. Relación de las muestras de *Artemia* analizadas.

Localidad	Abreviaturas	Especies	Tipo de		Coordenadas
			hábitat/perfil	ácidos grasos	
Hidalgo (Argentina)	HID	<i>A. persimilis</i>	I/D		37°08'S, 63°31'W
Algarrobo (Argentina)	ALG	<i>A. persimilis</i>	I/M		40°22'S, 63°13'W
Palos Blancos (Argentina)	PBL	<i>A. persimilis</i>	I/M		39°28'S, 62°45'W
El Ingles (Argentina)	ING	<i>A. persimilis</i>	C/D		40°43'S, 62°27'W
Caleta Olivia (Argentina)	COL	<i>A. persimilis</i>	C/D		46°27'S, 67°31'W
San Julian (Argentina)	SJU	<i>A. persimilis</i>	C/M		49°17'S, 67°46'W
Las Tunas (Argentina)	TUN	<i>A. franciscana</i>	I/M		33°45'S, 62°19'W
Mar Chiquita (Argentina)	CHI	<i>A. franciscana</i>	I/M		30°39'S, 62°36'W
Santiago del Estero	EST	<i>A. franciscana</i>	I/D		27°21'S, 64°13'W
Los Cisnes (Chile)	CIS	<i>A. persimilis</i>	C/?		53°15'S, 70°10'W
² Buenos Aires (Argentina)	BAI	<i>A. persimilis</i>	C/?		34°30'S, 58°20'W
² San Francisco Bay (EE.UU.)	SFB	<i>A. franciscana</i>	C/?		37°28'N, 122°30'W

¹I: Interior, C: costera; D: dulceacuicola, M: marino

²Muestras de referencia (Gajardo et al., 2004)

min durante 2 h. Seguidamente se llevan a un baño en ebullición (100°C) y se mantienen durante 10 min. Tras este periodo se dejan enfriar a temperatura ambiente. Finalmente se agitan en el vortex y se centrifugan a 10000 g durante 1 min. El sobrenadante, conteniendo el ADN aislado, se guarda a 4°C hasta su uso.

5.2.4. Amplificación del fragmento 16S rRNA del ADNmt

Se analizaron un total de 196 individuos pertenecientes a las dos especies de *Artemia* (*A. persimilis* y *A. franciscana*). Se amplificó un fragmento de 535 pb mediante PCR, en el cual se incluye parte del gen 16S rRNA del ADNmt. Para tal fin se emplearon los cebadores universales diseñados por Palumbi y cols. (1996) cuya secuencia se detalla a continuación:

L₂₅₁₀ 5'- CGCCTGTTTATCAAAAACAT- 3'

H₃₀₈₀ 5'- CCGGTTTGAAGTCAGATCATG- 3'

En esencia, la reacción de PCR consiste en una primera fase de desnaturalización de la doble cadena de ADN mediante el empleo de una temperatura elevada en el medio. Como consecuencia de esta desnaturalización la doble hélice se desenrolla y se estira. De esta forma los nucleótidos de las dos cadenas de ADN quedan accesibles para el acoplamiento de los cebadores, que reconocerán y se situarán en los lugares en los que la secuencia de nucleótidos sea complementaria a la que ellos portan.

Para el acoplamiento de los cebadores se emplea otra temperatura de reacción más baja, pero lo suficientemente elevada como para mantener desnaturalizada la doble hélice. La temperatura de acoplamiento es altamente específica, de modo que temperaturas elevadas sólo permitirán la unión de cebadores en los que la similitud de las secuencias de reconocimiento sea muy alta. Las temperaturas más bajas van a perder especificidad y sólo permitirán el acoplamiento del cebador en regiones donde las secuencias no son totalmente complementarias, pudiéndose amplificar fragmentos no deseados.

Los cebadores ya situados actúan como iniciadores de una reacción de replicación del fragmento de ADN. Este paso se conoce como fase de extensión, en la que se van añadiendo los nucleótidos necesarios para construir una cadena complementaria a la del ADN ya existente. Para la replicación de la cadena se usa la enzima Taq polimerasa como moderadora de la agregación de nucleótidos. Esta actúa con una temperatura más elevada que la que se usó para el

acoplamiento de los cebadores. La elevada temperatura usada en la fase de extensión facilita y acelera la reacción de replicación.

La reacción en sus tres fases (desnaturalización, acoplamiento y extensión) que se acaba de describir, se produce sobre las dos hebras de ADN en sentido inverso aunque siempre en el sentido de la replicación. Por ello, al finalizar el ciclo se replican las dos hebras y se obtiene una copia del fragmento de ADN de nuestro interés.

De esta forma, a partir de una pequeña cantidad de ADN total, se obtiene un producto final de PCR consistente en millones de copias de un fragmento determinado de ADN, que puede servir de base para un estudio con enzimas de restricción (en el presente caso, el 16S rRNA del ADNmt).

El protocolo concreto seguido en la PCR fue:

Para cada individuo se preparó la siguiente mezcla de reacción: en un tubo Eppendorf de 0,2 ml se depositaron 2 µl del extracto de ADN genómico o total (Apartado 5.2.3), 2 µl de tampón de reacción (10x), 1 µl de MgCl₂, 0,12 µl dNTPs (0,125 mM), 0,12 µl de cada cebador (100 pM), 14,52 µl de agua destilada estéril, y 0,12 µl de *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen, California, EE.UU.). Justo antes de introducir las muestras en el termociclador se centrifugaron 40 s a 10000 g para el homogeneizado de la mezcla.

El tampón de reacción consistió en una concentración final de 1,5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH 8,4) y 25 mM KCl.

La reacción de la PCR se realizó en un termociclador Peltier PTC-100[®] (MJ Research, Massachussets, EE.UU.) en el que se programó un ciclo inicial consistente en tres fases distintas de tratamiento térmico. En la primera fase se aplica una temperatura de 95°C durante 4 min. La siguiente fase consta de 32 ciclos de 50 s a 94°C, 50 s a 48°C, 1 min a 72°C, y en la última fase la temperatura permanece a 72°C durante 5 min.

El producto final de la reacción de PCR se mantiene a 5°C en el termociclador y después se almacena en un congelador a -20°C.

Previamente a su utilización en el análisis de restricción, el ADN amplificado con PCR se visualizó en un gel rutinario de agarosa al 1,5% (p/v) para comprobar si realmente se produjo amplificación y su grado de pureza.

5.2.5. Digestión del fragmento 16S rRNA con enzimas de restricción

Los productos de la PCR de cada individuo se digirieron por separado con cada una de las enzimas de restricción empleadas. Estas fueron un total de siete: *NotI*, *AluI*, *DpnII*, *DdeI*, *HaeIII*, *RsaI* y *MspI* (New England BioLabs[®], Massachussetts, EE.UU.).

El protocolo empleado se describe a continuación:

Para cada una de las digestiones de restricción se emplearon tubos de polipropileno de 0,65 ml a los que se añadían 5 µl de extracto de ADN (producto de PCR), 3,3 µl de agua destilada estéril, 1 µl de tampón de reacción, 0,1 µl de 100x BSA (New England BioLabs[®], Massachussetts, EE.UU.) y 0,6 µl de la enzima de restricción correspondiente.

Los tubos se incubaron a 37°C durante toda la noche para asegurar una digestión completa del ADN. Tras la digestión se añadieron 2 µl de marcador de migración (azul de bromotimol) y se centrifugaron de 10 a 15 s a 10000 g. Posteriormente los fragmentos de digestión se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1,5% (p/v), y una vez finalizada ésta, se visualizaron con luz ultravioleta y se fotografiaron.

5.2.6. Electroforesis en gel de agarosa

Los geles de agarosa que se emplearon en el presente estudio, tanto en la comprobación del producto final de la PCR como de la separación de los fragmentos de restricción, se prepararon al 1,5% (p/v) en 30 ml de tampón 5x TBE (Tris 0,089M, ácido bórico 0,089M, EDTA 0,089M), y 150 ml de agua destilada. Después de calentar en el microondas a 600W durante 4 min se adicionaron 3,5 µl de bromuro de etidio. La función de este reactivo es la de insertarse entre las dos hebras de ADN y producir fluorescencia bajo luz ultravioleta, de esta forma pueden visualizarse y fotografiarse las bandas de ADN.

Para la migración, los geles se situaron en la cubeta de electroforesis totalmente sumergidos en tampón 5x TBE, que actuó como tampón de electrodos. A las muestras de ADN (5 µl) se les añadieron 2 µl de un marcador de migración y se cargaron en los pocillos habilitados en el gel. Junto a éstas también se cargaron marcadores de ADN de hasta 1000 pb, útiles para determinar el tamaño de los fragmentos de ADN obtenidos.

5.2.7. Análisis de datos

5.2.7.1. Variabilidad intrapoblacional

La descripción de los genotipos de ADNmt obtenidos se estableció de la siguiente manera: se asignó una letra a cada perfil de digestión producido por una endonucleasa de restricción específica, por lo tanto, se generó un haplotipo compuesto por cada una de las siete enzimas utilizadas en este estudio (*NotI*, *AluI*, *DpnII*, *DdeI*, *HaeIII*, *RsaI* y *MspI*). De esta manera, cada individuo se describió como una combinación de siete letras que representan su genotipo de ADNmt particular.

Los sitios de corte producidos por las distintas enzimas sobre el fragmento de 16S rRNA permitieron determinar los haplotipos existentes, compartiendo un mismo haplotipo todos aquellos individuos que mostraban el mismo patrón de corte para cada una de las enzimas analizadas.

La frecuencia (f) de cada haplotipo dentro de una población se calculó de acuerdo a la fórmula:

$$f = n/N$$

donde n es el número de individuos que muestran un determinado haplotipo y N es el tamaño de la muestra.

La diversidad de haplotipo (h) dentro de una población se determinó de acuerdo a la ecuación de Nei (1987):

$$h = N (1 - \sum x_i^2) / (N - 1)$$

donde x_i es la frecuencia de cada haplotipo (f) y N el tamaño muestral.

El número de diferencias nucleotídicas (o porcentaje de nucleótidos substituidos) entre dos haplotipos (d) se calcula según la ecuación de Nei (1987). El valor de d se computa de manera separada para enzimas con diferente secuencia de reconocimiento (4, 5 o 6 pb) y el valor de la distancia final es la media de estas estimaciones (ponderadas como el número total de fragmentos producidos por la respectiva enzima). Los valores de d se usaron para calcular la diversidad nucleotídica dentro de poblaciones (d_x , d_y , también conocida como π) de acuerdo a la ecuación de Nei (1987). Para realizar estos cálculos se empleó el programa REAP v4.0 (McElroy y cols., 1992).

5.2.7.2. Variabilidad interpoblacional

La divergencia nucleotídica (d_A) se calculó a partir de la diversidad nucleotídica entre poblaciones (d_{xy}) (Nei, 1987), y con ella se puede extraer el componente de la diversidad no explicado por el polimorfismo dentro de poblaciones (Nei, 1987). Para realizar estos cálculos se usó el programa REAP v4.0 (Mc Elroy y cols., 1992).

La heterogeneidad en la distribución de frecuencias de haplotipo entre las poblaciones de *A. persimilis* se comprobó mediante la simulación de Monte Carlo (Roff y Bentzen, 1989). Esta técnica está recomendada para tamaños muestrales pequeños, donde a menudo surge el problema de la presencia de haplotipos raros. La distribución de χ^2 esperada se generó a través de un gran número de repeticiones al azar (10000) del conjunto de datos. Se calculó el valor medio de χ^2 basado en un solo cambio y se determinó la probabilidad de encontrar un χ^2 tan grande como el obtenido de la matriz original. La probabilidad P viene dada por la fórmula $P = n/N$, donde n es el número de repeticiones al azar que iguala o excede el valor observado de la χ^2 de la matriz original, y N es el número de los conjuntos de repeticiones.

Para conocer si las poblaciones de *A. persimilis* siguen un patrón de aislamiento por distancia, es decir, si existe una correlación positiva ($P \leq 0,05$) entre divergencia nucleotídica y distancias geográficas, se utilizó la prueba de Mantel (1967) mediante el programa ARLEQUIN v3.01 (Excoffier y cols., 2005).

5.2.7.3. Estructura genética

A partir de la matriz de distancias genéticas calculada se llevó a cabo el análisis molecular de la varianza (AMOVA, Excoffier y cols., 1992). Para realizar este análisis se comparan todos los genotipos, dos a dos, con el fin de obtener una matriz de distancias entre ellos. La distancia se calcula como el número de bandas no compartidas por los dos genotipos, lo que es equivalente a una distancia euclídea al cuadrado. El AMOVA utiliza la matriz de distancias para establecer los componentes de la varianza atribuibles a las diferencias entre grupos (especies), entre poblaciones dentro de los grupos y dentro de poblaciones.

También se analizaron los componentes de la varianza (entre poblaciones y dentro de poblaciones) para la especie *A. persimilis* (20 individuos por población). Los niveles de significación de las estimas de los componentes de la varianza (F_{ST}) se calculan por procedimientos permutacionales no paramétricos (en este caso por

medio de 1000 permutaciones al azar). Todos los AMOVAs se ejecutaron con el programa ARLEQUIN v3.01 (Excoffier y cols., 2005).

Dado que el propósito de la caracterización molecular descrita hasta aquí pretendía diferenciar las poblaciones de *Artemia* estudiadas, al tiempo que correlacionar la divergencia filogenética con la diversidad de perfiles de PUFAs hallada entre estas poblaciones, se realizaron diversas pruebas dirigidas a establecer dicha correlación. Primero se calculó la divergencia bioquímica entre las seis poblaciones de *A. persimilis* en función de la distancia euclídea de los porcentajes de los ácidos grasos más abundantes (16:0, 16:1n-9, 16:1n-7, 18:0, 18:1n-9, 18:1n-7, 18:2n-6, 18:3n-3, 20:4n-6, 20:5n-3) y del cociente 16:0/16:1, cuantificados en cada una de las poblaciones estudiadas. Seguidamente, se representaron en un dendrograma mediante el método *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages* (UPGMA) (Sneath y Sokal, 1973). En segundo lugar, se determinó la divergencia bioquímica a partir de la matriz de distancias calculada con los principales ácidos grasos biomarcadores del carácter marino / dulceacuícola de *Artemia* (18:3n-3 y el cociente 16:0/16:1). Adicionalmente, se determinó la matriz de valores F_{ST} para las seis poblaciones de *A. persimilis*. La correlación entre las distancias bioquímicas y genéticas (divergencia nucleotídica y F_{ST}) se comprobó mediante la prueba de Mantel.

5.2.7.4. Relaciones filogenéticas

Los datos obtenidos del análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción nos permiten establecer la filogenia de los individuos en base al fragmento de 16S rRNA. Para ello se han tenido en cuenta los datos de distancias genéticas. El estudio consiste en estimar cuantitativamente las divergencias que existen a nivel genético entre dos secuencias de nucleótidos, dos individuos o dos organismos u OTUs (*Operational Taxonomic Units*). Las unidades con que se miden las distancias genéticas se estiman como el número medio de sustituciones de bases por secuencia nucleotídica (Avise, 1994).

Para calcular las distancias genéticas se utilizó el método UPGMA. Una de las principales características de este método es que asume una tasa de evolución similar en todas las ramas del dendrograma, lo que equivale a que la divergencia que se ha producido entre los distintos OTUs ha sido al mismo ritmo.

Usando la matriz de distancias obtenidas a partir de las sustituciones nucleotídicas se creó un dendrograma en el que se

agrupan los haplotipos y las poblaciones en función de la similitud de las secuencias nucleotídicas. Para ello se empleó el programa PHYLIP v3.57c (Felsenstein, 2004).

5.3. RESULTADOS

5.3.1. Análisis de los haplotipos

Se encontró polimorfismo entre especies en cuatro (*NotI*, *AluI*, *DdeI* and *HaeIII*) de las siete enzimas de restricción utilizadas, produciendo distintos patrones de corte sobre el fragmento amplificado del 16S rRNA. La enzima de restricción *RsaI* detectó polimorfismo en *A. franciscana*, mientras que las enzimas *DpnII*, *DdeI* y *MspI* lo hicieron en *A. persimilis*.

Los patrones de digestión producidos por estas siete enzimas permitieron distinguir claramente siete haplotipos distintos (Tabla 5.2). El máximo número de haplotipos se observó en la especie *A. persimilis* (Pers 1 a Pers 6) y solamente se detectaron dos haplotipos en *A. franciscana* (Fran 1 y Fran 2). El haplotipo más común fue Pers 3 que se observó en cuatro de las poblaciones analizadas. La población PBL presentó el mayor número de haplotipos (tres) seguida de COL y CIS con dos haplotipos cada una. Las muestras de *A. franciscana* mostraron un solo haplotipo en las poblaciones argentinas, que difiere del encontrado en la población control (SFB) en un sitio de restricción para la enzima *RsaI*. El resto de poblaciones (HID, ALG, ING, SJU, BAI, TUN, CHI, EST, y SFB) no presentaron diversidad de haplotipo y la mayor diversidad nucleotídica la mostró la población CIS (Tabla 5.2).

Un ejemplo de patrón de corte se puede ver en la Figura 5.2.

5.3.2. Divergencias nucleotídicas y heterogeneidad en la frecuencia de haplotipo

El porcentaje de divergencia en la secuencia del fragmento de 16S rRNA entre los siete haplotipos se muestra en la Tabla 5.3. El mayor grado de divergencia en la secuencia se halla entre los haplotipos Fran 1 y Pers 1 ($0,188 \pm 0,076$). El haplotipo Fran 1 es único para SFB mientras que Pers 1 está presente en dos poblaciones: BAI y SJU.

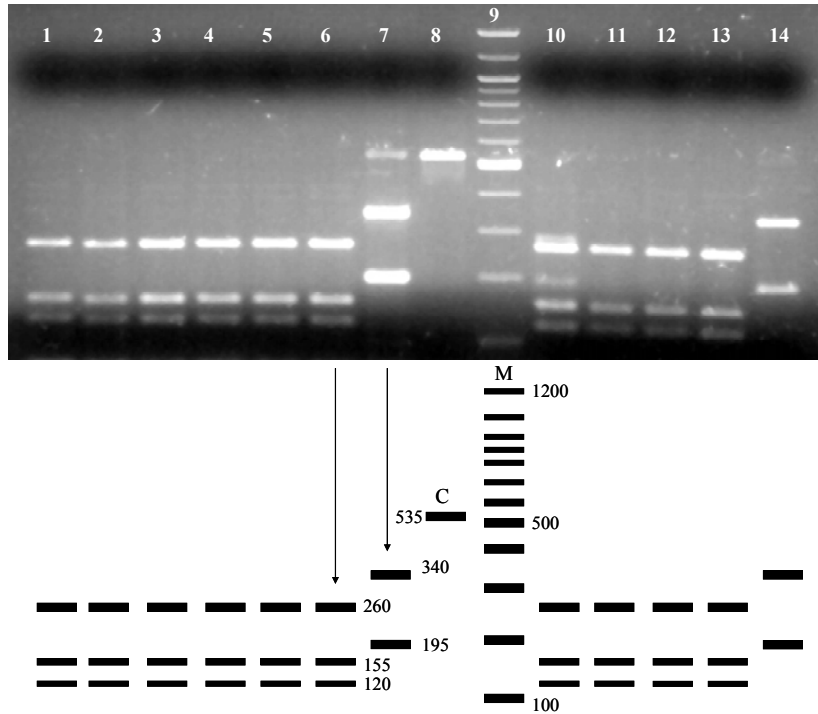


Figura 5.2. Patrón de corte para la enzima *Alu* I en el fragmento de 16S rRNA de las poblaciones PBL (columnas 1 a 6 y 10 a 13) y TUN (columnas 7 y 14). C: producto de PCR sin digerir (535pb), M: marcador de ADN.

Tabla 5.2. Estimaciones de la variabilidad en el ADNmt de *Artemia*. Los genotipos se identifican con letras mayúsculas y cada una ellas corresponde al patrón de enzimas utilizados, en el siguiente orden: *NotI*, *AluI*, *DpnII*, *DdeI*, *HaeIII*, *RsaI*, *MspI*.

HAPLOTIPO GENOTIPO		HID	ALG	PBL	ING	COL	SJU	TUN	CHI	EST	CIS	² BAI	² SFB
Fran1	AAAAAAA												1,00
Fran2	AAAAABA						1,00	1,00	1,00				
Pers1	BBBBBBB					1,00							1,00
Pers2	BBBBBBA	1,00		0,10									0,72
Pers3	BBABBBBA		1,00	0,75	1,00	0,80							
Pers4	BBABBBB					0,20							0,28
Pers5	BBACBBA			0,15									
n		20	20	20	20	20	20	20	20	18	18	23	23
h				0,426		0,337							0,425
dt				0,122		0,110							0,099
π				0,010		0,005							0,012
¹ Media h													0,149
¹ dt													0,041
¹ Media π													0,023 (10 ¹)
¹ dt													0,016 (10 ⁺)

h: diversidad de haplotipo; dt: desviación típica; π : % diversidad nucleotídica; n: tamaño muestral de las poblaciones.

¹ Poblaciones de *A. persimilis*.

² Muestras de referencia (Gajardo y cols., 2004)

Los valores de divergencia media entre los haplotipos Pers y Fran fueron $0,027 \pm 0,024$ y $0,020 \pm 0,021$, respectivamente, mientras que la divergencia media obtenida entre los dos grupos de haplotipos (Pers/Fran) fue $0,160 \pm 0,066$.

Tabla 5.3. Divergencia nucleotídica entre haplotipos (debajo de la diagonal). Los errores estándar (cursiva) se muestran por encima de la diagonal.

HAPLOTIPO	Fran1	Fran2	Pers1	Pers2	Pers3	Pers4	Pers5
Fran1 AAAAAAA		<i>0,021</i>	<i>0,076</i>	<i>0,072</i>	<i>0,068</i>	<i>0,072</i>	<i>0,055</i>
Fran2 AAAAABA	0,020		<i>0,072</i>	<i>0,068</i>	<i>0,062</i>	<i>0,068</i>	<i>0,051</i>
Pers1 BBBBBBB	0,188	0,175		<i>0,016</i>	<i>0,025</i>	<i>0,016</i>	<i>0,036</i>
Pers2 BBBBBBA	0,175	0,160	0,013		<i>0,018</i>	<i>0,025</i>	<i>0,031</i>
Pers3 BBABBBB	0,160	0,145	0,028	0,014		<i>0,018</i>	<i>0,025</i>
Pers4 BBABBBB	0,175	0,160	0,013	0,028	0,014		<i>0,031</i>
Pers5 BBACBBA	0,137	0,124	0,054	0,041	0,028	0,041	

Se utilizó la matriz de distancias nucleotídicas para establecer las relaciones filogenéticas y evolutivas existentes entre los siete haplotipos obtenidos. Se construyó un dendrograma para los haplotipos (Figura 5.3) mediante el método UPGMA descrito anteriormente. En él se pueden diferenciar dos grupos representados por los haplotipos hallados en *A. persimilis* y en *A. franciscana*. El haplotipo Pers 5 (presente en PBL) aparece como el haplotipo basal en el grupo de *A. persimilis*.

La comparación de la divergencia en la secuencia nucleotídica del ADNmt entre poblaciones (d_A), corregida por la diversidad inter-poblacional (d_{xy}), se presenta en la Tabla 5.4. Los valores medios de diversidad y divergencia nucleotídica entre todas las poblaciones estudiadas fueron $0,085 \pm 0,0000835$ y $0,083 \pm 0,000085$, respectivamente. Las estimaciones de divergencia nucleotídica entre *A. franciscana* y *A. persimilis* oscilaron entre 13,8 y 18,8%, mientras que la divergencia media en *A. franciscana* y en *A. persimilis* fue de 1,0 y 1,2%, respectivamente.

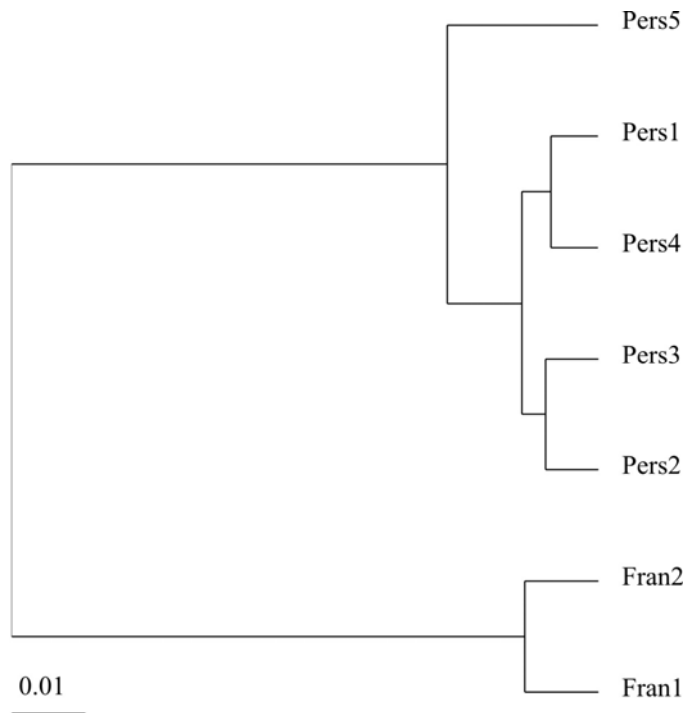


Figura 5.3. Dendrograma obtenido por el método de UPGMA a partir de la matriz de divergencia nucleotídica entre todos los haplotipos de ADNmt de las poblaciones de *Artemia* estudiadas.

Estos valores de divergencia nucleotídica se utilizaron como matriz de entrada para generar un dendrograma de las 12 poblaciones analizadas (Figura 5.4). De nuevo se evidencian dos grupos: las poblaciones de *A. persimilis* (primer grupo) se hallan separadas de las poblaciones de *A. franciscana* (segundo grupo). Dentro del primero, las poblaciones que comparten el haplotipo Pers 3 con elevada frecuencia (PBL, COL, ING y ALG) forman un grupo distinto que se bifurca del grupo de BAI, SJU, CIS y HID. Dentro de éste, se distinguen otros dos subgrupos, el que une a las poblaciones en las cuales el haplotipo Pers 1 es el más común (BAI, SJU), y el que agrupa a las poblaciones cuyo haplotipo más frecuente es Pers 2 (CIS, HID).

Tabla 5.4. Diversidad nucleotídica (d_{XY}) (sobre la diagonal) y divergencia nucleotídica (d_A) (debajo de la diagonal) entre las poblaciones de *Artemia* estudiadas.

POBLACIÓN	HID	ALG	PBL	ING	COL	SJU	TUN	CHI	EST	CIS	BAI	SFB
HID		0,014	0,017	0,014	0,017	0,013	0,160	0,160	0,160	0,008	0,013	0,175
ALG	0,014		0,006	0,000	0,003	0,028	0,145	0,145	0,145	0,014	0,028	0,160
PBL	0,012	0,001		0,006	0,008	0,030	0,143	0,143	0,143	0,018	0,030	0,158
ING	0,014	0,000	0,001		0,003	0,028	0,145	0,145	0,145	0,014	0,028	0,160
COL	0,015	0,000	0,001	0,000		0,025	0,148	0,148	0,148	0,016	0,025	0,163
SJU	0,013	0,028	0,025	0,028	0,023		0,175	0,175	0,175	0,013	0,000	0,188
TUN	0,160	0,145	0,138	0,145	0,146	0,175		0,000	0,000	0,160	0,175	0,020
CHI	0,160	0,145	0,138	0,145	0,146	0,175	0,000		0,000	0,160	0,175	0,020
EST	0,160	0,145	0,138	0,145	0,146	0,175	0,000	0,000		0,160	0,175	0,20
CIS	0,002	0,008	0,007	0,008	0,007	0,007	0,154	0,154	0,154		0,013	0,175
BAI	0,013	0,028	0,025	0,028	0,023	0,000	0,175	0,175	0,175	0,007		0,188
SFB	0,175	0,160	0,153	0,160	0,161	0,188	0,020	0,020	0,020	0,169	0,188	

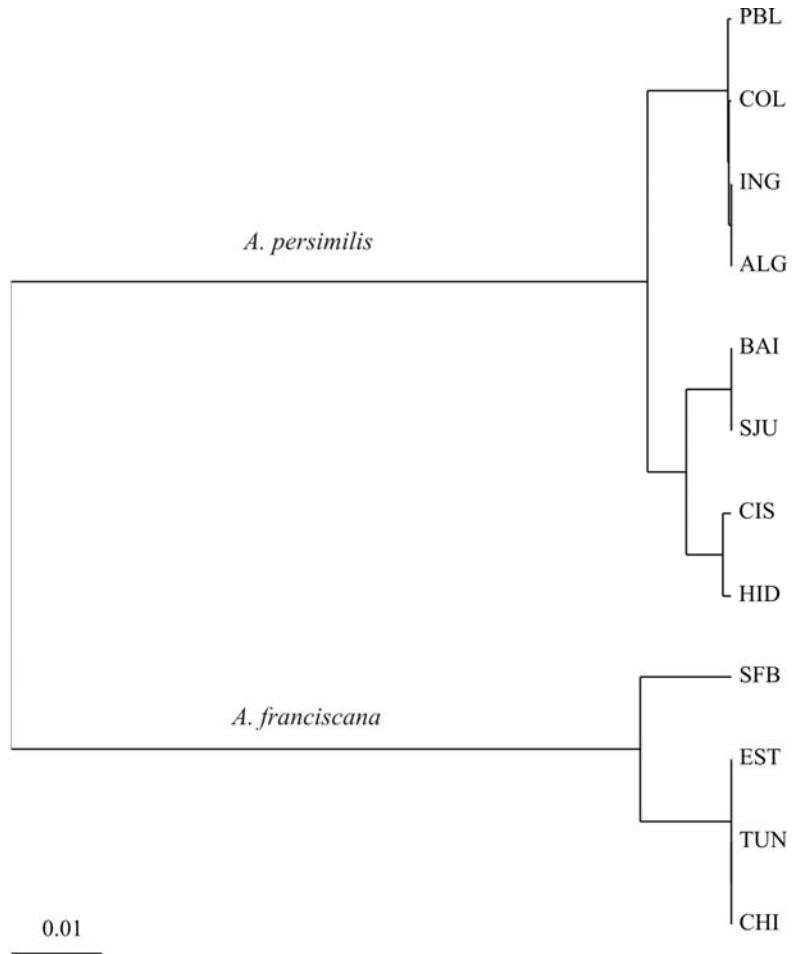


Figura 5.4. Dendrograma obtenido a partir del análisis de UPGMA para las poblaciones de *Artemia* estudiadas.

La heterogeneidad en la distribución de las frecuencias de haplotipo (Tabla 5.5) fue significativa entre las poblaciones de *A. persimilis* ($\chi^2 = 338,23$, $P < 0,01$). La prueba de Mantel, que contrasta la correlación entre divergencia nucleotídica y distancias geográficas entre todos los pares de las poblaciones de *A. persimilis* examinadas, no resultó significativa ($P = 0.47$).

Tabla 5.5. Distribución de la frecuencia de haplotipo (Pers1-Pers5) en cada población de *A. persimilis* analizada.

Población	Pers1	Pers2	Pers3	Pers4	Pers5
HID	0	20	0	0	0
ALG	0	0	20	0	0
PBL	0	2	15	0	3
ING	0	0	20	0	0
COL	0	0	16	4	0
SJU	20	0	0	0	0
CIS	0	13	0	5	0
BAI	20	0	0	0	0

5.3.3. Estructura genética

Los niveles de significación de las estimas de los componentes de la varianza (F_{ST}) mostraron diferencias significativas en las frecuencias de haplotipo entre todas las poblaciones ($F_{ST} = 0,97$, $P < 0,05$). La mayoría de la variación observada (91,41%) se debe a las diferencias existentes entre las dos especies identificadas, mientras que el 7,23% se debe a diferencias entre poblaciones dentro de especie, y el 1,36% de la variación total se atribuye al polimorfismo dentro de poblaciones. El valor F_{ST} para el grupo de *A. persimilis* fue muy alto ($F_{ST} = 0,81$, $P < 0,05$), con el 19,08% atribuible a la variación dentro de poblaciones.

Los resultados hallados tras la prueba de Mantel no mostraron correlaciones significativas entre la divergencia bioquímica de las poblaciones, calculada a partir del contenido en todos los ácidos grasos (Tabla 5.6, Figura 5.5), o considerando sólo los porcentajes de 16:0/16:1 y 18:3n-3 (Tabla 5.7), y la divergencia nucleotídica a nivel de ADNmt ($P = 0,98$ y $P = 0,77$). La prueba de Mantel también reveló una falta de asociación ($P = 0,94$ y $P = 0,70$) entre la divergencia en los valores de ácidos grasos y la matriz de valores de F_{ST} (Tabla 5.8). Por lo tanto, los patrones de diversidad genética encontrados en las poblaciones de *A. persimilis* y las diferencias entre muestras de tipo marino o dulceacuícola no se encuentran correlacionados.

Tabla 5.6. Matriz de distancias basada en los porcentajes de ácidos grasos (16:0, 16:1n-9, 16:1n-7, 18:0, 18:1n-9, 18:1n-7, 18:2n-6, 18:3n-3, 20:4n-6, 20:5n-3) y en el cociente 16:0/16:1 de los quistes de las poblaciones argentinas de *A. persimilis* analizadas en el Capítulo 4.

	HID	ALG	PBL	ING	COL	SJU
HID	0,000					
ALG	1,000	0,000				
PBL	0,939	0,235	0,000			
ING	0,000	0,965	0,897	0,000		
COL	0,363	0,718	0,762	0,344	0,000	
SJU	0,862	0,151	0,344	0,838	0,567	0,000

Tabla 5.7. Matriz de distancias basada en el porcentaje de 18:3n-3 y el cociente 16:0/16:1 de los quistes de las poblaciones argentinas de *A. persimilis* analizadas en el Capítulo 4.

	HID	ALG	PBL	ING	COL	SJU
HID	0,000					
ALG	0,981	0,000				
PBL	0,764	0,188	0,000			
ING	0,000	1,000	0,783	0,000		
COL	0,275	0,675	0,459	0,295	0,000	
SJU	0,931	0,020	0,140	0,951	0,626	0,000

Tabla 5.8. Valores F_{ST} de las poblaciones de *A. persimilis*.

	HID	ALG	PBL	ING	COL	SJU
HID	0,000					
ALG	1,000	0,000				
PBL	0,699	0,095	0,000			
ING	1,000	0,000	0,095	0,000		
COL	0,859	0,158	0,111	0,158	0,000	
SJU	1,000	1,000	0,832	1,000	0,903	0,000

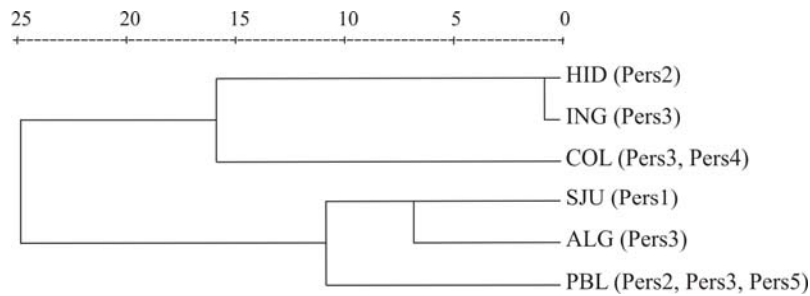


Figura 5.5. Dendrograma obtenido a partir del análisis de UPGMA según la matriz de distancias euclídeas del porcentaje de ácidos grasos 16:0, 16:1n-9, 16:1n-7, 18:0, 18:1n-9, 18:1n-7, 18:2n-6, 18:3n-3, 20:4n-6, 20:5n-3 y el cociente 16:0/16:1, analizado en las poblaciones de *A. persimilis*.

5.4 DISCUSIÓN

La publicación de la secuencia completa del ADNmt de *A. franciscana* (Valverde y cols., 1994) propició el uso de diversas técnicas basadas en el análisis de ADN (RFLPs, RAPDs, AFLPs o secuenciación) (Badaracco y cols., 1995; Triantaphyllidis y cols., 1997; Sun y cols., 1999; Gajardo y cols., 2004; Baxevanis y cols., 2005, 2006) como herramientas moleculares para la caracterización de las poblaciones y la evaluación de problemas evolutivos relevantes en *Artemia*.

Los resultados obtenidos en el presente estudio aportan una evidencia molecular, basada en el fragmento del gen 16S rRNA, sobre la presencia de *A. franciscana* y *A. persimilis* en Argentina y de *A. persimilis* en el Sur de Chile (CIS, Tierra del Fuego). Este hecho, unido a los hallazgos de otros autores (Amat y cols., 1994; Gajardo y cols., 1995, 1998; Rodríguez-Gil y cols., 1998; Cohen y cols., 1999; Zuñiga y cols., 1999; Papeschi y cols., 2000; Gajardo y cols., 2004) sobre la variabilidad genética, caracterización morfológica y pruebas de cruzamiento, ofrece nueva información sobre la diversidad genética y las relaciones evolutivas de *A. franciscana* y *A. persimilis*.

De las diez poblaciones de *Artemia* analizadas, siete se agrupan con la muestra de referencia de *A. persimilis* (BAI) (Figura 5.4) y tres con SFB (*A. franciscana*). La adscripción de algunas poblaciones de *Artemia* a ambas especies ya había sido puesta de manifiesto por Amat y cols. (1994), Cohen y cols. (1999) y Amat y

cols. (2004) a partir de análisis de morfometría, y por Papeschi y cols. (2000) mediante estudios citogenéticos. La población CIS (Chile) es, hasta ahora, la población de *Artemia* más meridional hallada en el continente americano y se ha identificado como *A. persimilis*. Esto confirma una vez más la presencia de esta especie en el sur de Chile (Gajardo y cols., 2004).

La diversidad de haplotipo y nucleotídica es evidente en las poblaciones de *A. persimilis* (PBL, COL y CIS) mientras que en *A. franciscana* no se detecta tal variación. Esto coincide, en parte, con los resultados publicados por Gajardo y cols. (2004) en el estudio de otras poblaciones de *Artemia* procedentes de Chile, ya que estos autores encuentran una mayor diversidad de haplotipo y nucleotídica en *A. persimilis* que en *A. franciscana* mediante el estudio de marcadores RFLPs. Las medidas de diversidad genética para las poblaciones de *A. persimilis* son aparentemente diferentes comparadas con las obtenidas por Gajardo y cols (2004), probablemente como resultado de un mayor número de muestras de esta especie disponibles para el presente estudio. Esto supone un hecho interesante considerando el carácter primitivo de las poblaciones de *A. persimilis* (Gajardo y cols., 2001; 2002) y los últimos hallazgos en los que se señala que *A. persimilis* ha divergido antes que *A. franciscana* desde el ancestro común del género (Baxevanis y cols., 2006).

Teniendo en cuenta el amplio número de muestras analizadas en el presente trabajo, se considera que los patrones de distribución de *A. persimilis* y *A. franciscana* en Argentina quedan delimitados. Es probable que *A. franciscana* haya llegado a los diferentes ecosistemas argentinos a través de inoculaciones deliberadas o mediante dispersión por aves acuáticas (zoocoria) como proponen Amat y cols. (2005) y Green y cols. (2005) para la cuenca del Mediterráneo.

La presencia de un “límite” en la distribución biogeográfica de *A. franciscana* y *A. persimilis* según los paralelos 37°-38°S proporciona cierta evidencia sobre la adaptación particular de cada especie en relación a los regímenes termicos característicos de sus respectivos hábitats. Resultados recientes (Medina y cols., 2007) demuestran la mayor eficacia reproductiva de *A. franciscana* frente a *A. persimilis* a temperaturas más elevadas. Esto podría aportar nueva información acerca de los patrones de expansión de las dos especies en Argentina.

La población TUN merece particular consideración debido a las características especiales ya puestas de manifiesto anteriormente por otros autores. Papeschi y cols. (2000) adscribieron esta población

citogenéticamente a *A. persimilis*. Por otra parte, Amat y cols. (2004), mediante el estudio de tablas de vida y pruebas de cruzamiento, propusieron la presencia de híbridos en la misma, apoyando así el planteamiento de Papeschi y cols. (2000). Esta situación podría reflejar la misma descrita por Gajardo y cols. (2004) en la población de Pichilemu (Chile), indicando la posible presencia de determinadas zonas de hibridación donde los individuos muestran características genéticas mixtas. El análisis molecular llevado a cabo en el presente estudio muestra que los haplotipos de ADNmt hallados en todos los individuos de la población TUN pertenecen a *A. franciscana*, aportando nueva información sobre las características genéticas de esta población. Sin embargo, los marcadores de ADNmt por sí solos no serían adecuados para identificar la presencia de híbridos en una población debido a su herencia materna y, en este sentido, resultarían mucho más informativos y eficientes los marcadores nucleares. Los resultados obtenidos tras los análisis citogenéticos (Papeschi y cols., 2000) y morfométricos (Amat y cols., 2004) previos para la población CHI y resultados recientes (datos no publicados) sobre el estudio de la población EST, demuestran que ambas poblaciones pertenecen a *A. franciscana*, y están en clara concordancia con estos datos obtenidos mediante el uso de marcadores genéticos.

Los resultados de este trabajo permiten concluir que la diferenciación genética entre las dos especies es muy alta y significativa ($P < 0,05$). En el análisis de χ^2 se confirma la heterogeneidad en las frecuencias de haplotipo entre las poblaciones de *A. persimilis*, observándose además un elevado F_{ST} (0,81). La ausencia de significación en la prueba de Mantel indica que estas diferencias genéticas entre poblaciones no pueden ser explicadas por el aislamiento geográfico entre ellas. El dendrograma que ilustra la Figura 5.4 muestra una agrupación de las poblaciones CIS y HID a pesar de ser poblaciones muy separadas geográficamente (1850 Km). Esta misma situación se da en las poblaciones BAI y SJU, igualmente aisladas la una de la otra. La diferenciación de las poblaciones podría atribuirse a la deriva genética y el limitado flujo génico existente entre las mismas. Otra posibilidad procedería del “efecto fundador”¹ extremo (Mayr, 1963) que terminaría conformando la estructura poblacional. Además, los biotopos argentinos prospectados varían sustancialmente en sus condiciones químicas (Capítulo 4) y esta

¹ Cuando una población se origina a partir de pocos individuos que se separaron por alguna razón de una población mayor. Si el número de individuos inicial era excepcionalmente bajo se dice que la población presenta un efecto fundador extremo.

diversidad ecológica puede tener un efecto adicional en la estructura genética y variabilidad hallada en las poblaciones de *A. persimilis*. Sin embargo, los RFLPs se consideran marcadores neutros, por lo que no se puede invocar a la selección natural para explicar la distribución de la variabilidad genética detectada. Aún así, existe la posibilidad de que la selección natural pueda actuar sobre algunos *loci* concretos. No obstante, para demostrarlo, sería necesario caracterizar estas secuencias.

Como ya se ha comentado, la mayor parte de la variabilidad genética en la especie *A. persimilis* es interpoblacional, siendo la diferenciación intrapoblacional poco importante. Las poblaciones son diferentes genéticamente y resulta fácil separarlas en un dendrograma. Frente a estos resultados y en relación con el segundo objetivo de este estudio que trataba de correlacionar los perfiles de ácidos grasos y patrones genéticos de las poblaciones, se pueden extraer algunas conclusiones interesantes.

Los análisis realizados en el capítulo anterior acerca de la composición de ácidos grasos de *Artemia* demuestran la enorme variabilidad en la proporción de determinados ácidos grasos, como el 18:3n-3 o 20:5n-3, hallada entre las poblaciones. Una primera aproximación para investigar la variabilidad genética en los perfiles de PUFAs tiene que ver con el uso de marcadores moleculares que identifiquen los tipos marino/dulceacuícola hallados en *Artemia*. Para explicar la divergencia en los perfiles de ácidos grasos se proponen dos hipótesis. En la primera, la divergencia bioquímica podría ser el resultado de la deriva genética, ya que la deriva afectaría a todo el genoma, incluyendo el mitocondrial, y podría dar lugar a patrones de divergencia similares en las regiones del genoma que no están relacionadas funcionalmente con el metabolismo lipídico. Como alternativa se puede considerar que ciertos perfiles de ácidos grasos proporcionan alguna ventaja adaptativa, estando limitada la divergencia genética a los genes responsables de estos perfiles (por ejemplo, aquellos que codifican para enzimas desaturadas). En este escenario, la selección natural podría haber causado divergencia en los genes implicados en el metabolismo de los PUFAs, aunque no necesariamente a nivel del genoma mitocondrial.

El examen de correlación entre la variabilidad genética en el ADNmt y la variabilidad en la composición de ácidos grasos de las poblaciones de *A. persimilis* (ya que ésta es la única que muestra diversidad de haplotipo y nucleotídica en el presente estudio), revela que no existe asociación entre los patrones de RFLPs del 16S rRNA y

los perfiles de ácidos grasos. Esto apoya la segunda hipótesis y sugiere que la base genética de los perfiles bioquímicos, si existe, está limitada a los genes responsables del metabolismo de los ácidos grasos, probablemente como mecanismo adaptativo. Sin embargo, deberían tenerse en cuenta otras dos posibilidades. Primero, es probable que los marcadores investigados no detecten la divergencia genética entre los perfiles tipo marino y dulceacuícola, debido a la varianza entre *loci* por el efecto de la deriva y las diferencias en la tasa de evolución entre regiones genómicas. Por lo tanto, otras regiones del ADNmt con una mayor tasa evolutiva, u otros marcadores nucleares, podrían mostrar un patrón de divergencia paralelo entre el nivel genético y bioquímico.

Una segunda posibilidad es que el patrón de divergencia bioquímica entre los dos grupos de poblaciones este causado única o principalmente por el efecto del ambiente. De hecho, en numerosos estudios se ha sugerido que el perfil de ácidos grasos de los quistes de *Artemia* refleja el perfil de ácidos grasos del alimento consumido por las poblaciones parentales (Léger y cols. 1886; Navarro y Amat, 1992). Consecuentemente, la plasticidad fenotípica podría explicar porqué las notables diferencias en el perfil de ácidos grasos de las poblaciones procedentes de biotopos muy diversos no se correlacionan con la divergencia en los marcadores genéticos analizados.

Análisis adicionales con otros marcadores, particularmente aquellos derivados de secuencias localizadas en los genes implicados en el metabolismo de ácidos grasos, como los que codifican para desaturasas, pueden resultar una herramienta poderosa para establecer la base genética de los perfiles de PUFAs en *Artemia*. Estos estudios tendrán que esperar hasta que los principales genes que codifican para desaturasas en *Artemia* sean aislados y caracterizados. Además, se hace necesario un estudio a través de experimentos genéticos clásicos, específicamente diseñados para evaluar los componentes genéticos y ambientales que determinan la variabilidad en los perfiles de ácidos grasos encontrados.

En conclusión, la técnica RFLP ha proporcionado nuevas aportaciones sobre la distribución de *A. persimilis* y *A. franciscana* en una amplia región de América del Sur. El presente estudio ha contribuido significativamente a una descripción más exhaustiva de la especie *A. persimilis*, una especie primitiva representada por muy pocas poblaciones en anteriores estudios, y *A. franciscana*, un linaje con un potencial de expansión extraordinario. Aunque no se han analizado todas las poblaciones existentes, y son necesarios más

experimentos que ofrezcan una mayor resolución, los resultados encontrados son de gran utilidad para futuras investigaciones en una región geográfica donde dos especies bisexuales de *Artemia* pueden entrar en contacto por su proximidad. Con el progresivo incremento en la variedad de especies y poblaciones de *Artemia* destinadas al mercado de la acuicultura, resultaría muy interesante y valioso investigar marcadores moleculares alternativos y otras regiones del genoma, además de las analizadas aquí, que sirvieran como bandas diagnósticas y estuvieran potencialmente asociados a los patrones de ácidos grasos en *Artemia*.

CAPÍTULO 6

EFFECTO DE LA DIETA SOBRE EL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS, SUPERVIVENCIA Y REPRODUCCIÓN DE *Artemia*

6.1. INTRODUCCIÓN

Los ácidos grasos que se transfieren de manera estable a través de la cadena trófica pueden revelar determinadas relaciones entre productores primarios y consumidores (Sargent y cols., 1987; Fraser y cols., 1989; Dalsgaard y cols., 2003). Por ello, los ácidos grasos 20:5n-3 y 16:1n-7 serían buenos indicadores de una alimentación del zooplancton basada en diatomeas como *Phaeodactylum tricorutum*, que son microalgas caracterizadas por presentar elevadas concentraciones de estos ácidos grasos. Por otro lado, la abundancia de C18 indicaría una alimentación rica en algas verdes (p.e. *Dunaliella* sp.) y, altos contenidos en 20:4n-6, señalarían una alimentación abundante a base de algas rojas (p.e. *Porphyridium cruentum*), que generalmente contienen elevadas cantidades de este ácido graso (Brown, 2002).

El valor de los ácidos grasos como biomarcadores de la dieta consumida por el zooplancton está limitado por la capacidad de estos organismos para transformarlos. De acuerdo con Brett y Müller-Navarra (1997), algunos grupos del zooplancton tienen la capacidad de convertir 18:2n-6 (ácido linoleico) y 18:3n-3 (ácido linolénico) en 20:4n-6 (ácido araquidónico) y 20:5n-3, respectivamente. En *Artemia*, la posibilidad de biosíntesis de ácidos grasos altamente insaturados (HUFAs n-3) ha sido puesta de manifiesto por Schauer y Simpson (1985) quienes señalan la capacidad de estos anostráceos para sintetizar 20:5n-3 a partir de 18:3n-3. Esta capacidad puede variar entre diversas poblaciones y/o especies de *Artemia* y parece ser que ciertos niveles de ácidos grasos cambian dinámicamente no sólo durante el crecimiento del crustáceo sino también dependiendo de la dieta disponible en momentos específicos de su desarrollo (Wache y Laufer, 1998).

Como ya se ha comentado en anteriores capítulos, el perfil marino/dulceacuícola (Watanabe y cols., 1978a) de las poblaciones de *Artemia* puede estar determinado por numerosos factores. En estudios de poblaciones naturales (Capítulo 4) se hace difícil investigar la contribución de cada uno de estos factores, dada la complejidad del sistema y, por este motivo, los experimentos bajo condiciones controladas de laboratorio resultan de mayor utilidad. En este sentido, numerosos autores han evidenciado que la dieta suministrada a las poblaciones experimentales es uno de los principales parámetros que influye de manera significativa en la composición lipídica de *Artemia* (Lavens y cols., 1989; Navarro, 1990; Navarro y Amat, 1992; Zhukova y cols., 1998; Vismara y cols., 2003). Lavens y cols. (1989)

llegaron a la conclusión de que el perfil de ácidos grasos de quistes reflejaba, en líneas generales, el del alimento inerte suministrado a la generación parental. Navarro (1990) demostró experimentalmente la influencia del tipo de alimento en el perfil lipídico de quistes y nauplios. Si bien todos concluyen que la composición en ácidos grasos de la descendencia refleja la composición de la dieta con la que se alimentó a la generación parental, no se conoce hasta qué punto las poblaciones pueden llegar a cambiar su perfil de tipo marino a dulceacuícola (Watanabe y cols., 1978a) o viceversa.

El alimento suministrado a las poblaciones de *Artemia* debe ser de una calidad suficiente para que éstas puedan mantener sus funciones bioquímicas y fisiológicas. Los factores que afectan a la calidad del alimento para el zooplancton, incluyen características como el tamaño de las células microalgales (Berggreen y cols., 1988), la toxicidad (Miralto y cols., 1999) o el contenido en algunos componentes bioquímicos como los ácidos grasos (Anderson y Pond, 2000).

D'Agostino (1980) publicó una larga lista de especies de microalgas aptas para el cultivo de *Artemia*, entre las cuales se incluyen las diatomeas (Braun, 1980; Gozalbo, 1990). Algunos autores (Miralto y cols., 1999; Irigoien y cols., 2002) señalan el efecto negativo de un monocultivo de diatomeas en la reproducción y crecimiento de copépodos y sugieren varias causas como responsables. La primera reside en el hecho de que estas microalgas son deficientes nutricionalmente (p.ej. carencia de determinados ácidos grasos) y la segunda en que, debido a su capacidad para producir aldehídos, pueden resultar tóxicas para los animales.

Como hallan Jones y Flynn (2005) en copépodos, una alimentación mixta basada en diatomeas y dinoflagelados favorece el crecimiento y la reproducción de las poblaciones más que una alimentación basada en un monocultivo microalgal, y lo atribuyen a la mayor calidad nutricional de la dieta mixta. En este mismo sentido, autores como Demott y Müller-Navarra (1997), en estudios con *Daphnia galeata*, han puesto de manifiesto que una dieta mixta provista de ciertos niveles de HUFAs n-3 produce un mayor crecimiento y fecundidad en las poblaciones. Anderson y Pond (2000) señalan que una deficiencia nutricional relacionada con la reducción drástica de PUFAs específicos en la dieta, induce una disminución potencial de la tasa reproductiva del zooplancton. Así, en algunas especies se ha observado una correspondencia entre fecundidad y niveles de 20:5n-3 y 22:6n-3 en la dieta (Müller-Navarra y cols., 2000; Becker y Boersma, 2003). Esta relación es asociable a la

importancia de los ácidos grasos n-3 en el funcionamiento de las membranas (Sargent y Falk-Petersen, 1988) y en la maduración de las gónadas (Harrison, 1990; Lacoste y cols., 2001). A pesar de los numerosos estudios realizados en diversos grupos del zooplancton, la influencia de la calidad del alimento (en términos de composición en ácidos grasos poliinsaturados, PUFAs) sobre la eficacia reproductiva de *Artemia* todavía se desconoce.

La gran cantidad de muestras analizadas en el Capítulo 4 permitió evidenciar una alta diversidad en la composición de ácidos grasos de quistes de *Artemia*, con la presencia de poblaciones de tipo marino, de tipo dulceacuícola e intermedio. Este capítulo trata de evaluar el efecto del alimento sobre dos aspectos:

1) el perfil de ácidos grasos de quistes de distintas poblaciones de *Artemia* cultivadas en laboratorio, en tanto que determinantes de su valor nutritivo,

2) los factores demográficos como determinantes de la biología de *Artemia*.

6.2. MATERIAL Y MÉTODOS

6.2.1 Poblaciones

Se utilizaron las siguientes poblaciones argentinas de *Artemia*, cuya localización y características se han referido en el Capítulo 3:

Algarrobo (ALG): *A. persimilis* con perfil original de ácidos grasos del tipo marino.

El Inglés (ING): *A. persimilis* con perfil original de ácidos grasos del tipo dulceacuícola.

Caleta Olivia (COL): *A. persimilis* con perfil original de ácidos grasos del tipo intermedio (Ruiz y cols., 2007).

Salinas Grandes de Hidalgo (HID): *A. persimilis* con perfil original de ácidos grasos del tipo dulceacuícola.

San Julián (SJU): *A. persimilis* con perfil original de ácidos grasos del tipo marino.

Palos Blancos (PBL): *A. persimilis* con perfil original de ácidos grasos del tipo marino.

Mar Chiquita (CHI): *A. franciscana* con perfil original de ácidos grasos del tipo marino.

Las Tunas (TUN): *A. franciscana* con perfil original de ácidos grasos del tipo marino.

6.2.2. Obtención de quistes de poblaciones de *Artemia* cultivadas con diferentes dietas microalgales

Las poblaciones de *Artemia* citadas en el apartado anterior se cultivaron en bandejas individualizadas dispuestas en una cámara termostatzada regulada a 24°C y con un fotoperiodo de 12:12 h luz:oscuridad durante 180 d. Todas ellas se alimentaron con una mezcla (1:1, v/v) de las microalgas *Dunaliella* sp. / *Tetraselmis suecica* (D/T), por lo que se le denominará dieta mixta. En este caso, se trata de averiguar si todas las poblaciones, además de pertenecer a las dos especies diferentes (*A. franciscana*/*A. persimilis*), varían su perfil de ácidos grasos de forma similar cuando se les suministra una dieta pobre en HUFAs. Adicionalmente, las muestras de *A. persimilis* procedentes de ING y ALG se sometieron a dos experimentos de alimentación a base de monocultivos de las especies *Porphyridium cruentum* (POR) y *Phaeodactylum tricornutum* (PHA), dos especies microalgales caracterizadas por presentar elevados contenidos en HUFAs, con la finalidad de investigar si se produce un cambio en el perfil original de ácidos grasos de las poblaciones, y si lo hace de la misma forma en ambas. Las especies microalgales se seleccionaron en virtud de sus diferencias en cuanto al contenido de ácidos grasos. Su cultivo se llevó a cabo tal y como se describe en el Apartado 3.3. Periódicamente se recogían y liofilizaban muestras de microalgas en cultivo para su posterior análisis.

Las microalgas se añadían a las bandejas de cultivo cada dos días con la intención de mantener una concentración que permitiera una alimentación *ad libitum*, alternada con periodos de estrés por disponibilidad subóptima de alimento, para favorecer la inducción del oviparismo. Se fue aumentando progresivamente la salinidad desde 60 g l⁻¹ al inicio del experimento hasta 90 g l⁻¹ a lo largo y hasta el final de la experiencia, para aumentar la producción de quistes en las poblaciones. Los quistes emitidos por las hembras se recogían sobre de una malla 100 µm de luz siguiendo el procedimiento descrito en el Apartado 3.1.2.

A partir de las muestras de quistes y de algas liofilizadas, se procedía a la extracción de los lípidos totales (Apartado 3.4.1), sobre los que, más tarde, se analizaron los ácidos grasos mediante el procedimiento descrito en los Apartados 3.4.2 y 3.4.3.

6.2.2.1. Análisis estadísticos

Para estudiar las diferencias entre las dos especies de *Artemia* alimentadas con las tres dietas se empleó el análisis de componentes principales (*Principal Component Analysis*, PCA). En el análisis se incluyeron las poblaciones originales analizadas en el Capítulo 4 con el fin de observar los posibles cambios en el perfil de ácidos grasos tras ser cultivadas en laboratorio. Las variables del estudio fueron los contenidos porcentuales de los siguientes ácidos grasos: palmítico (16:0), esteárico (18:0), palmitoleico (16:1n-7), *cis*-7-hexadecenoico (16:1n-9), *cis*-vaccénico (18:1n-7), oleico (18:1n-9), linoleico (18:2n-6), linolénico (18:3n-3), araquidónico (20:4n-6), eicosapentaenoico (20:5n-3), y la relación 16:0/16:1. Antes de proceder al PCA se comprobó la idoneidad de los datos mediante el método Kaiser-Meyer-Olkin (KMO) (Kaiser, 1970, 1974) y la prueba de Bartlett (Bartlett, 1954). Se detallan los valores de comunalidades obtenidos tras el análisis, que indican las variables más informativas en la representación bidimensional.

Las nuevas variables (o componentes principales) medidas en cada una de las poblaciones se compararon mediante ANOVA de una vía (Sokal y Rohlf, 1981) y posterior prueba de comparación múltiple de Tukey.

6.2.3. Supervivencia, reproducción y periodos de vida

En este experimento se emplearon las poblaciones de Algarrobo (ALG) y El Inglés (ING), identificadas genéticamente como *A. persimilis* (Capítulo 5) y de distinto perfil de ácidos grasos original (Capítulo 4).

Cada población se alimentó *ad libitum* con dos dietas: mixta (D/T) y monocultivo de diatomeas (PHA). Los nauplios de 72 h de edad se separaron en grupos de 100 individuos en un total de 5 replicados por tratamiento (dieta). Cada dos días se contabilizaban los animales muertos, hasta el momento en que se evidenciaron los primeros signos de ovulación en las hembras, y los machos presentaron las antenas bien desarrolladas. En este momento se clasificaron los animales según su sexo y se aislaron una hembra y un macho en recipientes individuales, con un volumen de suspensión microalgal de 75 ml a 60-70 g l⁻¹ de salinidad. Cada pareja se mantuvo durante un periodo aproximado de 3 meses, reemplazando al macho cuando moría. Al menos una vez al día se contabilizaron y extrajeron de los recipientes los descendientes obtenidos y se añadió nuevo medio. Se realizaron veinte replicados por tratamiento.

Para cada hembra se calcularon las siguientes variables:

_Periodo prerreproductivo: tiempo transcurrido (d) entre el día del nacimiento del nauplio y la emisión de la primera puesta como hembra adulta.

_Supervivencia en el periodo prerreproductivo.

_Periodo reproductivo: tiempo transcurrido (d) desde la primera hasta la última puesta.

_Número de descendientes por puesta.

_Número de puestas.

_Número total de descendientes por hembra.

_Número de descendientes producidos por día a lo largo del periodo reproductivo: tasa diaria de reproducción de las hembras.

_Tiempo medio o intervalo de tiempo (d) entre puestas.

_Porcentaje de descendientes enquistados: descendencia ovípara.

_Porcentaje de descendientes naupliares: descendencia ovovivípara.

_Longevidad de las hembras: tiempo (d) transcurrido desde su nacimiento hasta su muerte.

6.2.3.1. Análisis estadísticos

La normalidad de todas las variables se comprobó previamente mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov (Sokal y Rohlf, 1981). Aquellas variables que no cumplieran con el supuesto de normalidad se transformaron mediante el arcoseno ($\arcsin \sqrt{\text{varx}/100}$).

Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores para cada una de las variables. Se consideraron las dos poblaciones (ING y ALG) como un factor y las dos dietas (D/T y PHA) como el otro factor. Los resultados se expresan en términos del nivel de significación que se obtiene para cada factor. Dicho nivel indica la probabilidad de cometer un error cuando se rechaza la hipótesis nula de igualdad de medias entre los diferentes niveles de un factor. El nivel de significación de la interacción contrasta la hipótesis de que las diferencias entre los diversos niveles de un factor son iguales cualesquiera que sean los niveles del otro factor (Winer, 1971). En este caso, si la interacción entre los dos factores (dieta y población) de una variable es significativa como para rechazar la hipótesis, se puede afirmar que no todas las poblaciones en estudio se comportan del mismo modo bajo las dos dietas experimentales.

Los análisis realizados sobre la longevidad de las hembras incluyeron todos los replicados. En el caso del número de descendientes por puesta, número total de puestas, porcentaje de descendencia enquistada y naupliar, periodo prerreproductivo y periodo reproductivo, se eliminaron los replicados con menos de una puesta debido a que, obviamente en este caso, dichas variables no pueden calcularse. Del mismo modo, para el cálculo del intervalo entre dos puestas consecutivas, se excluyeron las réplicas con menos de dos puestas, y la tasa diaria de reproducción no se calculó para aquellas hembras con una sola puesta, dado que en este caso el periodo reproductivo debe considerarse de 1 d, con la consiguiente sobrevaloración de esta variable.

Se utilizó el ANOVA de un factor para contrastar la hipótesis de que las medias de los distintos grupos no son diferentes significativamente. Posteriormente se aplicó la prueba de Tukey (Sokal y Rohlf, 1981) para la comparación múltiple de medias.

Con el fin de determinar las relaciones existentes entre las variables demográficas y el porcentaje de ácidos grasos en la dieta, se realizó un análisis de correlación canónica (*Canonical Correlation Analysis*, CCA). La matriz de datos utilizada se transformó mediante la sustracción del menor valor encontrado en cada variable a cada uno de los datos, y la suma de la unidad para minimizar la salida de resultados en el análisis (Thompson, 1984; Gifi, 1990).

El CCA establece la relación existente entre un grupo de variables independientes (en este caso ácidos grasos) y otro grupo de variables dependientes (aquí demográficas). Es una generalización de la regresión múltiple al caso de más de una variable dependiente. En este caso se desea explorar la relación entre los porcentajes de ácidos grasos en la dieta y las variables demográficas. El objetivo principal es encontrar una serie de pares de funciones compuestas, combinación lineal del primer y segundo grupo de variables, con la propiedad de que la correlación entre cada par de variables sea máxima. Estas variables se denominan variables canónicas:

Variables canónicas del grupo de variables demográficas

$$(Y_1, Y_2, \dots, Y_n) = v_{1n} \text{ Supervivencia} + v_{2n} \text{ Periodo prerreproductivo} + v_{3n} \text{ Periodo reproductivo} + \dots v_{11n}$$

Variables canónicas del grupo de variables bioquímicas

$$(X_1, X_2, \dots, X_n) = u_{1n} \% (16:0) + u_{2n} \% (16:1n-7) + \dots u_{11n} \% (\text{Ácido graso}).$$

Este tipo de análisis guarda cierto paralelismo con el análisis de componentes principales, pero si en éste se estudian las dependencias internas entre variables de un mismo grupo, la correlación canónica contempla la relación o dependencia entre dos grupos de variables.

6.3. RESULTADOS

6.3.1. Perfiles de ácidos grasos

La Tabla 6.1 muestra la composición de ácidos grasos de los quistes obtenidos a partir de las poblaciones de *A. franciscana* y *A. persimilis* alimentadas con D/T. La Tabla 6.2 refleja los perfiles de ácidos grasos obtenidos a partir de las poblaciones de ING y ALG alimentadas con PHA y POR. En ambas tablas se presenta la composición en ácidos grasos de las microalgas empleadas. En el caso de los adultos alimentados con D/T el perfil de los nuevos quistes guarda más paralelismo con el de la dieta que en el caso de los alimentados con POR y PHA.

Las poblaciones alimentadas con D/T originan quistes con perfiles de ácidos grasos similares entre ellas, independientemente de la especie que se trate. Sin embargo, se observa que la población Caleta Olivia difiere de las demás por presentar niveles de 16:1n-7 y 20:5n-3 superiores y de 18:3n-3 inferiores.

El alimento suministrado a los adultos modifica el perfil de ácidos grasos de la descendencia, tanto en poblaciones de tipo marino (p.ej. ALG) como en poblaciones de tipo dulceacuícola (p.ej. ING) (Tablas 6.1 y 6.2). En las Figuras 6.1, 6.2 y 6.3 se representa el perfil de ácidos grasos de los quistes originales, de la progenie y de la dieta utilizada. En general, el porcentaje de ácidos grasos de la descendencia varía en función del porcentaje hallado en la dieta de los adultos, excepto para los ácidos grasos 16:0, 18:0 y 18:1n-9 (Figuras 6.1, 6.2 y 6.3). En el caso del 18:0, los quistes originales y los obtenidos en laboratorio presentan un porcentaje similar, aunque en la dieta se halla en cantidades variables muy inferiores. El perfil de ácidos grasos de los quistes obtenidos tras la alimentación de los adultos con PHA, muestra porcentajes de 18:3n-3, 20:5n-3 y 16:0/16:1 similares a los hallados en la dieta (Figura 6.2). La alimentación de *Artemia* con POR aumenta el porcentaje de 16:0, 18:2n-6 y 20:4n-6 en la progenie de ambas poblaciones respecto a los quistes originales (Figura 6.3).

Tabla 6.1. Ácidos grasos más abundantes (% respecto al total de ácidos grasos) en los quistes de las distintas poblaciones de *Artemia* alimentadas con la mezcla de microalgas D/T, y en el propio alimento. Los datos se presentan como medias (desviación típica)(n=3).

	Ácido graso										
	D/T	ALG(D/T)	ING(D/T)	SJU(D/T)	CHI(D/T)	TUN(D/T)	HID(D/T)	PBL(D/T)	COL(D/T)		
16:0	25,5 (0,4)	12,5 (0,1)	12,9 (0,1)	14,9 (0,9)	11,3 (0,2)	13,0 (0,2)	13,1 (0,5)	12,7 (0,1)	14,2 (0,1)		
16:1n-9	10,1 (0,2)	1,4 (0,1)	1,8 (0,1)	2,0 (0,0)	1,3 (0,0)	1,6 (0,0)	1,0 (0,0)	1,2 (0,0)	1,5 (0,1)		
16:1n-7	1,8 (0,1)	2,7 (0,1)	2,3 (0,0)	3,3 (0,2)	2,2 (0,0)	3,1 (0,1)	2,9 (0,1)	1,7 (0,1)	5,3 (0,0)		
18:0	0,5 (0,2)	4,8 (0,0)	4,2 (0,0)	4,6 (0,4)	4,9 (0,1)	4,1 (0,0)	3,7 (0,1)	5,2 (0,1)	5,9 (0,0)		
18:1n-9	11,0 (1,0)	16,9 (0,1)	20,0 (0,3)	21,6 (0,2)	18,0 (0,4)	21,0 (0,0)	15,2 (0,3)	17,5 (0,1)	19,2 (0,1)		
18:1n-7	1,4 (0,1)	6,8 (0,0)	5,4 (0,2)	5,1 (0,1)	7,0 (0,1)	6,8 (0,2)	6,7 (0,4)	6,0 (0,1)	7,9 (0,0)		
18:2n-6	8,0 (0,9)	3,3 (0,1)	5,6 (0,1)	10,1 (0,1)	6,3 (0,1)	7,0 (0,0)	3,5 (0,1)	3,3 (0,0)	5,5 (0,1)		
18:3n-3	17,5 (2,8)	32,0 (0,2)	29,5 (0,4)	21,7 (0,2)	30,6 (0,4)	26,0 (0,2)	34,6 (0,4)	34,0 (0,3)	16,8 (0,1)		
20:4n-6	0,9 (0,1)	0,3 (0,3)	1,2 (0,0)	0,2 (0,0)	0,6 (0,0)	1,1 (0,0)	0,2 (0,0)	0,8 (0,1)	0,2 (0,0)		
20:5n-3	1,9 (0,5)	4,0 (0,2)	4,1 (0,1)	4,3 (0,0)	2,4 (0,0)	3,8 (0,1)	3,0 (0,3)	4,0 (0,1)	8,6 (0,1)		
16:0/16:1	2,3 (0,4)	3,0 (0,0)	3,2 (0,1)	2,8 (0,2)	3,2 (0,1)	2,7 (0,0)	3,4 (0,1)	4,3 (0,1)	2,1 (0,0)		

D/T: *Dunaliella* sp./ *Terraselmis suecica*; ALG: Algarrobo; ING: El Inglés; SJU: San Julián; CHI: Mar Chiquita; TUN: Las Tunas; HID: Hidalgo; PBL: Palos Blancos; COL: Caleta Olivia.

Tabla 6.2. Ácidos grasos más abundantes (% respecto al total) en los quistes de las distintas poblaciones de *Artemia* alimentadas con monocultivos de las microalgas POR y PHA, y en el propio alimento. Los datos se presentan como medias (desviación típica) (n=3).

Ácido graso	PHA		ALG(PHA)		ING(PHA)		POR		ALG(POR)		ING(POR)	
	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.
16:0	8,8	(1,6)	15,0	(1,2)	14,2	(0,3)	36,0	(1,5)	20,3	(0,2)	18,1	(0,4)
16:1n-9	4,6	(1,1)	nd		nd		4,0	(0,2)	nd		nd	
16:1n-7	12,5	(2,4)	24,0	(0,5)	25,1	(1,1)	7,9	(0,4)	15,2	(0,2)	12,2	(0,7)
18:0	0,7	(0,2)	5,3	(1,3)	4,3	(0,2)	0,9	(0,1)	4,0	(0,1)	4,9	(0,1)
18:1n-9	0,9	(0,4)	11,8	(0,1)	11,8	(0,4)	1,5	(0,6)	14,0	(0,1)	17,5	(0,2)
18:1n-7	0,6	(0,1)	9,2	(0,1)	10,0	(0,7)	0,8	(0,1)	7,1	(0,1)	8,2	(0,3)
18:2n-6	1,0	(0,2)	2,8	(0,0)	2,4	(0,3)	4,8	(0,2)	5,1	(0,1)	6,3	(0,1)
18:3n-3	0,3	(0,1)	0,5	(0,0)	0,7	(0,1)	1,2	(0,1)	4,8	(0,1)	4,7	(0,3)
20:4n-6	nd		0,5	(0,0)	0,4	(0,1)	11,6	(0,4)	7,4	(0,1)	8,2	(0,2)
20:5n-3	23,2	(1,5)	22,3	(0,2)	21,4	(0,9)	25,6	(0,8)	14,0	(0,5)	17,0	(0,5)
16:0/16:1	0,5	(0,0)	0,6	(0,1)	0,6	(0,0)	3,0	(0,1)	1,3	(0,0)	1,5	(0,1)

POR: *Porphyridium cruentum*; **PHA:** *Phaeodactylum tricornutum*; ALG: Algarrobo; ING: El Inglés.

En general, los porcentajes de 18:0, 18:1n-7 y 18:1n-9 están presentes en niveles marcadamente superiores en la descendencia en comparación con sus porcentajes en las microalgas. Asimismo, cuando en la dieta aumenta el porcentaje de 18:1n-7 se produce una disminución en la descendencia, y ocurre lo contrario con los niveles de 18:1n-9, que aumentan en la descendencia a medida que aumentan en el alimento. El 18:3n-3 se encuentra en cantidades muy variables en las tres dietas de fitoplancton y su proporción también varía de forma similar en los quistes emitidos por ambas poblaciones. El porcentaje de 16:1n-7 muestra valores muy superiores al hallado en la dieta POR y PHA, en la descendencia emitida por las hembras alimentadas con estas microalgas. El 20:5n-3, con contenidos muy moderados en la dieta D/T, se encuentra en niveles superiores en la descendencia. Lo contrario ocurre cuando se alimenta a las poblaciones con POR y PHA, donde el porcentaje de 20:5n-3 es superior al de la dieta D/T, y también provoca un aumento en los quistes. La menor proporción de 18:2n-6 se halla en los quistes emitidos por los animales alimentados con PHA, que es la microalga con menor contenido de este ácido graso. Curiosamente, la ausencia de 20:4n-6 en esta dieta, no llega a producir su desaparición en la progenie.

Por otro lado, el 16:0 está presente en la descendencia en porcentajes constantes. No obstante, se observa un ligero aumento en los quistes emitidos por las poblaciones alimentadas con POR, en comparación con los quistes originales. Aunque el porcentaje de 16:1n-7 varía en la descendencia en función de la dieta suministrada a las poblaciones, el cociente 16:0/16:1 no lo hace. Así, la dieta POR que presenta el cociente más elevado, da lugar a los quistes en los que se observan valores menores en dicha proporción.

Es de destacar que las poblaciones estudiadas (ING y ALG), con perfiles originales de ácidos grasos distintos, no muestran patrones específicos de variación en el perfil de ácidos grasos al ser alimentadas con diferentes dietas microalgales.

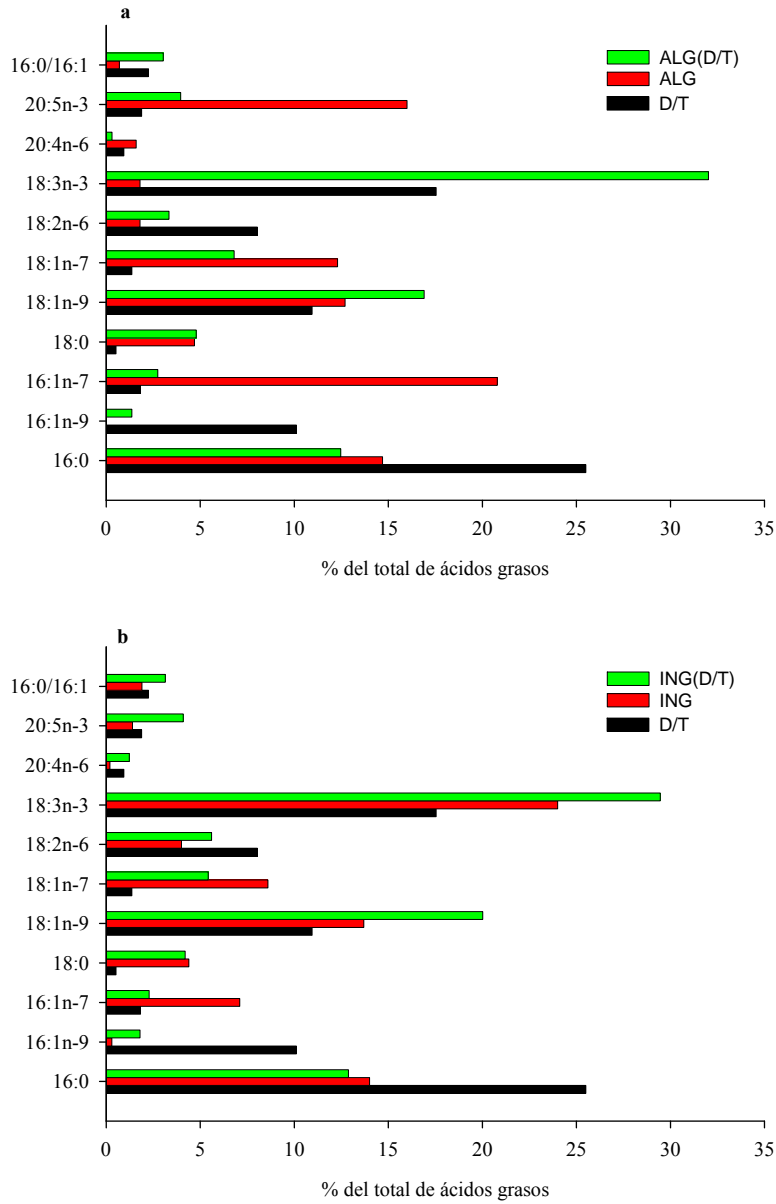


Figura 6.1. Ácidos grasos más abundantes (% respecto del total) en los quistes originales (ALG, ING), en la progenie (ALG(D/T), ING(D/T)), y en el alimento (D/T: *Dunaliella* sp./ *Tetraselmis suecica*) suministrado a las poblaciones de (a) ALG: Algarrobo y (b) ING: El Inglés.

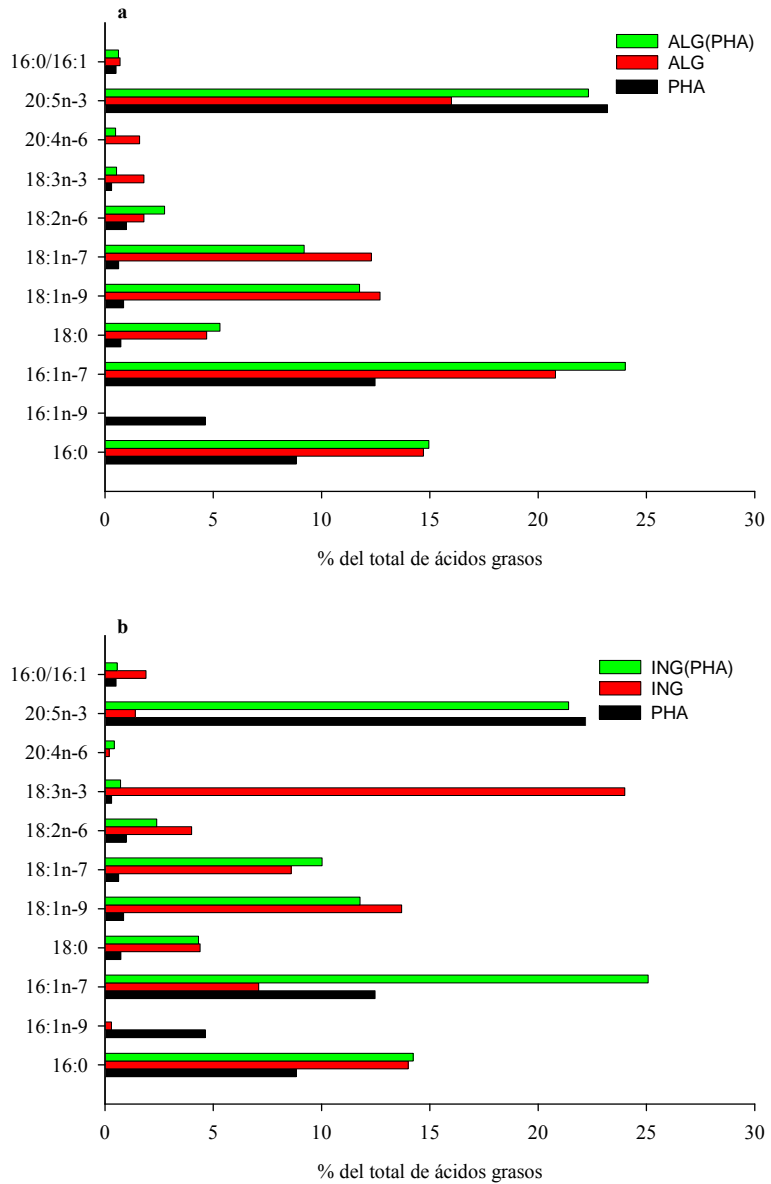


Figura 6.2. Ácidos grasos más abundantes (% respecto del total) en los quistes originales (ALG, ING), en la progenie (ALG(PHA), ING(PHA)), y en el alimento (PHA: *Phaeodactylum tricornutum*) suministrado a las poblaciones de (a) ALG: Algarrobo y (b) ING: El Inglés.

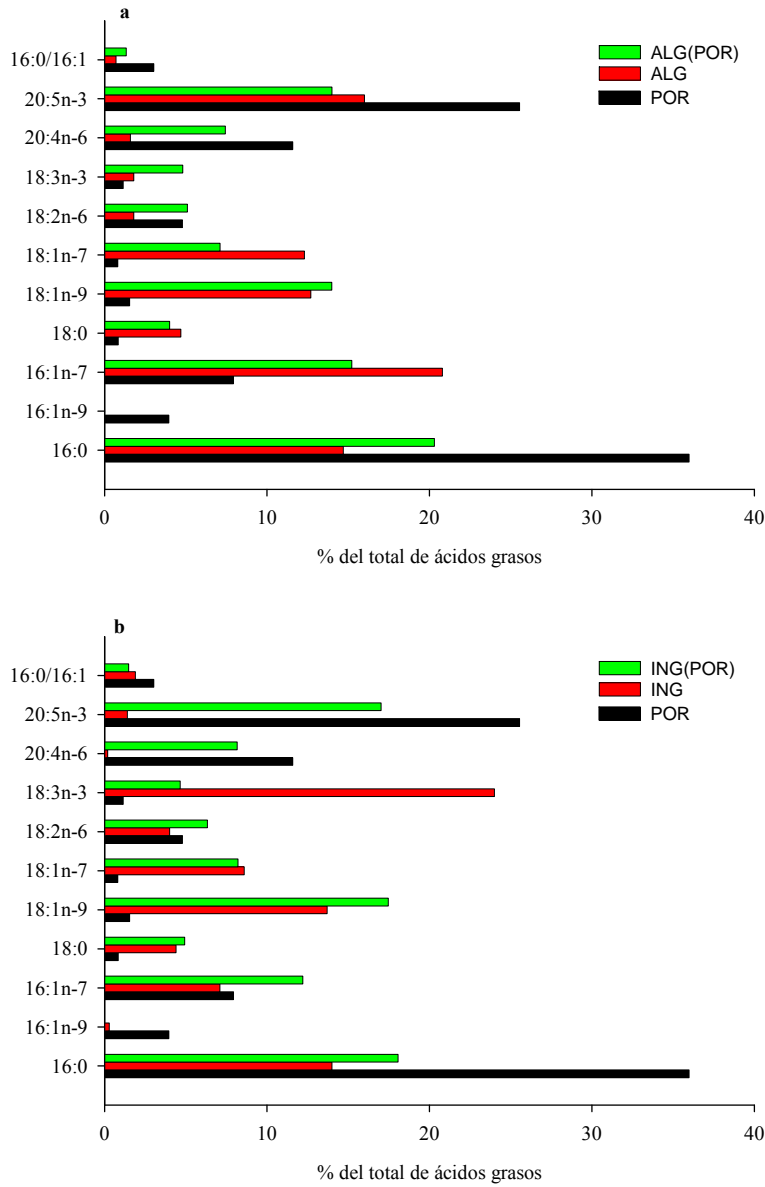


Figura 6.3. Ácidos grasos más abundantes (% respecto del total) en los quistes originales (ALG, ING), en la progenie (ALG(POR), ING(POR)), y en el alimento (POR: *Porphyridium cruentum*) suministrado a las poblaciones de (a) ALG: Algarrobo y (b) ING: El Inglés.

El análisis previo al PCA de los datos incluidos en las Tablas 6.1 y 6.2 mostró un valor de KMO de 0,68, excediendo el valor recomendado de 0,6. La prueba de Bartlett resultó estadísticamente significativa ($P=0,000$) asumiendo la factibilidad de la matriz de correlaciones para el PCA. Este reveló tres componentes con autovalores que exceden la unidad, y que explican respectivamente el 49, 16 y 12% de la varianza total. Siguiendo el criterio de extracción de factores según el *screeplot* de Cattell (1966), se decidió retener los dos primeros componentes, explicativos del 65% de la varianza total, para llevar a cabo los análisis posteriores.

La Tabla 6.3 muestra los coeficientes de los ácidos grasos en el primer y segundo componente, así como las comunalidades. Los ácidos grasos 16:1n-7, 18:3n-3, 20:5n-3, 18:1n-7, 18:1n-9 y la proporción 16:0/16:1 presentan los valores de comunalidad más elevados, lo que significa que explican la mayor parte de la varianza, y por lo tanto son los que mayor información aportan al analizar el gráfico de puntuaciones.

Tabla 6.3. Coeficientes de correlación de cada una de las variables originales con las componentes principales (PC1, PC2) y comunalidades.

<i>Ácido graso</i>	PC1	PC2	Comunalidad
16:0	-0,27	0,64	0,48
16:1n-9	0,68	0,18	0,50
16:1n-7	-0,96	0,00	0,92
18:0	-0,05	0,55	0,31
18:1n-9	0,70	0,47	0,72
18:1n-7	-0,82	-0,26	0,74
18:2n-6	0,64	0,36	0,54
18:3n-3	0,89	-0,35	0,92
20:4n-6	-0,34	0,61	0,49
20:5n-3	-0,83	0,29	0,77
16:0/16:1	0,88	0,07	0,77
Varianza explicada (%)	49,05	15,91	-

En la Figura 6.4 se representa el gráfico de puntuaciones donde se observa que las variables (ácidos grasos) muestran elevada correlación con el componente 1 (eje horizontal) y baja con el componente 2 (eje vertical). Las puntuaciones con signo positivo en el PC1 están representadas por: 16:1n-9, 18:1n-9, 18:2n-6, 18:3n-3 y 16:0/16:1, mientras que las variables 16:1n-7, 18:1n-7 y 20:5n-3 presentan valores negativos. Se interpreta, por lo tanto, que el PC1 define el carácter marino/dulceacuícola de las poblaciones. Los ácidos

grasos 16:0 y 20:4n-6, que son los que explican la varianza en menor proporción según su participación en los componentes resultantes del análisis (bajos niveles de comunalidad), son los que muestran mayor peso en el PC2 (Tabla 6.3).

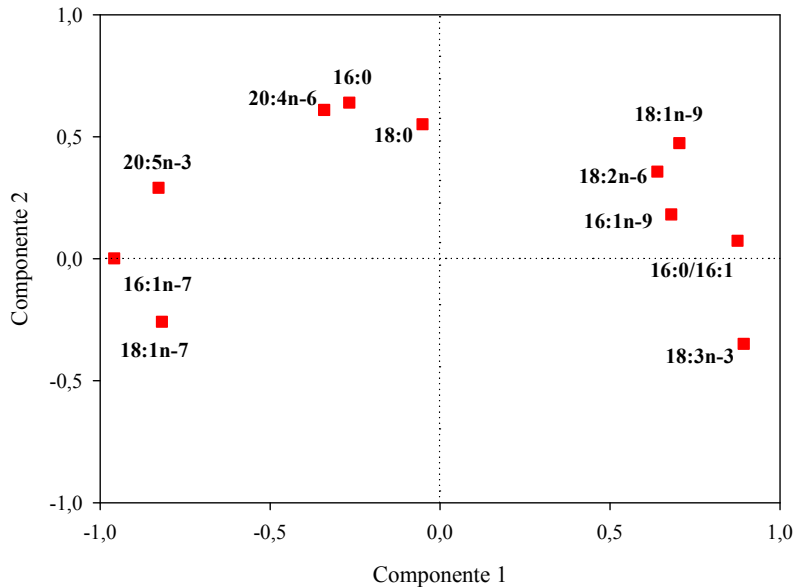


Figura 6.4. Gráfico de los coeficientes de las variables en los nuevos componentes principales.

Las puntuaciones de las observaciones respecto a los dos factores se representan gráficamente en la Figura 6.5. De este gráfico se deduce que la dieta de los progenitores modifica claramente el perfil de ácidos grasos de la descendencia. Así, los quistes obtenidos de las poblaciones alimentadas con D/T presentan un perfil de tipo dulceacuícola, con altos contenidos de 18:3n-3, 16:1n-9, 18:2n-6, 18:1n-9 y 16:0/16:1, y estas poblaciones aparecen agrupadas con las poblaciones que en origen presentaban este perfil. Por el contrario, los quistes procedentes de animales alimentados con POR y PHA muestran mayores niveles de los ácidos grasos 18:1n-7, 16:1n-7 y 20:5n-3, y se encuentran junto a las poblaciones originalmente de tipo marino. Es notable la desviación que se produce hacia la parte superior del eje vertical del gráfico correspondiente a las puntuaciones de las poblaciones alimentadas con el alga POR, debido a que presentan una mayor proporción en los niveles de 20:4n-6 (Figura 6.5). El análisis de la varianza (ANOVA) de las puntuaciones de los

factores revela diferencias significativas entre los grupos en ambos componentes (PC1: $F=39,46$, $P=0,000$; PC2: $F=18,88$, $P=0,000$). La prueba de comparación múltiple de medias confirma la separación de cuatro grupos en el primer componente y de dos grupos (quistes POR diferenciados del resto) en el segundo.

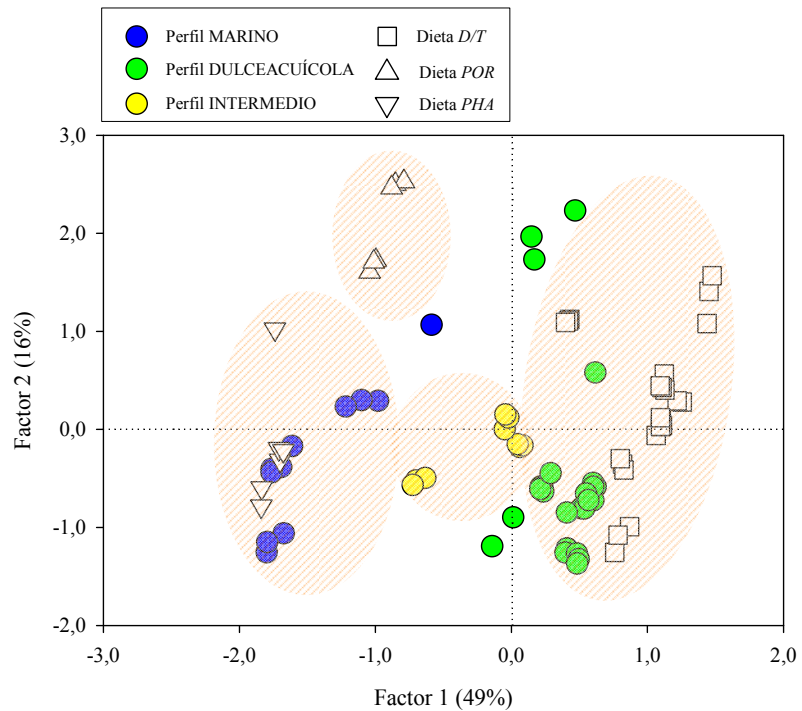


Figura 6.5. Gráfico de puntuaciones de los objetos en los nuevos componentes principales. Los quistes originales se representan con círculos de colores y los quistes obtenidos en laboratorio con triángulos y cuadrados en blanco. (D/T: *Dunaliella* sp./*Tetraselmis suecica*; PHA: *Phaeodactylum tricornutum*; POR: *Porphyridium cruentum*).

6.3.2. Supervivencia, periodos de vida y variables reproductivas

La supervivencia durante el periodo prerreproductivo (Figura 6.6) muestra una clara diferencia en función de la dieta suministrada a las poblaciones. La dieta mixta (D/T) produce supervivencias alrededor del doble que la dieta basada en un monocultivo de diatomeas (PHA).

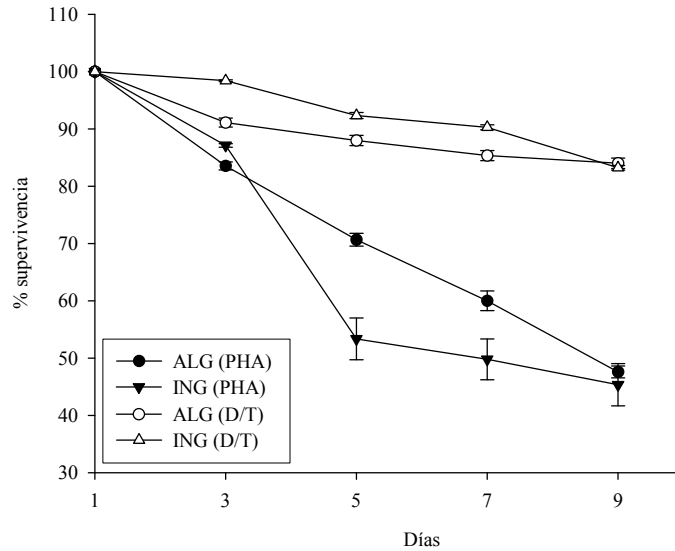


Figura 6.6. Supervivencia (porcentaje respecto del número inicial de individuos en la experiencia) durante el periodo prerreproductivo de las hembras de las poblaciones Algarrobo (ALG) y El Inglés (ING) en función de la dieta suministrada (D/T: *Dunaliella* sp./ *Tetraselmis suecica*; PHA: *Phaeodactylum tricornutum*). Los valores representan medias y las barras de error son desviaciones típicas (n=5).

La población ALG presenta un aumento significativo de 1 d en el periodo prerreproductivo cuando se alimenta con PHA (Tabla 6.4, Figura 6.7a). Por otro lado, no se encuentran diferencias significativas en la duración del periodo reproductivo y la longevidad de las hembras pertenecientes a ambas poblaciones, que muestran un comportamiento similar al variar la dieta (interacción, Tabla 6.4; Figura 6.7b, c).

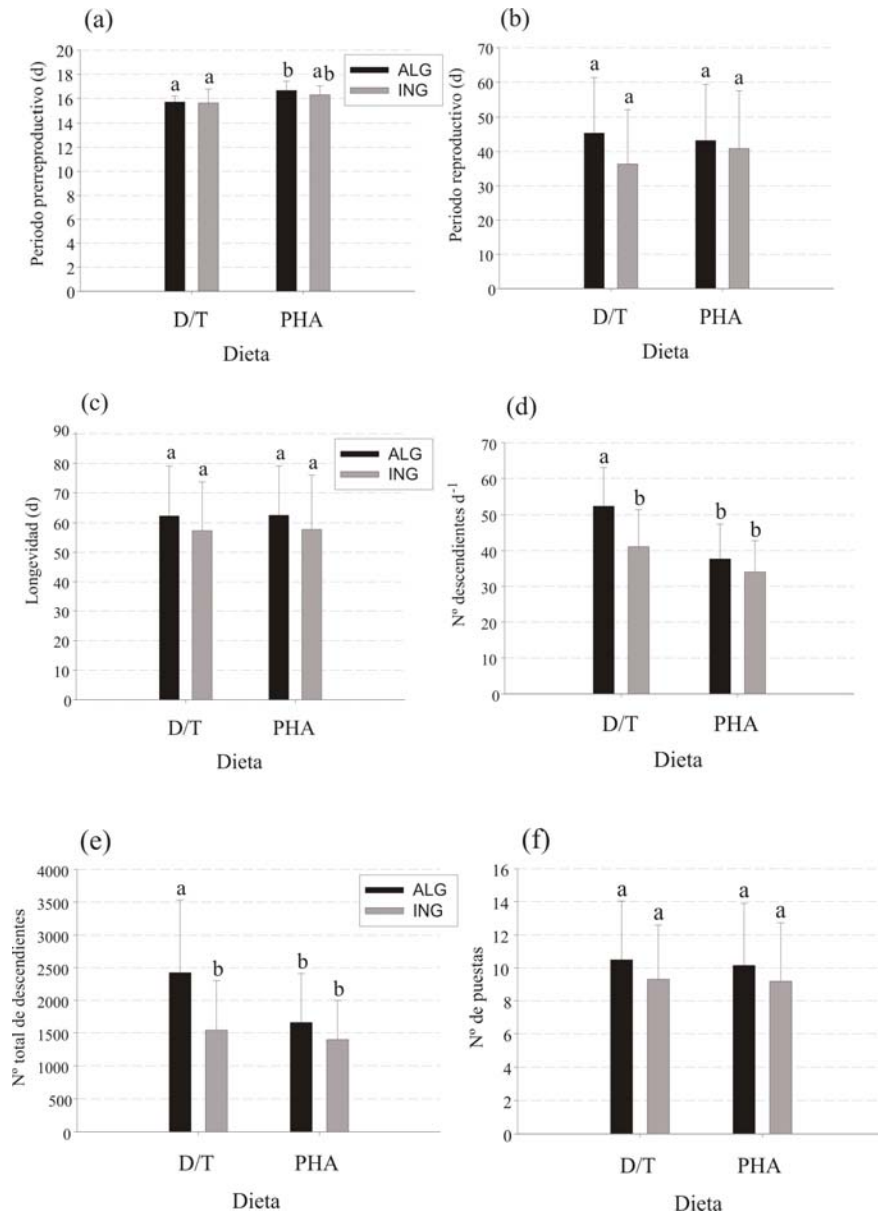
Tabla 6.4. Nivel de significación de los diferentes ANOVAs de dos factores realizados sobre los periodos de vida. Los valores $P \leq 0,05$ indican que las medias son significativamente diferentes.

Variables	Factores		
	POBLACIÓN	DIETA	POBLACIÓN*DIETA
Periodo prerreproductivo	0,569	0,002	0,010
Periodo reproductivo	0,324	0,842	0,710
Longevidad	0,299	0,708	0,785

La tasa diaria de reproducción y el número de descendientes producidos por hembra (Figura 6.7d, e) alcanzan los valores máximos en los animales alimentados con D/T. Tal y como se observa en la Tabla 6.5, hay un efecto significativo de la dieta y de la población sobre la tasa diaria de reproducción y número de descendientes por hembra, de manera que estos parámetros disminuyen en ALG cuando se emplea PHA como alimento. Aunque la prueba de Tukey no demostró diferencias significativas en la población ING alimentada con ambas dietas, los valores medios de la tasa diaria de reproducción y de los descendientes por hembra fueron siempre inferiores en los animales alimentados con PHA que en los alimentados con D/T. El número de puestas fue similar para ambas poblaciones y la dieta microalgal suministrada a los cultivos no influyó en este parámetro (Figura 6.7f).

El número de descendientes por puesta en relación a la dieta es distinto en las dos poblaciones (ver interacciones en Tabla 6.5; Figura 6.7g). Esta variable presenta su máximo valor cuando la población ALG se alimenta con D/T. Sin embargo, la población ING presenta valores similares en el número de descendientes por puesta para ambas dietas. El ANOVA mostró un efecto de la dieta sobre el intervalo entre puestas de las poblaciones, sin que el análisis *a posteriori* demostrara diferencias significativas en ALG. No obstante, los valores medios señalan un aumento del intervalo entre puestas en los animales alimentados con PHA respecto a aquellos alimentados con D/T.

La cantidad de descendencia en forma de quistes (ovípara) (Figura 6.7i) y en forma de nauplios (ovovivípara) (Figura 6.7j) no varía entre las poblaciones, aunque sí lo hace entre dietas (Tabla 6.5). Se observa un notable aumento ($\approx 40\%$) en el porcentaje de quistes emitidos por las hembras alimentadas con la dieta PHA en comparación con una alimentación basada en D/T y, paralelamente, este aumento se traduce en una disminución de la descendencia naupliar.



(Continúa en la página siguiente)

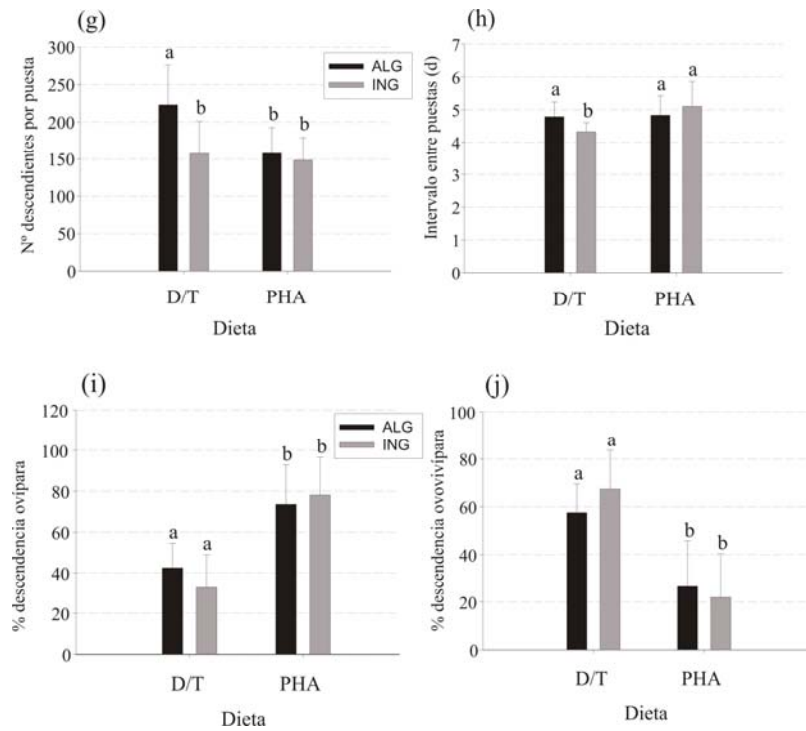


Figura 6.7. Periodo prerreproductivo (a), periodo reproductivo, (b), longevidad (c), tasa diaria de reproducción (d), descendencia total (e), número de puestas (f), descendencia por puesta (g), intervalo entre puestas (h), descendencia ovípara (i) y descendencia ovovivípara (j) de las hembras, calculado para las dos poblaciones de *Artemia* en función de la dieta. Las abreviaturas se explican en la Figura 6.6. Los valores representan medias y las barras de error son desviaciones típicas (n=20). Los tratamientos que comparten una misma letra en cada figura no son significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

Tabla 6.5. Nivel de significación de los diferentes ANOVAs de dos factores realizados sobre las variables reproductivas. Los valores $P \leq 0,05$ indican que las medias son significativamente diferentes.

Variables	Factores		
	POBLACIÓN	DIETA	POBLACIÓN*DIETA
Descendencia por puesta	0,000	0,000	0,003
Tasa diaria de reproducción	0,001	0,000	0,086
Descendencia total por hembra	0,002	0,014	0,088
Intervalo entre puestas	0,298	0,001	0,002
Número de puestas	0,169	0,765	0,886
% Descendencia ovípara	0,766	0,000	0,430
% Descendencia ovovivípara	0,170	0,000	0,792

En el resumen del análisis CCA (Tabla 6.6) se muestra la pérdida y el ajuste del modelo por cada conjunto de variables en cada dimensión. Los valores de pérdida y ajuste informan de cuánto se ajusta la solución del análisis a la asociación entre los conjuntos. El valor de ajuste máximo es siempre el número de dimensiones (2 en este caso) y en la tabla se obtiene 1,673 y, por lo tanto, indica un buen ajuste de la solución. La pérdida media por dimensiones revela un valor moderado (0,323). Los autovalores (0,947 y 0,726) muestran una distribución de cargas de explicación de la varianza superior en la dimensión 1 que en la 2.

Tabla 6.6. Resumen del análisis canónico de correlaciones.

		Dimensión		Suma
		1	2	
Pérdida	Conjunto 1	0,053	0,269	0,323
	Conjunto 2	0,053	0,278	0,332
	Media	0,053	0,274	0,327
Autovalor		0,947	0,726	
Ajuste				1,673

La tabla de saturaciones en los componentes (Tabla 6.7) muestra las correlaciones de cada una de las variables demográficas y bioquímicas (ácidos grasos) originales con el primer par de variables canónicas (primera variable canónica demográfica y primera variable canónica bioquímica), respectivamente. Las dos primeras variables canónicas predicen un incremento del periodo prerreproductivo, del intervalo entre puestas y de la descendencia ovípara cuando en la dieta

Tabla 6.7. Correlaciones de las variables demográficas y bioquímicas originales con el primer par de variables canónicas.

Variables originales	Dimensión	
	1	2
	Primer par de variables canónicas	
Demográficas	Primera variable canónica demográfica	
Supervivencia (SUP)	0,912	-0,032
Periodo prerreproductivo (PPR)	-0,345	0,254
Periodo reproductivo (PR)	0,074	0,330
Longevidad (L)	0,004	0,435
Descendencia por puesta (DPP)	0,369	-0,141
Tasa diaria de reproducción (TDR)	0,482	-0,270
Descendencia total por hembra (DT)	0,251	0,049
Intervalo entre puestas (IEP)	-0,399	0,290
Número de puestas (NP)	0,020	0,182
Descendencia ovípara (DO)	-0,646	-0,390
Descendencia ovovivípara (DV)	0,645	0,390
Bioquímicas	Primera variable canónica bioquímica	
16:0	0,906	0,112
16:1n-9	0,964	0,070
16:1n-7	-0,937	0,189
18:0	-0,077	0,560
18:1n-9	0,966	-0,027
18:1n-7	0,101	-0,161
18:2n-6	0,955	-0,063
18:3n-3	0,952	-0,056
20:4n-6	0,436	-0,272
20:5n-3	-0,946	0,166
16:0/16:1	0,863	0,028

hay elevados porcentajes de 20:5n-3 y 16:1n-7. Cuando en la dieta predominan los ácidos grasos insaturados C18 se produce una mayor supervivencia durante el periodo prerreproductivo y una mayor descendencia ovovivípara. Estas tendencias se observan en los diferentes signos de los coeficientes de correlación.

El gráfico de saturaciones (Figura 6.8) representa las cargas de las componentes para variables simples en el espacio de las dos dimensiones. El gráfico de puntuaciones (Figura 6.9) ilustra las muestras analizadas (ING y ALG) en relación al primer par de variables canónicas, en el que se observa una clara distribución de las poblaciones en función de la dieta suministrada. El estudio comparado

de las dos figuras indica que cuando las poblaciones se alimentan con PHA (rica en 20:5n-3 y 16:1n-7), presentan un aumento en el periodo prerreproductivo (PPR), intervalo entre puestas (IEP) y porcentaje de descendencia enquistada (DO). Por el contrario, si la dieta suministrada es D/T (con alto contenido en 18:2n-6 y 18:3n-3), se produce un descenso en las citadas variables demográficas y aumentan otras como la supervivencia (SUP), tasa diaria de reproducción (TDR) y descendencia ovovivípara (DV).

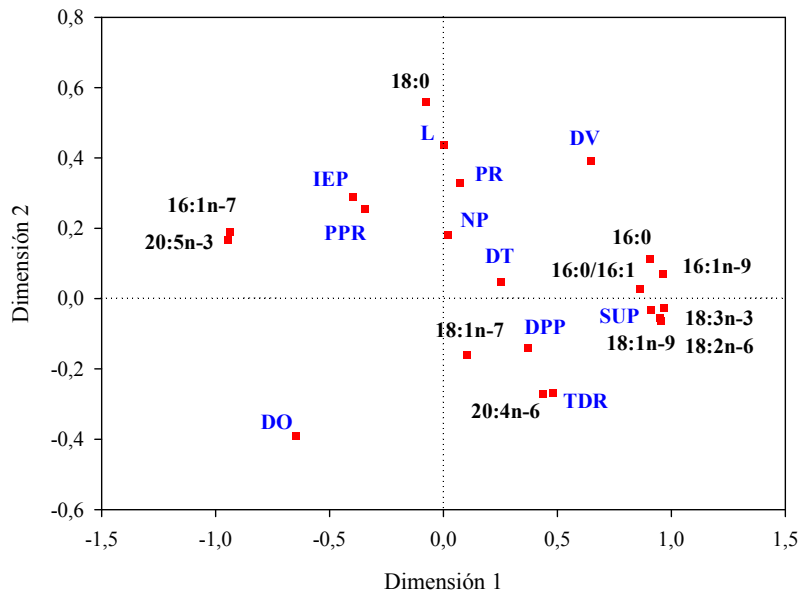


Figura 6.8. Gráfico de saturaciones en componentes. (SUP: supervivencia; PPR: periodo prerreproductivo; PR: periodo reproductivo; L: longevidad; DPP: descendencia por puesta; TDR: tasa diaria de reproducción; DT: descendencia total por hembra; IEP: intervalo entre puestas; NP: número de puestas; DO: descendencia ovípara; DV: descendencia ovovivípara.

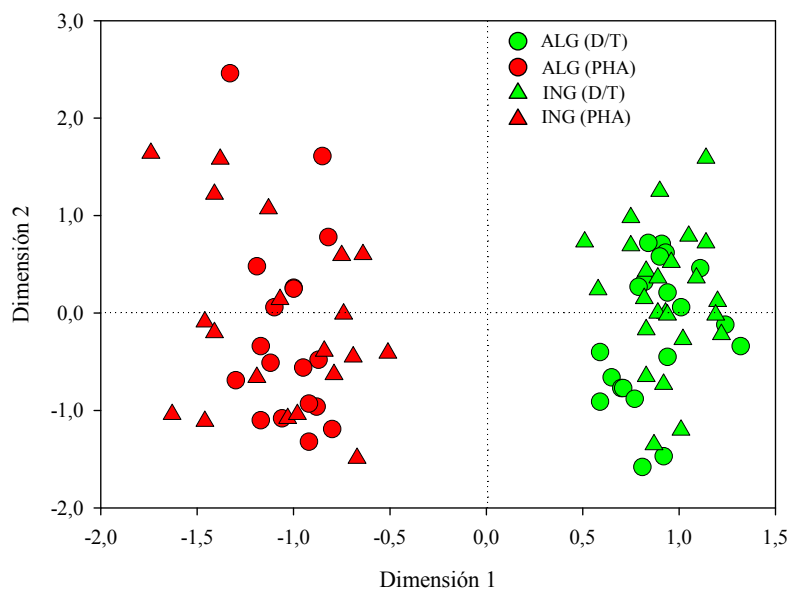


Figura 6.9. Localización de las poblaciones de *Artemia* estudiadas en el espacio definido por el primer par de variables canónicas. El color verde indica la alimentación de las poblaciones con D/T: *Dunaliella* sp./*Tetraselmis suecica* y el rojo con PHA: *Phaeodactylum tricornerutum*. Los círculos corresponden a la población ALG: Algarrobo y los triángulos a la población ING: El Inglés.

6.4 DISCUSIÓN

Las poblaciones de *Artemia* crecieron y se desarrollaron con éxito tanto en el cultivo mixto *Dunaliella* sp. / *Tetraselmis suecica* (D/T) como en los monocultivos de *Porphyridium cruentum* (POR) y *Phaeodactylum tricornerutum* (PHA). Aunque la composición en ácidos grasos de las especies microalgales puede depender de algunos factores fenotípicos, los cultivos se llevaron a cabo bajo similares condiciones ambientales y se pueden identificar determinados patrones en cada una de ellas. Así, una dieta basada en la combinación D/T muestra un perfil caracterizado por porcentajes particularmente elevados de 16:1n-9, 18:1n-7/n-9, 18:2n-6 y 18:3n-3, mientras que POR presenta porcentajes más altos de 16:0, 20:4n-6 y 20:5n-3, y PHA destaca por su alto contenido en 16:1n-7 y 20:5n-3.

A pesar de que, en general, la composición en ácidos grasos de quistes de *Artemia* refleja el perfil de ácidos grasos de la dieta

(Figura 6.5), se puede establecer un perfil propio en las poblaciones tras un análisis detallado de las modificaciones inducidas por el alimento. Así, los nuevos quistes no varían su composición en 16:0, 18:0, 18:1n-7 y 18:1n-9 de acuerdo al perfil de la dieta. Lavens y cols. (1989) y Navarro (1990) también observaron que el porcentaje de 16:0 en los quistes no reflejaba el de la dieta suministrada a los progenitores. En el presente estudio, cuando las poblaciones de *Artemia* se alimentan con POR, los niveles de 18:0 y 18:1n-9 en la descendencia se mantienen en torno a los mismos valores que los de las muestras originales, incluso aumentan en el caso del 18:1n-9, a pesar de que en la dieta están presentes en muy bajos porcentajes (0,9%). Lo mismo sucede cuando la dieta suministrada es PHA. Estos resultados están en la línea de los hallados por Hinchcliffe y Riley (1972) quienes establecieron que los niveles de ácidos grasos saturados de los nauplios *Artemia* son casi constantes y bastante independientes del perfil de sus dietas. Por otro lado, aunque el monoeno 18:1n-9 aumenta ligeramente en los quistes cuando se encuentran elevados niveles en la dieta, se podría afirmar que *Artemia* es capaz de sintetizarlo cuando escasea en el alimento.

Navarro y Amat (1992) hallaron que altos porcentajes de 18:2n-6 en la dieta (*T. suecica*) producen menores niveles de lo esperado en la descendencia de *Artemia*. Aquí se hallan resultados diferentes al de estos autores ya que una mayor cantidad de este ácido graso en la dieta no modifica prácticamente su porcentaje en los quistes. Además, cuando el 18:2n-6 está presente en muy bajas cantidades en el alimento (PHA), los quistes muestran también un descenso (Tablas 6.1 y 6.2). A la luz de estos resultados podría interpretarse que la disminución de 18:2n-6 en los quistes procedentes de las poblaciones alimentadas con PHA es consecuencia de la síntesis de 20:4n-6, ya que este ácido graso no se halla en dicha dieta y sin embargo aparece en los quistes.

Elevados niveles de 20:5n-3 en el alimento suministrado a las poblaciones de *Artemia* se reflejan en altos niveles en los quistes emitidos por éstas. No obstante, cuando las poblaciones se alimentan con una dieta pobre en 20:5n-3, como es el caso de D/T (1,9%), los quistes emitidos por las hembras presentan ciertas cantidades (3-4%) de este ácido graso. Estos resultados concuerdan con los de Navarro y Amat (1992) y sugieren la capacidad de *Artemia* para sintetizar 20:5n-3 a partir de 18:3n-3 (Schauer y Simpson, 1985). En este sentido, la población de Caleta Olivia, una de las halladas más al sur del país, difiere de las demás por presentar niveles superiores de 20:5n-3 cuando se emplea D/T como alimento (Tabla 6.1). Los quistes de esta población mantienen prácticamente constantes los porcentajes de

20:5n-3 y de 18:3n-3 respecto a su composición original, sugiriendo posibles diferencias en el metabolismo lipídico de esta población respecto del resto de poblaciones. El 20:5n-3 puede indicar una alimentación de *Artemia* basada en diatomeas cuando se halla en elevadas proporciones (más del 15%) en los quistes emitidos por las hembras. Sin embargo, no puede ser utilizado como un único indicador cuando se comparan dietas microalgales igualmente ricas en este ácido graso (por ejemplo, PHA y POR). En general, el uso de un solo ácido graso como biomarcador puede resultar problemático para la identificación de la dieta consumida por *Artemia*, especialmente en ecosistemas tan conspicuos como los hipersalinos, por lo que debe acudir al análisis de varios ácidos grasos, como se estableció en el Capítulo 4.

El análisis multivariante de componentes principales (PCA) realizado en este estudio permitió integrar muchas variables (ácidos grasos) y determinar cómo los cambios simultáneos en éstas afectan al resultado final del experimento. En definitiva, permitió una reducción de los datos y una interpretación más objetiva de los resultados. El PCA desvela una clara separación entre las diversas muestras de quistes de *Artemia* tras la alimentación de los adultos con diferentes dietas microalgales. Independientemente del perfil marino/dulceacuícola original de las poblaciones y de la especie considerada (*A. persimilis/A. franciscana*), la composición en ácidos grasos de los quistes refleja, en parte, la composición de la dieta. Los quistes de las poblaciones originales presentan perfiles opuestos (Capítulo 4): tipo marino, como ALG (con alto porcentaje de 20:5n-3 y bajo de 18:3n-3, con una proporción de 16:0/16:1 \approx 1) y tipo dulceacuícola como ING (con bajos niveles de 20:5n-3, altos de 18:3n-3 y con un cociente 16:0/16:1 \approx 2). Tras la alimentación de las mismas con D/T, se observa un cambio en el perfil de los nuevos quistes emitidos por las hembras hacia un patrón de tipo dulceacuícola, con un aumento en el porcentaje de 16:1n-9, 18:1n-9, 18:2n-6, 18:3n-3 y en la relación 16:0/16:1. Sin embargo, cuando la dieta utilizada es POR o PHA, los quistes reflejan un claro perfil de tipo marino, con un aumento en los niveles de 16:1n-7, 18:1n-7, 20:4n-6 y 20:5n-3, siendo la dieta POR la que mayor porcentaje de 20:4n-6 aporta a la descendencia. La influencia del tipo de alimento sobre la composición de ácidos grasos de la descendencia de *Artemia* ya fue puesta de manifiesto por Lavens y cols. (1989) mediante el uso de dieta inerte y por Navarro y Amat. (1992) y Zhukova y cols. (1998), quienes utilizaron alimento vivo. Aunque estos autores observaron una correlación entre el porcentaje de ácidos grasos en la dieta y el de la descendencia de *Artemia*, no llegaron a evidenciar un

cambio en el perfil original de los quistes de tipo marino a dulceacuícola, y viceversa. Adicionalmente, los resultados hallados en el presente estudio permiten inferir la dieta consumida por las poblaciones originales de *Artemia* en sus hábitats naturales (Capítulo 4). Así, aquellas con perfil de tipo marino se habrían alimentado preferentemente de diatomeas (PHA) y algas rojas (POR), las de tipo dulceacuícola, de algas verdes (D/T) y las de tipo intermedio, de una mayor diversidad microalgal.

Como ya se vio en el Capítulo 5, el análisis molecular de las poblaciones de *A. persimilis* reveló una gran diversidad de haplotipos. Tanto aquellas que presentan diferente haplotipo como las que comparten uno similar (ALG e ING), producen una descendencia con el mismo perfil de ácidos grasos en respuesta a la dieta suministrada a la generación parental. Esto indica que la plasticidad fenotípica de *Artemia* determina su perfil de ácidos grasos en cultivos de laboratorio, y corrobora hasta cierto punto la ausencia de correlación entre los perfiles marino/dulceacuícola de *Artemia* y estos marcadores moleculares mitocondriales.

D'Abramo (1979) sugirió la transferencia de ácidos grasos de forma estable a través de la cadena trófica acuática, y señaló que el contenido de ácidos grasos del fitoplancton puede determinar su calidad como alimento para el zooplancton. Tanto en los ambientes dulceacuícolas como en los marinos hay evidencias de que ciertos PUFAs son compuestos esenciales que pueden limitar la productividad del zooplancton (Jónasdóttir y cols., 1995; Müller-Navarra, 1995). Así, por ejemplo, las cianobacterias se consideran un alimento de mala calidad (Gulati y DeMott, 1997) en comparación con las diatomeas y flagelados. Esta baja calidad se ha relacionado con las diferencias en su composición de ácidos grasos (Ahlgren y cols., 1990). Mientras que en copépodos son muchos los estudios que relacionan la abundancia de ciertos PUFAs en el alimento con el éxito reproductivo de las poblaciones (Shin y cols., 2003; Broglio y cols., 2003; Arendt y cols., 2005), las referencias en *Artemia* son muy escasas. La mayoría de estudios se enfocan desde un punto de vista pragmático, para su uso en acuicultura (Johnson, 1980; Watanabe y cols., 1980), sin contemplar los aspectos más básicos que pueden afectar a los requerimientos nutricionales de *Artemia* para su mayor éxito reproductivo.

La capacidad de una especie para proliferar en un determinado ambiente se relaciona principalmente con aquellos factores que puedan limitar su reproducción. Cuando las poblaciones de *A. persimilis* (ING y ALG) se alimentaron con el monocultivo de

diatomeas (PHA), frente a una alimentación basada en la dieta mixta (D/T), la supervivencia y la tasa reproductiva de las hembras disminuyó, mientras que el tiempo que tardaron en alcanzar la madurez sexual aumentó. Por lo tanto, se puede considerar que una dieta mixta es de mejor calidad para *Artemia* que un monocultivo de diatomeas. La explicación a este hecho puede residir en varias causas: que las diatomeas posean un bajo valor nutritivo; que sean tóxicas para los crustáceos por la alta producción de aldehídos (Miralto y cols., 1999), o bien que la naturaleza silicea de la frústula de estas microalgas cause una menor eficiencia de absorción del alimento, dando lugar a situaciones de estrés nutricional en las poblaciones.

En primer lugar, los factores que determinan el valor nutritivo de las microalgas son su composición bioquímica (ácidos grasos, aminoácidos, vitaminas, carbohidratos etc.) y los requerimientos nutricionales del animal que se alimenta de ellas. Por otro lado, los efectos tóxicos de las diatomeas fueron puestos de manifiesto por varios autores en estudios de alimentación de copépodos (Miralto y cols., 1999; Ianora y cols., 2004). Sin embargo, Jones and Flynn (2005) llegaron a la conclusión de que las diatomeas no son tóxicas *per se*, sino que una alimentación basada en un único cultivo con estas microalgas es inadecuada, debido a que presentan carencias nutricionales. La ausencia de determinados componentes esenciales en la dieta, como ciertos ácidos grasos, podrían afectar negativamente a la supervivencia y reproducción de las poblaciones de *Artemia*. De hecho, Shin y cols. (2003) observaron una disminución en el número de descendientes de copépodos cuando la dieta suministrada presentaba bajos porcentajes de ácidos grasos esenciales como el 18:4n-3 y 22:6n-3. Otros autores como Fábregas y cols. (1998) sugieren que el perfil bioquímico (proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos grasos) de las microalgas es el que afecta al crecimiento y reproducción de *Artemia* como ya se ha evidenciado mediante el uso de otras dietas (D'Agostino, 1980; Johnson, 1980; Fábregas y cols., 1996). No obstante, estos autores no encuentran relaciones directas entre el contenido de PUFAs n-3 y el crecimiento, supervivencia y reproducción de las poblaciones. En los resultados aquí presentados, la supervivencia y tasa reproductiva de *Artemia* se correlacionan con altos niveles de 18:2n-6 y 18:3n-3, y bajos porcentajes de 20:5n-3 y 16:1n-7 en la dieta. Por el contrario, el periodo prerreproductivo está inversamente relacionado con el porcentaje de 18:2n-6 y 18:3n-3 y directamente con los niveles de 16:1n-7 y 20:5n-3 en la dieta. En este sentido se puede considerar que cuando los animales son alimentados con dietas que presentan bajos porcentajes de C18, estos parecen ser los limitantes para conseguir una mayor supervivencia y tasa

reproductiva de las poblaciones. Sin embargo, no se puede descartar que otros compuestos bioquímicos diferentes a los ácidos grasos afecten significativamente a la reproducción de *Artemia*.

Existen algunas referencias sobre la inducción en *Artemia* de uno u otro tipo de reproducción (ovovivíparo/ovíparo) en relación a las características del ambiente donde habita (Browne y cols., 1984; Hontoria, 1990). Sin embargo, no se encuentran citas en la literatura que relacionen el tipo de reproducción de las poblaciones con el tipo de alimento suministrado a las mismas. Los resultados hallados en este estudio indican que *A. persimilis* supera niveles del 70% de descendencia enquistada cuando se alimenta con el monocultivo de diatomeas. Se sabe que en condiciones críticas para la supervivencia las hembras tienden a reproducirse ovíparamente. Por lo tanto, el aumento en el porcentaje de quistes refleja una situación de estrés que puede ser debida a la baja digestibilidad de estas microalgas por *Artemia* ya que ésta no posee un aparato masticador, como los rotíferos (mástax), que le facilite romper adecuadamente las frústulas de las diatomeas. De hecho, el oviparismo viene muy condicionado por niveles subóptimos en la disponibilidad de alimento, y teniendo en cuenta que tanto la dieta D/T como PHA fueron administradas *ad libitum*, la explicación más probable es que *Artemia* asimile de forma menos eficiente una dieta basada en diatomeas. Aún así, debe considerarse que no se han realizado estudios en los que se demuestre una correlación entre la ausencia de determinados PUFAs en el alimento y el aumento del oviparismo en *Artemia* y, por lo tanto, ésta sería otra posibilidad más a tener en cuenta.

Como ya se ha comentado, tanto la población ALG, de tipo marino, como ING, de tipo dulceacuícola, presentan el mismo haplotipo (Capítulo 5). Sin embargo, reflejan diferencias en la tasa reproductiva, siendo ALG superior a ING. Por consiguiente, los resultados aquí presentados, aunque señalan que los distintos parámetros reproductivos están directamente relacionados con el tipo de alimento suministrado a las poblaciones, indican que no sería descartable un componente genético, no detectado mediante los marcadores moleculares mitocondriales.

De todos los resultados hallados en este capítulo se desprenden una serie de conclusiones que pueden contribuir a esclarecer algunos aspectos propios de la biología y ecología de *Artemia*. En los biotopos hipersalinos donde habitan estos crustáceos el alga *Dunaliella* sp. es la más conspicua, aunque también aparece una gran variedad de otros grupos fitoplanctónicos como diatomeas o cianofíceas. La biodiversidad microalgal disminuye conforme

aumenta la salinidad (Davis y Giordano, 1996), de forma que en ecosistemas de baja salinidad se encontrarán algas de adscripción marina (diatomeas y flagelados), mientras que a salinidades mayores predominarán las clorofíceas como *Dunaliella* sp., cianofíceas y diversos grupos de halobacterias aeróbicas (Javor, 1989; Oren y cols., 1992). En función de las especies microalgales que abunden en los biotopos donde habita *Artemia*, los quistes reflejarán un determinado perfil de ácidos grasos. No obstante, no puede descartarse un efecto genotípico propio de cada especie y de cada población que contribuya a la variabilidad lipídica hallada en los quistes producidos por ellas. Por otro lado, en condiciones de laboratorio se ha evidenciado un oviparismo inducido por la alimentación de *Artemia* basado en un cultivo de diatomeas. En la naturaleza *Artemia* encuentra una mayor diversidad de alimento microparticulado, no comparable a los monocultivos realizados en laboratorio. Sin embargo, un aumento de la salinidad en los ecosistemas hipersalinos naturales podría causar un descenso en la disponibilidad de alimento en el seston y, como consecuencia, una búsqueda de alimentación alternativa por *Artemia* sobre el sedimento donde se acumulan diatomeas. En tal caso, se vería favorecida la reproducción ovípara frente a la ovovivípara, y los quistes emitidos presentarían una mayor proporción de 20:5n-3.

CAPÍTULO 7

EFFECTO DE LA TEMPERATURA DE CULTIVO SOBRE LA COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE *Artemia*

7.1. INTRODUCCIÓN

Los crustáceos anostráceos, que habitan biotopos acuáticos muy inestables, tienen gran capacidad para adaptarse a un amplio rango de variaciones ambientales. El género *Artemia* está adaptado a vivir en ecosistemas hipersalinos costeros o de interior, relativamente aislados, como salinas, lagunas y lagos salados. Todos estos biotopos tan heterogéneos se caracterizan por presentar diferentes parámetros ecológicos, dependiendo del clima local (desde subhúmedo-húmedo a árido, Vanhaecke y cols., 1987), de la altitud (desde 50 m por debajo del nivel del mar hasta 4500 m, Xin y cols., 1994) y de una composición iónica de las salmueras muy diversa.

De entre las poblaciones de *Artemia* hasta ahora halladas, las adaptadas a vivir en los rangos más bajos de temperatura proceden del Tibet (China). Se han descrito unas 16 localizaciones en la Meseta Qinghai-Tibet (Xin y cols., 1994; Zheng, 1997), ecosistemas caracterizados por su gran altitud (hasta 4990 m) y por presentar temperaturas medias anuales entre -5 y 1°C. En Argentina pueden encontrarse poblaciones de *Artemia* viviendo desde los 18-20°C de temperatura media anual en la región de la Llanura Chaco-Pampeana (Amat y cols., 2004) hasta temperaturas inferiores a 8-9°C en la región de la Meseta Patagónica (Medina y cols., 2007).

Las especies de *Artemia* autóctonas de Argentina están distribuidas en función de su adaptación a las diferentes condiciones ambientales de sus biotopos (Medina y cols., 2007). Las poblaciones empleadas en el presente estudio proceden de la Laguna Mar Chiquita (*A. franciscana*) y de las Salinas Grandes de Hidalgo (*A. persimilis*) localizadas al norte del paralelo 36°S y al sur de 37°10'S, respectivamente. En la Laguna de Mar Chiquita se registran temperaturas medias anuales de 20°C mientras que en las Salinas Grandes de Hidalgo, predomina un clima más frío, con temperaturas que oscilan alrededor de los 14-16°C (Quirós y Dragó, 1999). Se han encontrado evidencias (Medina y cols., 2007) de que las poblaciones de *A. persimilis* se adaptan mejor a bajas temperaturas que las poblaciones de *A. franciscana* halladas en Argentina que, por el contrario, presentan un mayor rango de tolerancia a temperaturas más altas. Esto daría explicación a la distribución de las dos especies en Argentina, donde *A. franciscana* se distribuye por el norte mientras que *A. persimilis* aparece confinada al sur del país.

Las diferencias en las condiciones ambientales producen adaptaciones genéticas en los organismos y, consecuentemente, diferentes respuestas fisiológicas (Kinne, 1970). La aclimatación de

los animales poiquiloterms a bajas temperaturas ambientales se asocia con un incremento de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) en las membranas lipídicas celulares (Pruitt, 1990). Aquellas membranas que contienen mayores cantidades de PUFAs son más fluidas a bajas temperaturas, permitiendo su actividad biológica. En general, el grado de insaturación de los ácidos grasos en los crustáceos está inversamente relacionado con la temperatura ambiental (Farkas, 1979). De hecho, el análisis realizado por Ruiz y cols. (datos sin publicar) sobre la composición de ácidos grasos de las poblaciones de *Artemia* procedentes de Tibet (Tabla 7.1), adaptadas a climas de muy baja temperatura, revela su elevado porcentaje en ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) de cadena larga (HUFAn-3).

Tabla 7.1. Ácidos grasos más abundantes (porcentaje del total de ácidos grasos) de los quistes procedentes de Tibet. Los datos se presentan como medias (desviación típica) (n=3).

Ácido graso	Lagkor Co	Gaize	Jingyu
16:0	9,3 (0,0)	9,7 (0,2)	9,4 (0,1)
16:1n-9	0,6 (0,0)	nd -	0,2 (0,1)
16:1n-7	22,9 (0,1)	27,7 (0,3)	18,4 (0,1)
18:0	3,4 (0,0)	3,2 (0,0)	4,3 (0,1)
18:1n-9	16,1 (0,1)	14,5 (0,2)	16,9 (0,1)
18:1n-7	12,0 (0,1)	11,1 (0,1)	12,4 (0,2)
18:2n-6	2,2 (0,0)	1,6 (0,0)	1,9 (0,1)
18:3n-3	2,9 (0,1)	1,2 (0,0)	2,9 (0,1)
20:4n-6	2,9 (0,0)	2,3 (0,0)	0,8 (0,0)
20:5n-3	17,4 (0,1)	18,9 (0,1)	18,7 (0,6)
16:0/16:1	0,4 (0,0)	0,4 (0,0)	0,5 (0,0)
Total	94,9 (0,1)	95,3 (0,1)	92,6 (0,2)
Saturados	14,5 (0,0)	14,7 (0,3)	17,3 (0,1)
Monoinsaturados	52,0 (0,0)	54,0 (0,3)	48,6 (0,6)
Poliinsaturados	28,5 (0,1)	26,5 (0,3)	26,7 (0,5)
n-3	22,2 (0,0)	21,5 (0,2)	22,6 (0,9)
n-6	5,3 (0,0)	4,1 (0,1)	3,3 (0,1)
HUFAn-3	17,7 (0,1)	19,3 (0,2)	19,1 (1,0)
HUFAn-6	3,0 (0,0)	2,4 (0,0)	0,9 (0,0)

n-3: ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) n-3; n-6: PUFAs n-6; HUFAn-3: PUFAs n-3 de 20 o más carbonos; HUFAn-6: PUFAs n-6 de 20 o más carbonos.

Farkas y Herodek (1959, 1964) investigaron la composición de ácidos grasos en crustáceos de agua dulce y observaron un incremento gradual de los HUFAs con el descenso de la temperatura de cultivo. Este hecho está ampliamente demostrado en peces, cuya respuesta a bajas temperaturas se traduce en un aumento de los HUFAs en la fracción de lípidos polares (Bell y cols., 1986; Hazel y cols., 1992; Calabretti y cols., 2003; Skalli y cols., 2006). La temperatura es, pues, uno de los factores responsables de las diferencias en la composición de ácidos grasos de los organismos acuáticos y, aunque este hecho ha sido ampliamente documentado para numerosos animales poiquiloterms como peces, cladóceros de agua dulce y copépodos marinos (Farkas, 1979; Farkas y cols., 1981, 1984, 1988), las implicaciones sobre *Artemia* se desconocen.

Como ya se ha comentado, la distribución de *A. franciscana* y *A. persimilis* en Argentina parece estar limitada por el rango de temperatura dominante en sus biotopos. Así, *A. persimilis* habita ecosistemas habitualmente fríos, mientras que *A. franciscana* es una especie que se halla en biotopos de temperaturas más suaves. Como respuesta fisiológica adaptativa sería de esperar que el perfil lipídico de las poblaciones reflejara la temperatura del medio donde habitan. Por lo tanto, la composición de ácidos grasos de *A. persimilis* debería mostrar un porcentaje de insaturación en sus ácidos grasos mayor que *A. franciscana* cuando es sometida a temperaturas de cultivo similares a las de sus hábitats naturales.

La caracterización bioquímica de los quistes originales de *A. persimilis* y *A. franciscana* ha revelado una gran variabilidad en el perfil lipídico hallándose poblaciones tanto de tipo marino como de tipo dulceacuícola (Watanabe y cols., 1978a), sin encontrar una clara correlación entre estos fenotipos y las características ambientales de los ecosistemas donde habitan (Capítulo 4). Los factores determinantes del perfil de ácidos grasos en la naturaleza pueden ser múltiples y, por lo tanto, las experiencias en laboratorio resultan de gran ayuda a la hora de identificar la contribución de cada uno de ellos por separado. Así, en el Capítulo 6 se demostró que la dieta suministrada a las poblaciones determina en gran medida el perfil de ácidos grasos de los quistes hasta el punto de hacerlo variar de tipo marino a dulceacuícola o viceversa. Sin embargo, queda por esclarecer si la temperatura, al igual que se ha observado en la mayoría de animales poiquiloterms, también influye de manera significativa en la composición de ácidos grasos de *Artemia*, y hasta qué punto se puede considerar como otro de los factores que afectan al perfil lipídico de las poblaciones.

Diversos autores han señalado variaciones en la composición de ácidos grasos durante los primeros estadios de desarrollo de *Artemia* (Navarro y cols., 1991, Vismara y cols., 2003). El estudio comparativo del perfil de ácidos grasos entre las poblaciones adultas y los quistes emitidos por estas, resultaría de gran interés en la determinación de posibles factores metabólicos sobre su composición lipídica. La variación en la composición de ácidos grasos de las poblaciones en respuesta a diferentes condiciones de temperatura puede resultar un buen indicador para determinar cambios energéticos y metabólicos en las poblaciones adultas de *Artemia* que, por otro lado, pueden verse reflejados en el perfil de ácidos grasos de la descendencia.

El objetivo del presente capítulo es el estudio del efecto de la temperatura de cultivo, en condiciones controladas de laboratorio, sobre los niveles de PUFAs en dos especies de *Artemia* (*A. franciscana* y *A. persimilis*) adaptadas a vivir en diferentes condiciones climáticas en la naturaleza.

7.2. MATERIAL Y MÉTODOS

7.2.1. Diseño experimental

Se utilizaron las poblaciones argentinas de *A. franciscana* procedente de la Laguna de Mar Chiquita (CHI) y de *A. persimilis* procedente de las Salinas Grandes de Hidalgo (HID). La localización y características de los biotopos se han referido en el Capítulo 4.

A las 48 h de la eclosión (0,1 g de quistes deshidratados de cada una de las poblaciones en estudio), se recogieron los nauplios y se trasvasaron a recipientes de 4 l de capacidad, dotados de aireación individualizada. Los cultivos se mantuvieron durante 48 h en una cámara termostatzada a 24°C, con fotoperiodo de 12:12 h luz:oscuridad. Siguiendo el procedimiento esquematizado en la Figura 7.1, se aislaron tres lotes por especie, con una concentración de 100 nauplios l⁻¹, en un volumen total de 4 l para cada lote. Los lotes de cada población se mantuvieron a 28°, 24° y 18°C, respectivamente, en diferentes cámaras termostatzadas y con el mismo fotoperiodo (12:12 h luz:oscuridad). Cuando los individuos presentaron los primeros signos de diferenciación sexual (en las hembras se observaban los primeros indicios de desarrollo del ovisaco y en los machos las antenas en forma de tenazas), se separaron en tres replicados de 45 parejas por tratamiento (temperatura).

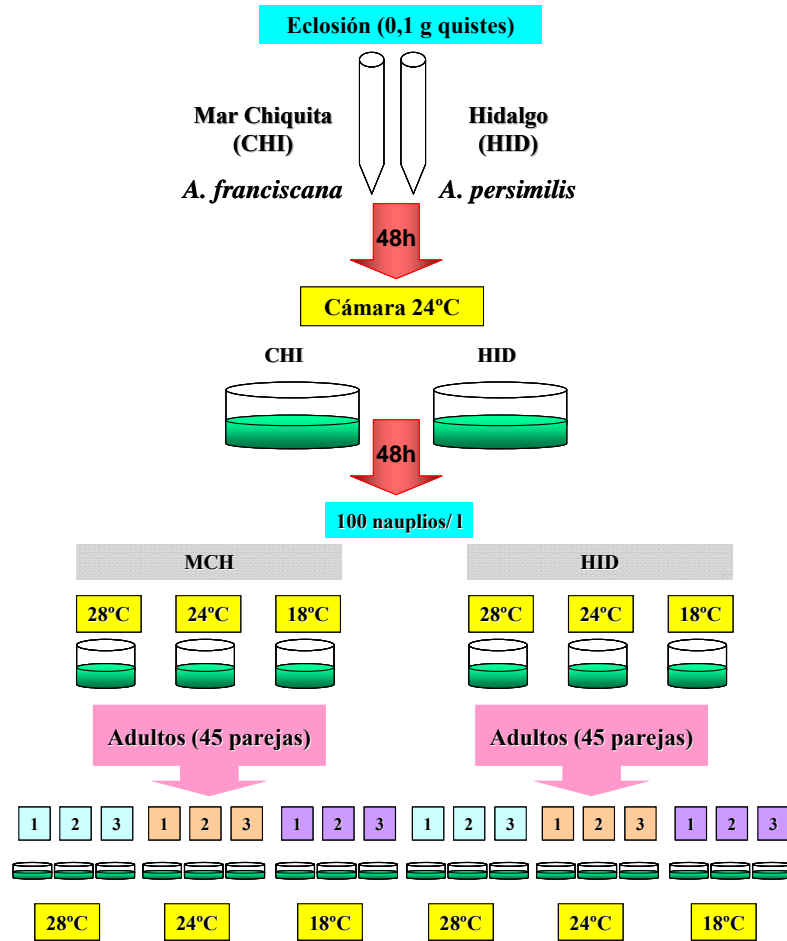


Figura 7.1. Esquema del procedimiento seguido en los experimentos de temperatura con las poblaciones de *A. franciscana* y *A. persimilis*.

Los animales adultos se alimentaron durante cuatro meses con cultivos microalgales de *Dunaliella* sp. mantenidos a $21 \pm 1^\circ\text{C}$ en dos tanques a salinidades de 70 y 110 g l^{-1} , respectivamente. Estos stocks de *Dunaliella* sp. sirvieron para aumentar la salinidad en el medio de cultivo de *Artemia* de 70 g l^{-1} al inicio hasta 110 g l^{-1} a lo largo de la experiencia, con tal de inducir el oviparismo en las poblaciones. La concentración de microalgas se mantuvo en torno a $6 \times 10^5 \pm 0,5 \times 10^5$ céls ml^{-1} , renovando medio microalgal nuevo en los cultivos de *Artemia* cada 48 h.

Cuando la presencia de pequeñas acumulaciones de quistes en las paredes de los recipientes y/o flotando en la superficie era evidente, se procedía a su recolección por filtración. Los quistes se aislaron de los detritos y de los especímenes adultos mediante tamices de luz de malla adecuada. Una vez procesados, se almacenaban en salmuera (250 g l^{-1}) hasta el final del experimento, momento en el que se concentraron sobre una malla de $100 \mu\text{m}$, se lavaron con agua destilada y se secaron en la estufa a 39°C durante 24 h, antes de proceder a su análisis.

Una vez finalizada la experiencia se recogieron las biomásas de especímenes adultos a través de una malla de luz de 1 mm, se lavaron con agua destilada, se escurrieron eliminando el agua intersticial, se congelaron a -80°C y se liofilizaron, manteniéndose en estas condiciones hasta el análisis posterior.

A partir de las muestras de quistes descapsulados y biomásas, se procedía a la extracción de los lípidos totales (Apartado 3.4.1), sobre los que, más tarde, se analizaron los ácidos grasos mediante el procedimiento descrito en los Apartados 3.4.2 y 3.4.3.

Con una periodicidad de una vez cada dos o tres semanas se recolectaban muestras del cultivo microalgal proporcionado como alimento a las poblaciones, y se analizaban (Apartado 3.4.1) para observar si la composición de ácidos grasos del alimento suministrado se mantenía estable a lo largo de la experiencia. La Tabla 7.2 muestra el porcentaje medio de los ácidos grasos más abundantes detectados en el cultivo de *Dunaliella* sp. a lo largo del experimento, así como sus coeficientes de variación.

Tabla 7.2. Ácidos grasos más abundantes (porcentaje del total de ácidos grasos) en *Dunaliella* sp. empleada como alimento para los experimentos de temperatura en *Artemia*. Las medias corresponden a un total de 6 muestreos (n=6).

Ácido graso	Media (dt)	CV
16:0	15,3 (1,5)	10,1
16:1n-9	9,3 (0,8)	8,2
18:0	1,0 (0,1)	7,0
18:1n-9	1,5 (0,3)	17,1
18:1n-7	2,7 (0,3)	11,6
18:2n-6	4,7 (0,4)	8,7
18:3n-3	33,9 (2,8)	8,1
Saturados	19,4 (1,1)	5,6
Monoinsaturados	13,6 (0,6)	4,2
Poliinsaturados	55,1 (0,9)	1,7
n-3	50,5 (1,2)	2,3
n-6	4,1 (0,5)	11,3

n-3: ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs)
n-3; n-6: PUFAs n-6; dt: desviación típica;
CV: coeficiente de variación.

7.2.2. Análisis estadísticos

Con el fin de establecer las posibles diferencias en el porcentaje de ácidos grasos presentes en los quistes y en las biomasas debidas a la especie considerada y a la temperatura de cultivo, se realizó un ANOVA de dos vías para cada una de las variables, tanto en los datos de los quistes como en las biomasas. La asunción de homogeneidad de las varianzas se contrastó mediante la prueba de Levene (Sokal y Rohlf, 1995), y en el caso de cumplirse, se aplicó la prueba de Tukey como test *a posteriori* para contrastar la igualdad de medias. Cuando las varianzas no eran homogéneas se aplicó la prueba de Games-Howell (Sokal y Rohlf, 1995) para la comparación de medias.

Los porcentajes de los ácidos grasos palmítico (16:0), esteárico (18:0), palmitoleico (16:1n-7), *cis*-7-hexadecenoico (16:1n-9), *cis*-vaccénico (18:1n-7), oleico (18:1n-9), linoleico (18:2n-6), linolénico (18:3n-3), araquidónico (20:4n-6), eicosapentaenoico (20:5n-3), y la proporción 16:0/16:1 detectados en quistes y biomasas se incluyeron como variables en dos análisis respectivos de

componentes principales (PCA, ver detalles del análisis en el Apartado 3.6), que establece nuevas variables, y permite estudiar las diferencias interespecíficas entre los tratamientos a diferentes temperaturas (28°, 24 y 18°C) en ambos grupos. Antes de proceder al PCA se comprobó la idoneidad de los datos mediante el método Kaiser-Meyer-Olkin (KMO) (Kaiser, 1970, 1974) y la prueba de Bartlett (Bartlett, 1954). En el análisis se detallan los valores de comunalidades, que indican las variables que ofrecen mayor información en la representación bidimensional. Las nuevas variables (o componentes principales) medidas en cada una de las poblaciones se compararon mediante ANOVA de una vía (Sokal y Rohlf, 1981) y posterior prueba de comparación múltiple de Tukey.

La normalidad de todas las variables se comprobó previamente con la prueba de Kolmogorov y Smirnov (Sokal y Rohlf, 1981). Aquellas variables que no cumplieran con el supuesto de normalidad se transformaron mediante el arcoseno ($\arcsin \sqrt{\text{var}x/100}$).

7.3. RESULTADOS

7.3.1. Quistes

Los porcentajes de ácidos grasos hallados en los quistes de *A. franciscana* y *A. persimilis* se muestran en la Figura 7.2. El análisis estadístico (Tabla 7.3) revela un efecto significativo de la especie ($P \leq 0,05$), de la temperatura de cultivo ($P \leq 0,05$) y de la interacción de ambos factores ($P \leq 0,05$) sobre el porcentaje de la mayoría de ácidos grasos analizados en los quistes. El test *a posteriori* realizado sobre los valores de 18:3n-3, 18:1n-9 y 18:2n-6 halló diferencias significativas entre *A. franciscana* y *A. persimilis* a 18° y a 24°C (Figura 7.2). Respecto al porcentaje de 16:1n-7, 16:1n-9 y 20:5n-3 tan sólo se hallaron diferencias entre ambas especies a la temperatura de 18°C. A esta temperatura los quistes de *A. franciscana* presentan un menor contenido de 18:3n-3 y mayor de 20:5n-3 que los de *A. persimilis*. En cuanto a los porcentajes de 16:0 y 18:0 se hallaron diferencias significativas entre ambas especies en las tres temperaturas de cultivo.

La prueba de Tukey mostró diferencias significativas ($P \leq 0,05$) en los porcentajes de 18:3n-3 y 20:5n-3 en los quistes de *A. franciscana* para las tres temperaturas de cultivo. Los quistes pertenecientes a esta especie presentan un aumento y un descenso significativo en el porcentaje de 18:3n-3 y 20:5n-3, respectivamente, al pasar de 24° a 28°C (Figura 7.2). Sin embargo, en *A. persimilis* se

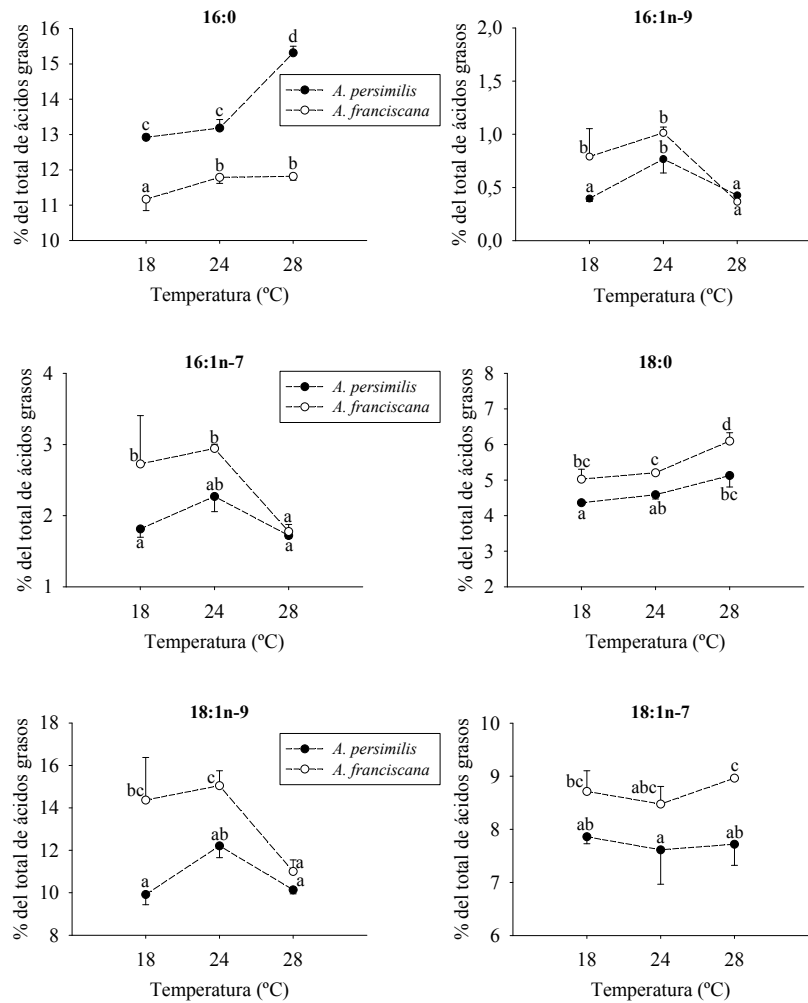
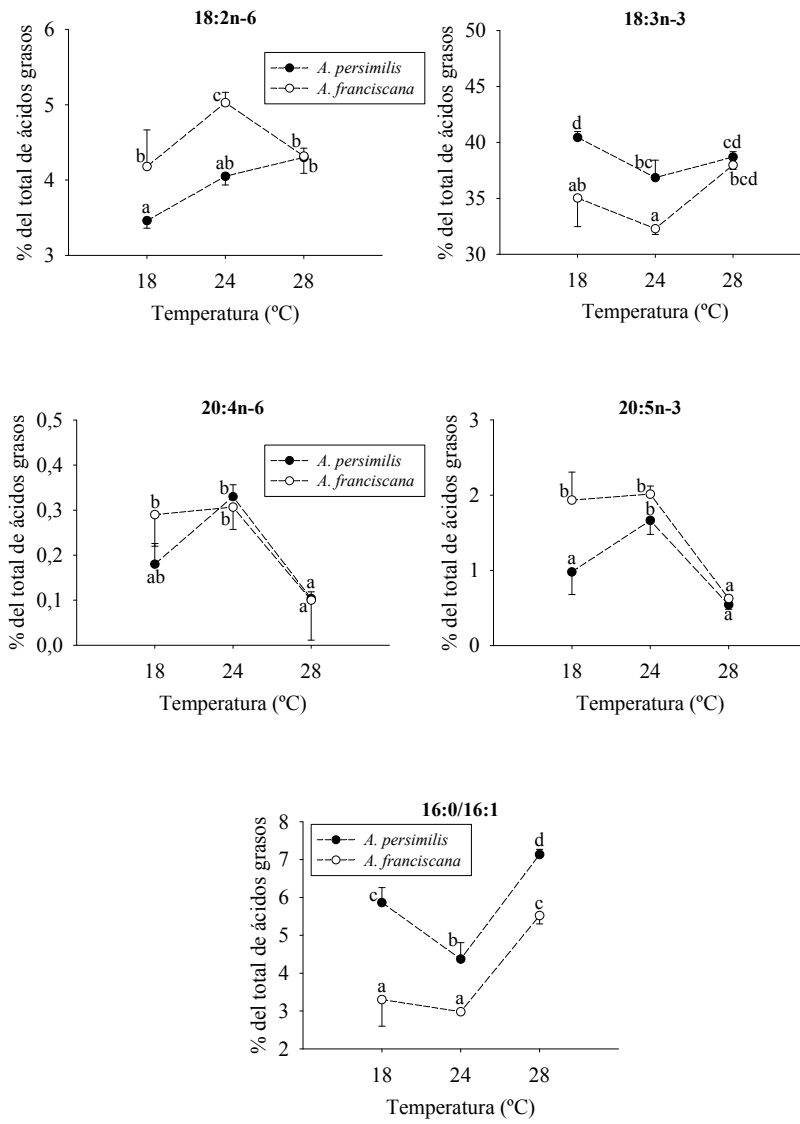


Figura 7.2. Ácidos grasos más abundantes (porcentaje del total de ácidos grasos) en los quistes emitidos por *A. franciscana* y *A. persimilis* cultivadas a 18°, 24° y 28°C. Los valores son medias y las barras de error representan desviaciones típicas (n=3). Para ambas especies, los puntos de muestreo que comparten una misma letra no son significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).



(Continuación de la Figura 7.2)

Tabla 7.3. Nivel de significación del ANOVA de dos vías aplicado sobre el porcentaje de ácidos grasos de quistes de las especies *A. persimilis* y *A. franciscana*, considerando las tres temperaturas experimentales (28°, 24° y 18°C). La interacción entre los factores se muestra como especie x temperatura. Las probabilidades estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$) se resaltan en negrita.

16:0	Especie	0,000
	Temperatura	0,000
	Especie x Temperatura	0,000
16:1n-9	Especie	0,005
	Temperatura	0,000
	Especie x Temperatura	0,008
16:1n-7	Especie	0,001
	Temperatura	0,000
	Especie x Temperatura	0,059
18:0	Especie	0,000
	Temperatura	0,000
	Especie x Temperatura	0,430
18:1n-9	Especie	0,000
	Temperatura	0,000
	Especie x Temperatura	0,016
18:1n-7	Especie	0,000
	Temperatura	0,386
	Especie x Temperatura	0,627
18:2n-6	Especie	0,000
	Temperatura	0,001
	Especie x Temperatura	0,012
18:3n-3	Especie	0,000
	Temperatura	0,001
	Especie x Temperatura	0,019
20:4n-6	Especie	0,841
	Temperatura	0,002
	Especie x Temperatura	0,316
20:5n-3	Especie	0,001
	Temperatura	0,000
	Especie x Temperatura	0,014
16:0/16:1	Especie	0,000
	Temperatura	0,000
	Especie x Temperatura	0,058

produce un descenso de 18:3n-3 y un aumento de 20:5n-3 cuando la temperatura se incrementa de 18° a 24°C. Tanto en *A. franciscana* como en *A. persimilis* se observa un descenso significativo en los porcentajes de ácidos grasos saturados con la disminución de la temperatura. En cambio, los niveles de ácidos grasos monoinsaturados aumentan con el descenso de la temperatura en *A. franciscana* mientras que en *A. persimilis* se mantienen constantes.

El análisis previo al PCA de los porcentajes de ácidos grasos hallados en los quistes mostró un valor de KMO de 0,70, excediendo el valor recomendado de 0,60. La prueba de Bartlett resultó estadísticamente significativa ($P=0,000$) asumiendo la factibilidad de la matriz de correlaciones para el PCA. Éste reveló tres componentes con autovalores mayores que 1, explicando el 62, 23 y 10% de la varianza, respectivamente. Siguiendo el criterio de extracción de factores según el *screeplot* de Cattell (1966) se decidió retener los dos primeros componentes, explicativos del 85% de la varianza, para llevar a cabo los análisis posteriores. La Tabla 7.4 recoge los coeficientes de los ácidos grasos en el primer y segundo componente calculado, así como las comunalidades. En general todos los ácidos grasos presentan valores de comunalidad elevados, lo que significa que tienen un alto poder explicativo de la varianza.

Tabla 7.4. Coeficientes de correlación de cada una de las variables originales con las componentes principales (PC1, PC2) y comunalidades.

Ácido graso	PC1	PC2	Comunalidad
16:0	-0,50	-0,57	0,57
16:1n-9	0,97	-0,02	0,95
16:1n-7	0,97	0,12	0,95
18:0	-0,24	0,91	0,89
18:1n-9	0,95	0,27	0,97
18:1n-7	0,11	0,90	0,82
18:2n-6	0,55	0,49	0,54
18:3n-3	-0,89	-0,35	0,92
20:4n-6	0,88	-0,24	0,83
20:5n-3	0,98	-0,05	0,96
16:0/16:1	-0,94	-0,24	0,93
Varianza explicada (%)	61,91	22,90	-

El gráfico de coeficientes (Figura 7.3) revela la elevada correlación de la mayoría de ácidos grasos con el PC1. Este componente presenta las variables con mayor peso específico, excepto el 18:0 y 18:1n-7, que tienen mayor peso en el PC2. Los diferentes signos hallados en cada una de las variables estudiadas indican que las correlaciones entre los distintos ácidos grasos son opuestas, así, en el PC1, los porcentajes de 16:0, 18:0, 18:3n-3 y 16:0/16:1 y los de 16:1n-7/n-9, 18:1n-7/n-9, 20:5n-3 y 20:4n-6, están inversamente relacionados.

En el gráfico de puntuaciones de los objetos respecto a los dos factores (Figura 7.4) se observan diferentes grupos en función de la especie considerada. Los quistes de *A. franciscana* están asociados a mayores porcentajes de 18:0, 18:1n-7 y 18:2n-6 mientras que los de *A. persimilis* muestran mayores proporciones de 16:0 y 18:3n-3. A su vez, los quistes de *A. franciscana* obtenidos a 18° y 24°C muestran un perfil de ácidos grasos más parecido entre sí que al de los obtenidos a 28°C. Sin embargo, en *A. persimilis*, los perfiles de los quistes obtenidos a 28° y 18°C guardan más semejanza entre ellos. A pesar de estas diferencias, se evidencia que en ambas especies, los quistes obtenidos a 28° y 24°C presentan mayores niveles de 16:0, 18:0, 18:3n-3, y menores niveles de 16:1, 18:1n-9, 20:4n-6 y 20:5n-3, respectivamente.

Los resultados del ANOVA de una vía sobre las puntuaciones de los objetos revelaron diferencias significativas entre las tres temperaturas ($F=19,87$, $P<0,05$) en el PC1 (Figura 7.4), y entre especies en el PC2 ($F=49,98$, $P<0,05$).

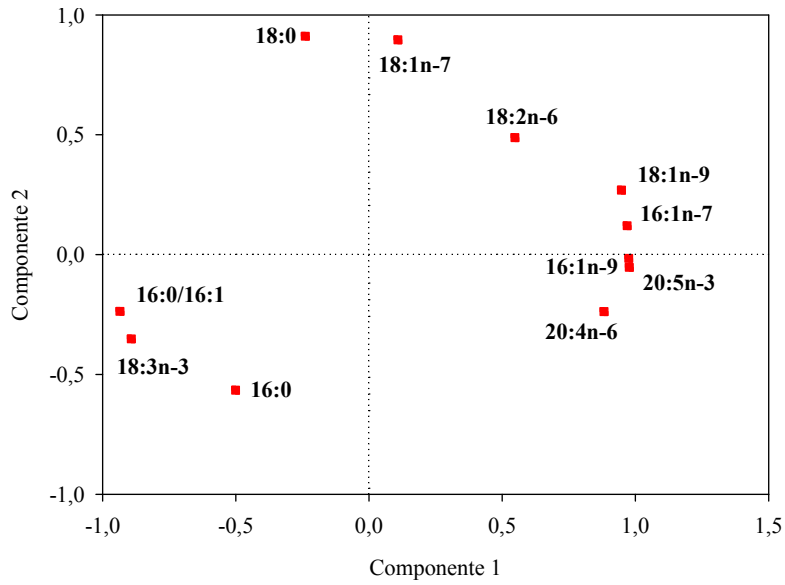


Figura 7.3. Gráfico de los coeficientes de las variables en los nuevos componentes principales.

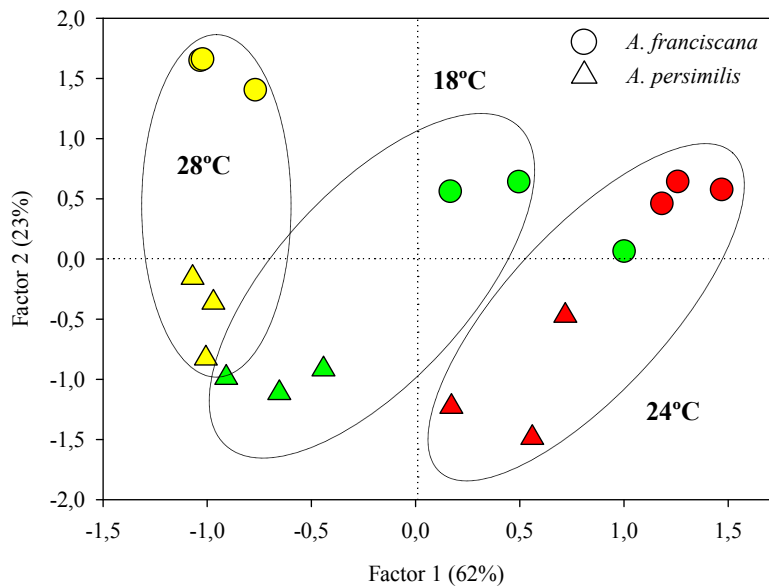


Figura 7.4. Gráfico de puntuaciones de los objetos (quistes) en los nuevos componentes principales. El color amarillo indica el tratamiento a 28°, el rojo a 24° y el verde a 18°C.

7.3.2. Biomosas

Los porcentajes de ácidos grasos hallados en las biomosas de *A. franciscana* y *A. persimilis* se muestran en la Figura 7.5. El análisis estadístico aplicado a los datos de biomosas mostró un efecto significativo de la temperatura en todos los ácidos grasos ($P \leq 0,05$) (Tabla 7.5). El efecto del factor especie fue significativo ($P \leq 0,05$) para el porcentaje de 18:1n-7, 18:2n-6, 20:4n-6 y 20:5n-3 mientras que la interacción resultó significativa para el 18:3n-3 y 20:5n-3. El test *a posteriori* demostró diferencias en el porcentaje de 20:5n-3 entre *A. franciscana* y *A. persimilis* en las temperaturas de 24° y 28°C. En *A. franciscana* se observan un descenso y un incremento significativos de 18:3n-3 y de 20:5n-3, respectivamente, cuando las biomosas son cultivadas a 18° respecto a 28°C. Por el contrario, *A. persimilis* mantiene constantes estos porcentajes con el cambio de temperatura. Tanto el 18:2n-6 como el 20:4n-6 aumentaron de forma significativa en ambas especies con el descenso de la temperatura. Los ácidos grasos saturados disminuyen su porcentaje con el descenso de la temperatura (excepto el 16:0 en *A. persimilis*, que no varía) al tiempo que los monoenoos 16:1n-9 y 18:1n-9 aumentan (Figura 7.5) en las dos especies.

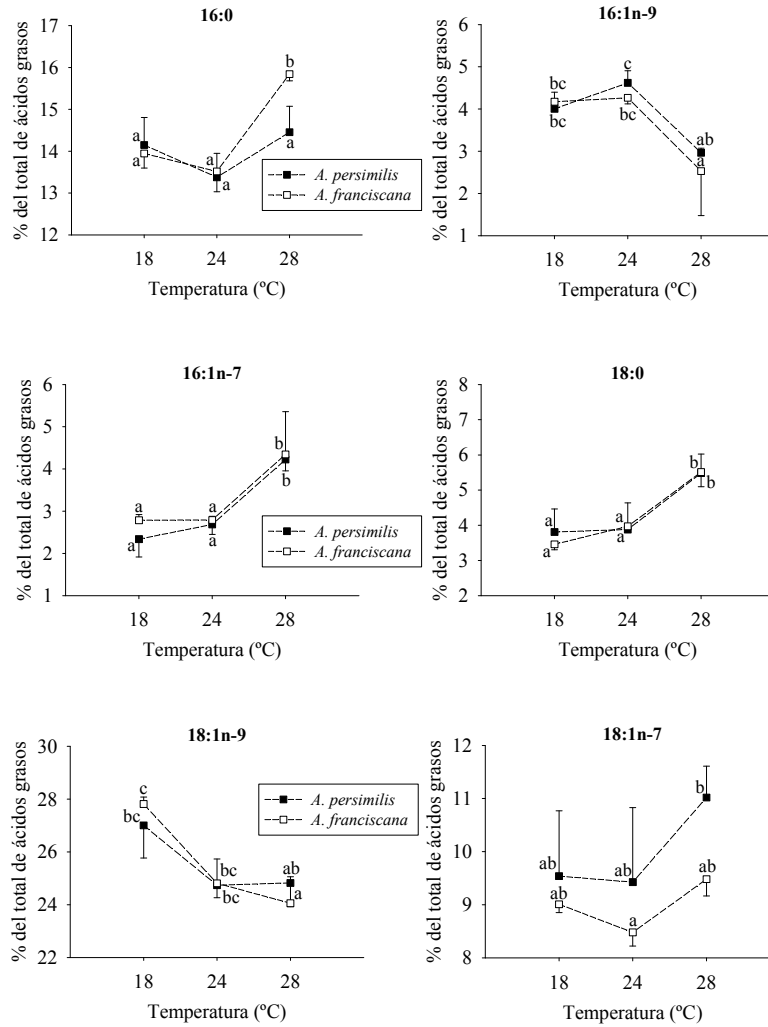
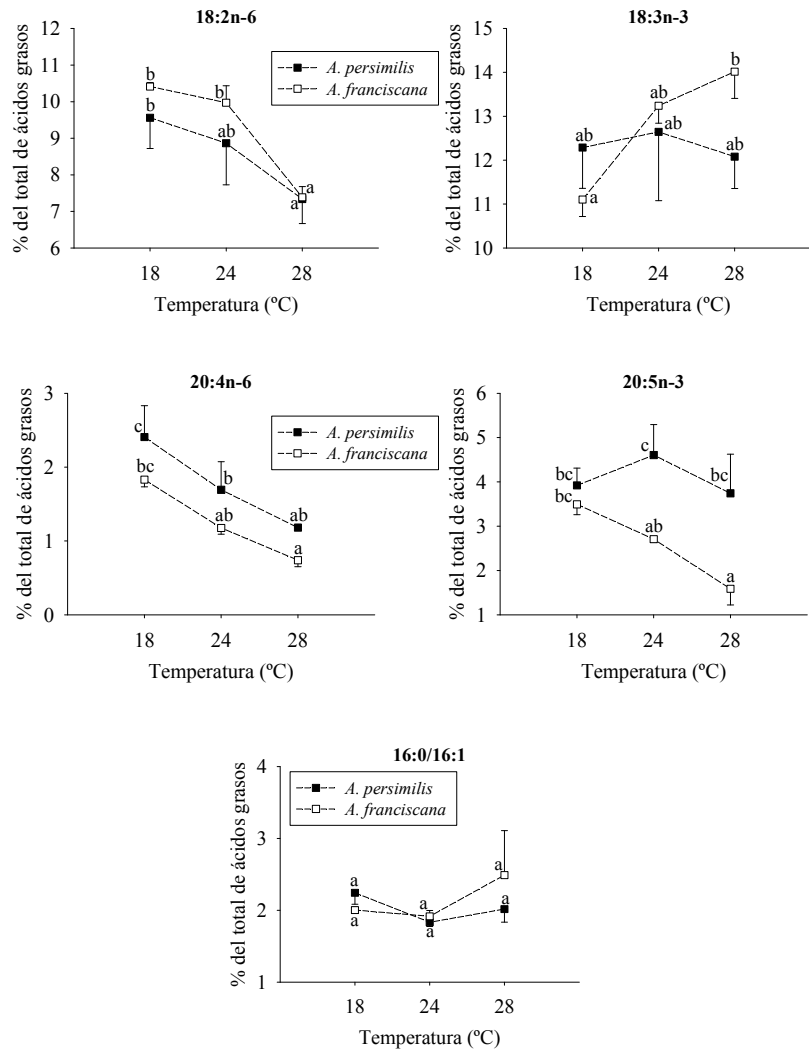


Figura 7.5. Ácidos grasos más abundantes (porcentaje del total de ácidos grasos) en las biomásas de *A. franciscana* y *A. persimilis* cultivadas a 18°, 24° y 28°C. Los valores son medias y las barras de error representan desviaciones típicas (n=3). Para ambas especies, los puntos de muestreo que comparten una misma letra no son significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).



(Continuación de la Figura 7.5)

Tabla 7.5. Nivel de significación del ANOVA de dos vías aplicado sobre el porcentaje de ácidos grasos de biomásas de las especies *A. persimilis* y *A. franciscana*, considerando las tres temperaturas experimentales (28°, 24° y 18°C). La interacción entre los factores se muestra como especie x temperatura. Las probabilidades estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$) se resaltan en negrita.

16:0	Especie	0,096
	Temperatura	0,000
	Especie x Temperatura	0,050
16:1n-9	Especie	0,386
	Temperatura	0,001
	Especie x Temperatura	0,548
16:1n-7	Especie	0,287
	Temperatura	0,000
	Especie x Temperatura	0,658
18:0	Especie	0,767
	Temperatura	0,000
	Especie x Temperatura	0,684
18:1n-9	Especie	0,943
	Temperatura	0,000
	Especie x Temperatura	0,322
18:1n-7	Especie	0,024
	Temperatura	0,042
	Especie x Temperatura	0,594
18:2n-6	Especie	0,043
	Temperatura	0,000
	Especie x Temperatura	0,425
18:3n-3	Especie	0,307
	Temperatura	0,034
	Especie x Temperatura	0,028
20:4n-6	Especie	0,000
	Temperatura	0,000
	Especie x Temperatura	0,954
20:5n-3	Especie	0,000
	Temperatura	0,002
	Especie x Temperatura	0,012
16:0/16:1	Especie	0,602
	Temperatura	0,239
	Especie x Temperatura	0,308

Al igual que con los resultados de los quistes, el análisis previo al PCA de los porcentajes de ácidos grasos de biomásas, mostró un valor de Kaiser-Meyer-Oklin (KMO) de 0,60, semejante al valor recomendado de 0,60 y la prueba de Bartlett resultó estadísticamente significativa ($P=0,000$). Siguiendo el criterio de extracción de factores según el *screeplot* de Cattell (1966) se decidió retener los dos primeros componentes, explicativos del 72% de la varianza total. En la Tabla 7.6 se indican los coeficientes de correlación de los ácidos grasos en el primer y segundo componente calculados, así como las comunalidades. En general todas las variables presentan valores de comunalidad elevados, contribuyendo con un alto valor explicativo de la varianza.

En la Figura 7.6 se representa el gráfico de la matriz de componentes donde se observa la distribución de las variables en función de su correlación con el PC1 y PC2. En el PC1, los porcentajes de 16:0, 16:1n-7, 18:0, 18:1n-7, 18:3n-3 y 16:0/16:1 están inversamente relacionados con los de 16:1n-9, 18:1n-9, 18:2n-6, 20:4n-6 y 20:5n-3.

Tabla 7.6. Coeficientes de correlación de cada una de las variables originales con las componentes principales (PC1, PC2) y comunalidades.

Ácido graso	PC1	PC2	Comunalidad
16:0	-0,79	-0,12	0,65
16:1n-9	0,84	-0,37	0,84
16:1n-7	-0,84	-0,02	0,70
18:0	-0,86	0,42	0,92
18:1n-9	0,67	0,39	0,60
18:1n-7	-0,33	0,90	0,92
18:2n-6	0,78	-0,45	0,82
18:3n-3	-0,51	-0,66	0,70
20:4n-6	0,79	0,45	0,83
20:5n-3	0,65	0,53	0,71
16:0/16:1	-0,39	0,24	0,22
Varianza explicada (%)	49,15	22,60	-

La representación gráfica de las puntuaciones de los objetos respecto a los dos factores (Figura 7.7) revela diferentes grupos en función de la temperatura de cultivo. Así, las biomásas cultivadas a 28°C muestran mayores porcentajes de 16:0, 16:1n-7, 18:0, 18:1n-7, 18:3n-3 y menores porcentajes de 16:1n-9, 18:1n-9, 18:2n-6, 20:4n-6 y 20:5n-3 en comparación con aquellas cultivadas a 24° y 18°C, las cuales, a su vez, presentan un perfil similar.

Los resultados del ANOVA de una vía sobre las puntuaciones de los objetos revelaron diferencias significativas entre los tratamientos de temperatura considerados ($F=65,49$, $P<0,05$). La posterior prueba de Tukey los agrupó en dos conjuntos: el primero formado por las biomásas cultivadas a 28°C y el segundo por aquellas mantenidas a 24° y 18°C. Por el contrario, no se detectaron diferencias significativas ($P>0,05$) en ninguno de los dos componentes (PC1: $F=0,53$ y PC2: $F=0,49$, respectivamente) cuando se consideró la especie como factor.

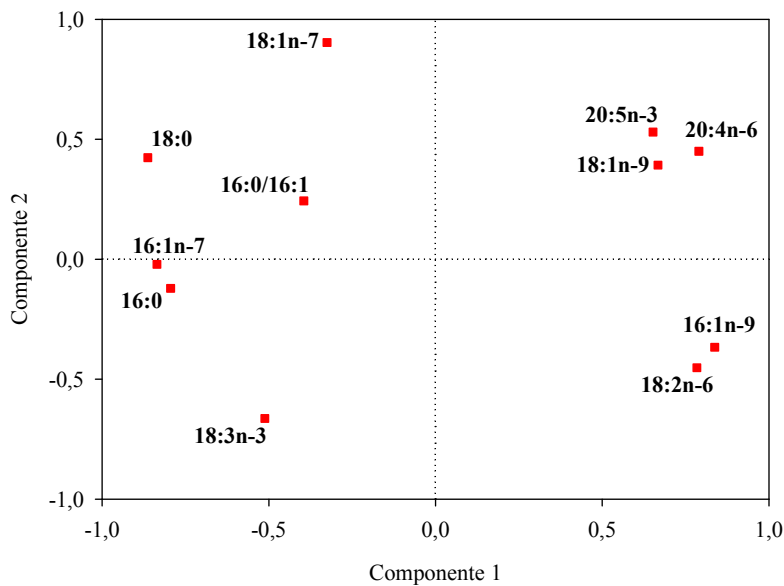


Figura. 7.6. Gráfico de los coeficientes de las variables en los nuevos componentes principales.

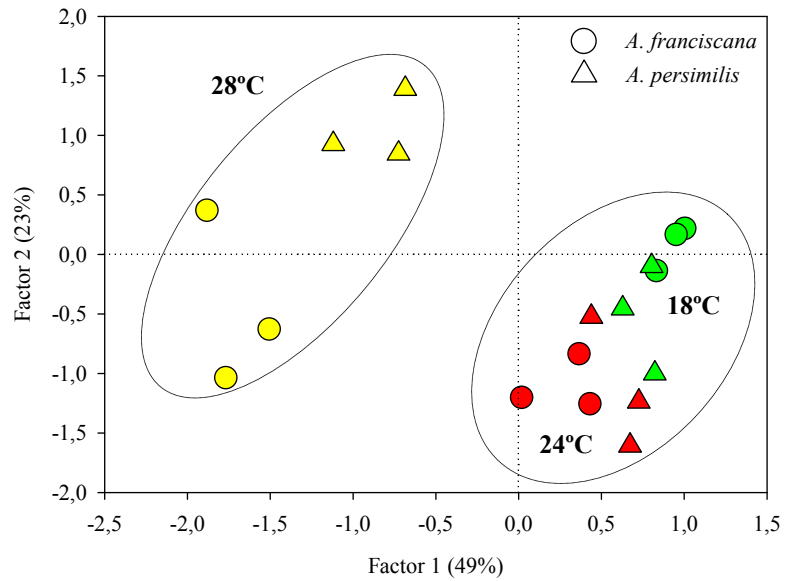


Figura 7.7. Gráfico de puntuaciones de los objetos (biomasas) en los nuevos componentes principales. El color amarillo indica el tratamiento a 28°, el rojo a 24° y el verde a 18°C.

7.4 DISCUSIÓN

Diversos autores han puesto de manifiesto cambios en la composición lipídica de organismos acuáticos poiquiloterms durante procesos de aclimatación térmica. En general, el grado de insaturación de los ácidos grasos está inversamente relacionado con la temperatura ambiental (Farkas, 1979; Neidelman, 1987; Suutari y cols., 1996).

Los resultados recogidos en este capítulo muestran que tanto las biomasas de *A. persimilis* y *A. franciscana* como los quistes emitidos por éstas, manifiestan diferencias en la composición de ácidos grasos cuando son cultivadas bajo diferentes temperaturas. Las poblaciones muestran una tendencia a la disminución de los ácidos grasos saturados y del 18:3n-3, así como a un aumento de los monoinsaturados y de los C20 (20:4n-6, 20:5n-3) con la disminución de la temperatura de cultivo. Estos resultados están en la línea de los hallados por Farkas y Herodek (1964) y Nanton y Castell (1999) quienes hallaron mayores cantidades de ácidos grasos monoinsaturados y HUFAn-3 con el descenso de la temperatura de cultivo en diversos grupos de crustáceos. Una posible explicación a

este hecho reside en que una disminución de la temperatura puede estar influyendo en la composición de ácidos grasos de las poblaciones mediante el aumento de la longitud de las cadenas y del grado de insaturación de los ácidos grasos que conforman la bicapa lipídica de las células, necesarios para el mantenimiento de la actividad normal de los organismos (Pruitt, 1990).

Sin embargo, en el presente estudio debe tenerse en cuenta que el descenso de la temperatura también puede causar un incremento general en el grado de insaturación de los ácidos grasos de las microalgas (Ackman y cols., 1964; Lynch y Thompson, 1982; Mortensen y cols., 1988), empleadas como alimento en las experiencias. Thompson y cols. (1992) llegaron a esta conclusión a través del análisis de un gran número de especies microalgales marinas. Así, por ejemplo, *Dunaliella tertiolecta* muestra una relación lineal inversa entre el porcentaje de ácidos grasos monoinsaturados y la temperatura de cultivo. De esta forma, también en este trabajo, la temperatura puede haber modificado el perfil de ácidos grasos del fitoplancton con el consiguiente impacto en el perfil de *Artemia*. No obstante, existe muy poca información acerca del patrón de variación de PUFAs y del tiempo necesario para que ello ocurra en los cultivos de fitoplancton mantenidos a una determinada temperatura, y posteriormente llevados a otra diferente, como en el caso que nos ocupa. En el experimento realizado por Jiang y Gao (2004) se observa un incremento de 20:5n-3 y PUFAs en 48 h, cuando las células de *Phaeodactylum tricorutum* crecidas a 25°C se llevan a una temperatura de 20°C. En general, el tiempo requerido (60 h) para la adaptación de los lípidos de membrana de las células microalgales sugiere que los ácidos grasos no pueden adaptarse a las transiciones de temperatura que ocurren en cortos periodos (Lynch y Thompson, 1982). Teniendo en cuenta estas consideraciones y que, en el estudio aquí efectuado, el medio de cultivo de *Artemia* se renovaba cada 48 h con medio nuevo mantenido en las condiciones estándar descritas (21°C), sería muy difícil asociar los cambios en el perfil de ácidos grasos de las poblaciones de *Artemia* a los que se puedan producir en el cultivo microalgal adicionado. Además, este hecho se corrobora por la práctica ausencia de HUFAs en los cultivos de *Dunaliella* sp., incluso cuando se disminuye su temperatura de cultivo (Thompson y cols., 1992) y, por el contrario, por su presencia en *Artemia*, presencia que, por otro lado, aumenta con el descenso de la temperatura.

Por lo comentado hasta ahora, la tendencia hacia un mayor grado de insaturación en las poblaciones de *Artemia* con el descenso de la temperatura de cultivo, vendría explicada por la teoría de la homeoviscosidad de las membranas (Sinensky, 1974). De hecho, los

quistes de las poblaciones de *Artemia* tibetanas (Tabla 7.1) presentan un perfil típicamente marino, con bajos contenidos de 18:3n-3 y elevados de 20:5n-3. Van Stappen y cols. (2003) analizaron los niveles de algunos ácidos grasos de varias poblaciones de *Artemia* procedentes del Tibet y correlacionaron los altos niveles de HUFAs n-3 encontrados con el de las microalgas dominantes en el medio. Sin embargo, Ruiz y cols. (2007) señalaron que la composición de ácidos grasos de las mismas microalgas, cultivadas bajo condiciones similares a las ambientales, presentan bajos contenidos en HUFAs y no pueden explicar la composición lipídica de *Artemia* en estos ecosistemas de gran altitud. Por lo tanto, se puede interpretar que tanto las poblaciones naturales procedentes del Tibet como las dos especies de *Artemia* aquí estudiadas, responderían de forma adaptativa a las bajas temperaturas mediante el aumento del grado de insaturación de sus ácidos grasos para mantener la fluidez de las membranas celulares.

Considerando las diferencias halladas entre especies, en los quistes de *A. franciscana* se detectan mayores porcentajes de 20:5n-3 y menores porcentajes de 18:3n-3 que en los de *A. persimilis* a la temperatura de 18°C. Sin embargo, no se observa la misma tendencia en las biomásas, donde los contenidos de 18:3n-3 y 20:5n-3 son similares en ambas especies a 18°C, siendo el porcentaje de 20:5n-3 superior en *A. persimilis* a 24° y 28°C. Teniendo en cuenta que los experimentos se realizaron en idénticas condiciones controladas de laboratorio, cabría esperar unos porcentajes de ácidos grasos similares en ambas especies a cada temperatura, tanto en quistes como en biomásas, y una correlación entre los perfiles de los adultos y los de su descendencia. Sin embargo, los resultados encontrados señalan diferencias interespecíficas en la actividad metabólica de las poblaciones. De esta forma, hay indicios de una actividad desaturasa y elongasa independiente del cambio de la temperatura de cultivo en las biomásas de *A. persimilis*, mientras que *A. franciscana* presentaría una mayor capacidad enzimática a 18°C. A pesar de la mayor variabilidad existente en los datos de las muestras de *A. persimilis*, ésta parece ser más constante en su perfil de ácidos grasos frente a los cambios de temperatura, que *A. franciscana*. Esta circunstancia apunta hacia una mayor plasticidad fenotípica mostrada por *A. franciscana* ante las variaciones en la temperatura de cultivo, en comparación con *A. persimilis*, más estenoterma, y mejor adaptada a temperaturas más bajas (Medina y cols., 2007). De hecho, a 18°C *A. franciscana* alcanza valores de 20:5n-3 similares a los detectados en *A. persimilis* a la misma temperatura (Figura 7.3).

Las diferencias en el perfil de ácidos grasos halladas entre quistes son mucho mayores que las halladas entre biomásas. De hecho

el PCA no detecta diferencias interespecíficas en el grupo de las biomásas. El alimento consumido por las hembras adultas puede afectar a la abundancia de determinados ácidos grasos en sus tejidos, incluyendo los ovarios, al igual que se ha observado en otras especies de crustáceos (Lytle y cols., 1990; Alava y cols., 1993; Cahu y cols., 1994, 1995; Xu y cols., 1994), dando lugar a una descendencia con una composición de ácidos grasos diferente en función de la especie considerada. Ello apuntaría hacia el hecho de que el perfil de ácidos grasos encontrado en los quistes está condicionado no sólo por el tipo de alimentación de la generación parental sino también por el metabolismo característico de las poblaciones adultas. A pesar de esto, la magnitud del efecto de la temperatura de cultivo sobre la composición de ácidos grasos de *Artemia* no es comparable al efecto de la dieta (Capítulo 6).

En resumen, se ha demostrado que la disminución de la temperatura de cultivo influye de manera significativa en la composición de ácidos grasos en *Artemia*, aumentando su porcentaje de HUFAs, y representa, junto a la dieta, una de las causas que contribuyen a la variabilidad en la composición de ácidos grasos de las poblaciones. La adaptación de *A. persimilis* a habitats de menor temperatura podría explicar el mayor porcentaje de 20:5n-3 en sus tejidos que el hallado en *A. franciscana*. Sin embargo, en ésta se observa una mayor plasticidad fenotípica en respuesta a los cambios de la temperatura de cultivo. La ausencia de correlación entre los perfiles de ácidos grasos hallados en biomásas y en quistes permite considerar que el perfil lipídico de los quistes no sólo está influido por la temperatura a la que están sometidas las poblaciones parentales, sino que también debe estar determinado por el metabolismo específico de cada una de ellas. Esto apunta una vez más hacia diferencias metabólicas interespecíficas aparentemente indetectables o enmascaradas por el mayor efecto fenotípico del alimento.

CAPÍTULO 8

COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN *Artemia*: EXPERIMENTOS EN MESOCOSMOS

8.1. INTRODUCCIÓN

La transferencia de energía de un nivel trófico a otro es el proceso básico en la dinámica de la cadena alimentaria (Lindeman, 1942). En los ambientes bénticos y pelágicos todos los organismos dependen del fitoplancton (productores primarios), que utilizan la energía luminosa en los procesos de fotosíntesis para convertir dióxido de carbono y agua en azúcares y otros compuestos esenciales (ácidos grasos, aminoácidos, etc.).

Los lípidos constituyen una parte significativa del flujo de carbono a través de los distintos niveles tróficos (Sargent y cols., 1977, Sargent y Whittle, 1981) y son los principales constituyentes de la materia orgánica viva, implicados en una gran variedad de funciones celulares que incluyen el mantenimiento de la estructura de las membranas (fosfolípidos y glicolípidos) y la reserva de energía (triacilglicéridos y ésteres de cera) (Vance y Vance, 1985; Arts y Wainman, 1998; Bergé y Barnathan, 2005). Estos compuestos naturales pueden proporcionar un registro de la actividad biológica en la columna de agua y de los procesos de sedimentación (Pinturier-Geiss y cols., 2002).

El zooplancton herbívoro se considera de crucial importancia en la transferencia de materia y energía entre productores primarios y niveles tróficos superiores (Cotonnec y cols., 2001). El éxito reproductivo del zooplancton se relaciona con la calidad del alimento (Capítulo 6) y los cambios en ésta pueden influir en la eficiencia de asimilación que, a su vez, puede afectar a la energía disponible para el metabolismo, crecimiento y reproducción de las poblaciones (Pond y cols., 1996; Wacker y Von Elert, 2003). La cantidad y calidad del alimento varía dependiendo de la disponibilidad de nutrientes (Brett y Müller-Navarra, 1997), de la temperatura y de la salinidad (Davis y Giordano, 1996) del medio. Una baja calidad del alimento implica la presencia de deficiencias en la composición bioquímica de la dieta en relación a los requerimientos de los organismos consumidores.

Los ácidos grasos constituyen la fracción más importante de los lípidos en organismos acuáticos, y muchos de ellos sólo pueden ser sintetizados *de novo* por el fitoplancton (Pohl y Zurheide, 1979; Desvilettes y cols., 1997; Napolitano y cols., 1997). Dado que la transferencia de determinados ácidos grasos es conservativa en la cadena trófica acuática, se ha establecido y empleado con éxito el uso de la composición de ácidos grasos como un método para rastrear las fuentes de alimento en los ecosistemas. La mayor o menor proporción de determinados ácidos grasos en diferentes especies microalgales

permitió a Sargent y cols. (1988) establecer el uso de estas moléculas como biomarcadores tróficos en los ecosistemas marinos. Claustre y cols. (1988, 1989) y Sargent y cols. (1988) propusieron, respectivamente, la relación 16:0/16:1 y el ácido eicosapentaenoico (20:5n-3) como marcadores de diatomeas. Por otro lado, Volkman y cols. (1998) observaron que en el grupo de las clorofíceas predominan los PUFAs C18 como el ácido linoleico (18:2n-6) y el linolénico (18:3n-3).

Recientemente se ha publicado una amplia revisión sobre los ácidos grasos como marcadores tróficos (*Fatty-Acid Trofic Markers*, FATM) en ambientes marinos pelágicos (Dalsgaard y cols., 2003). Estos FATM pueden ser reconocidos en los consumidores primarios (zooplancton), representados en ambientes hipersalinos por el crustáceo *Artemia*.

Los ácidos grasos se han utilizado con éxito como biomarcadores del alimento consumido por *Artemia* en cultivos de laboratorio. Sin embargo, las condiciones de laboratorio no reflejan las habituales en la naturaleza, donde entran en juego muchos factores y donde los parámetros de los experimentos no son controlables. Por este motivo se hace necesario un estudio en sistemas intermedios que reflejen la complejidad hallada en la naturaleza pero que a su vez, sean manejables por parte del investigador. Esto es justamente lo que facilitan los mesocosmos, un paso intermedio entre la naturaleza y el laboratorio. Hernández-Cruz y cols. (1999) definen un mesocosmos como un “sistema de tanques de experimentación que encierran comunidades mixtas simulando ecosistemas naturales, permitiendo realizar experimentos a nivel de ecosistema bajo condiciones controladas”. Pero quizás sea la definición de mesocosmos de Boyle y Fairchild (1997) la que más se ajusta al uso que se le da a estos sistemas en el presente trabajo: “ecosistemas semicontrolados e instalados al aire libre cuyas dimensiones y parámetros físico-químicos y biológicos son conocidos y controlados.”

Como se ha demostrado en anteriores capítulos, los factores que condicionan el perfil de ácidos grasos de una población de *Artemia* cultivada en laboratorio están determinados en parte por la composición de ácidos grasos del alimento ingerido (Capítulo 6) y por la temperatura de cultivo (Capítulo 7). Sin embargo, bajo condiciones ambientales naturales, estamos ante un sistema complejo donde son muchas las variables que intervienen conjuntamente en la determinación del perfil lipídico de las poblaciones. En este contexto, los análisis multivariantes, englobados dentro de las técnicas quimiométricas, son los más adecuados para evaluar el efecto

simultáneo de los cambios en los diferentes factores o variables sobre el resultado final de un estudio. La aplicación de análisis quimiométricos en estudios ecológicos, donde se emplean los ácidos grasos como biomarcadores, ha sido revisada ampliamente por Parrish y cols. (2000). Estas técnicas resultan especialmente interesantes cuando se comparan diferentes tipos de variables (p.ej. variables bioquímicas con variables físico-químicas). En el presente estudio se han empleado algunos análisis multivariantes como el de componentes principales (Capítulo 3), correlación canónica y discriminante, cuyos fundamentos se detallan más adelante.

Este capítulo se centra en el estudio de las relaciones tróficas de *Artemia* en un sistema de mesocosmos a través del análisis de los FATM, y el posterior tratamiento de los datos mediante diversos métodos estadísticos multivariantes.

8.1.1. Estudio de la variación estacional en la composición de ácidos grasos de *Artemia* cultivada en mesocosmos

Las variaciones estacionales que se dan en los ambientes naturales donde habita *Artemia* pueden influir directa o indirectamente sobre su composición en ácidos grasos. El descenso de la temperatura en el hábitat de *Artemia* puede causar directamente un aumento en el grado de insaturación de los ácidos grasos de la población, tal y como se ha demostrado en otros grupos de crustáceos (Farkas y Herodeck, 1964; Farkas y cols., 1988; Nanton y Castell, 1999; Pérez-Velázquez y cols., 2003). Por otro lado, como efecto indirecto, *Artemia* refleja ciertos ácidos grasos biomarcadores de la dieta. De este modo, dado que las microalgas poseen diferente composición en ácidos grasos dependiendo del grupo taxonómico al que pertenecen (Zhukova y Aizdaicher, 1995; Napolitano y cols., 1997), las variaciones estacionales de las especies microalgales en el medio, sujetas a su vez a cambios en las condiciones ambientales, como la temperatura, luz y nutrientes (Fábregas y cols., 2002; Álvarez-Cobelas, 1989), implican importantes cambios en la composición de ácidos grasos en *Artemia* (Fábregas y cols., 2001). Por ejemplo, los quistes procedentes de la Bahía de San Francisco, (SFB, California, EE.UU.) presentan una elevada variabilidad en el contenido de HUFAs n-3, presuntamente condicionada por los cambios estacionales en la composición de las especies microalgales predominantes en el medio (Haynes y Hammer, 1978; Hammer, 1981), o por la variabilidad en el contenido de HUFAs n-3 en la misma especie microalgal (Scott y Middleton, 1979).

La caracterización limnológica de un sistema de mesocosmos como el empleado en el presente trabajo, puede realizarse a través del estudio de diferentes parámetros: físicos, como la forma y dimensiones de los tanques de cultivo, hidrología y régimen térmico; químicos, como el oxígeno disuelto, pH y la concentración de nutrientes; y biológicos, como la composición del fitoplancton y los pigmentos fotosintéticos. La variación en todos estos parámetros condicionará el funcionamiento ecológico del sistema.

Los estudios sobre correlación entre las condiciones fisico-químicas y biológicas predominantes en el medio donde habita *Artemia* y su composición en ácidos grasos, son muy escasos. Albentosa y cols. (1987) mantienen que no es posible establecer relaciones causa-efecto entre la composición lipídica de *Artemia* y los parámetros ambientales del medio en el que vive. Por su parte, Gozalbo (1990) no halla relaciones importantes entre ambos grupos de variables, y revela que la composición en ácidos grasos de diferentes poblaciones, cultivadas al aire libre con una misma dieta microalgal, es diferente.

Como ya se ha comentado en líneas anteriores, los ácidos grasos se pueden utilizar como marcadores tróficos (FATM) en los ecosistemas marinos. La aplicabilidad de los FATM en el estudio de las relaciones tróficas en los hábitats de *Artemia* viene condicionada por las modificaciones que puedan llevar a cabo estos crustáceos a través de la transformación de los ácidos grasos de la dieta. La dinámica de estos procesos está determinada por varios factores intrínsecos a la población, como la especie de que se trate y/o los diferentes estadios de desarrollo (Schauer y cols., 1980; Watanabe y cols., 1980; Navarro y cols., 1991; Vismara y cols., 2003). Los estudios llevados a cabo en copépodos son muy abundantes en este sentido, y en la revisión de Dalsgaard y cols. (2003) se describe la incorporación y modificación de los ácidos grasos procedentes de la dieta a través de los diferentes estadios de desarrollo de estos crustáceos. Así, por ejemplo, un estudio en *Calanus finmarchicus* (procedente del Mar del Norte) revela un aumento de los ácidos grasos monoinsaturados durante el periodo de desarrollo de los copepoditos hasta los estadios adultos (Kattner y Krause, 1987). Esta misma tendencia se ha evidenciado en copépodos de la Antártida por Katter y cols. (1994), quienes sostienen la hipótesis de que la biosíntesis de ácidos grasos está menos desarrollada en los primeros estadios ontogénicos, los cuales probablemente catabolizan los ácidos grasos de la dieta como fuente de energía. La investigación acerca de la variación durante los cambios ontogénicos (desde quiste hasta adulto) de la composición de ácidos grasos de *Artemia* cultivada en

mesocosmos es un tema totalmente novedoso desde el punto de vista de la biología de estos crustáceos.

De forma complementaria a los estudios realizados a escala de laboratorio en los Capítulos 6 y 7, los factores que condicionan la composición de ácidos grasos en *Artemia* pueden determinarse en experimentos llevados a cabo en mesocosmos. El principal objetivo de este estudio es evaluar las variaciones en la composición de ácidos grasos de una población de *Artemia* (*A. persimilis*, Algarrobo; Argentina) cultivada en mesocosmos durante un periodo prolongado. Se establece por primera vez una amplia información acerca de la composición de ácidos grasos de los diferentes estadios de desarrollo de *Artemia*, y de su variación en relación con los principales parámetros físico-químicos y biológicos, y muy especialmente con los ácidos grasos presentes en el medio (seston). Al mismo tiempo los resultados hallados se relacionan con experiencias similares realizadas en laboratorio.

8.1.2. Estudio comparativo del perfil de ácidos grasos en dos especies de *Artemia* en coexistencia

Hasta la fecha ningún trabajo ha abordado el estudio sobre la composición de ácidos grasos de diversas especies de *Artemia* coexistiendo en un mismo hábitat. La investigación del perfil de ácidos grasos de especies en coexistencia es de interés, no sólo por los nuevos conocimientos que aportan en la biología y ecología del género, sino también por la visión que ofrece sobre los factores que condicionan el perfil de ácidos grasos de diferentes poblaciones en la naturaleza. No se conoce hasta qué punto la composición de ácidos grasos de *Artemia* varía entre especies y qué porcentaje de la varianza se debe al componente intrapoblacional.

En Argentina las poblaciones de *A. franciscana* se hallan al norte del paralelo 36°S, mientras que las de *A. persimilis* se encuentran restringidas al sur del paralelo 37°S. En algunas salinas mediterráneas se ha observado la coexistencia de poblaciones de *Artemia* autóctonas y de la especie invasora *A. franciscana* (Amat y cols., 2005). Aunque actualmente no se conocen casos de coexistencia entre *A. persimilis* y *A. franciscana* en sus biotopos argentinos originales, ésta es una situación que potencialmente podría darse. Al coexistir, las dos especies están expuestas exactamente a los mismos factores ecológicos y, por lo tanto, la hipótesis de partida apunta hacia que ambas presenten una composición en ácidos grasos similar.

Este estudio tiene por objeto la identificación de las posibles diferencias en la composición de ácidos grasos de individuos y

biomasas de *A. persimilis* y *A. franciscana* coexistiendo y compitiendo por los mismos recursos tróficos, cultivadas bajo las mismas condiciones ambientales a escala de mesocosmos.

8.2. MATERIAL Y MÉTODOS

8.2.1. Cultivo en mesocosmos

Para las experiencias de cultivo de biomasas de *Artemia* en régimen de mesocosmos se dispusieron al aire libre varios tanques cilíndricos de 10 m² de superficie, 0,6 m de altura y 5000 l de capacidad, dotados de una leve aireación que permite la distribución uniforme del medio y el aporte de oxígeno (Figura 8.1). En los tanques se provocó inicialmente la proliferación de un cultivo de *Dunaliella* sp. (70-80 g l⁻¹). Posteriormente se inocularon ejemplares adultos de las poblaciones de *Artemia* que previamente habían sido cultivadas bajo condiciones controladas de laboratorio.

Las poblaciones se mantuvieron en el cultivo en mesocosmos durante varias generaciones, de manera que los adultos, tras ir completando su ciclo biológico, aportaban abundante descendencia al medio (nauplios y/o quistes, en función de las condiciones ambientales), alcanzando a veces densidades de población muy elevadas. En tales casos se hizo necesaria la retirada de cierta cantidad de biomasa para evitar el colapso de la población por agotamiento del fitoplancton o por las bajas concentraciones de oxígeno.

Por tratarse de recipientes de cultivo al aire libre, proliferaban de acuerdo a la salinidad y temperatura del medio, larvas de dípteros (*Chironomus* y *Ephydra*) y diversas especies de macrófitos (*Cladophora* y *Enteromorpha*), cianofíceas y diatomeas, que colonizaban las paredes y el fondo de los tanques.

Durante su crecimiento, una población de *Artemia* libera al medio productos de excreción, y exuvias de sus individuos en continuo desarrollo. Para evitar los efectos nocivos del medio degradado sobre la población de *Artemia*, se renovó periódicamente el cultivo mediante la eliminación de un volumen determinado de medio y la adición de nuevo cultivo fitoplanctónico (*Dunaliella* sp.) obtenido masivamente en tanques auxiliares mantenidos en condiciones similares. La eliminación de biomasa y quistes en el proceso de renovación, se evitaba utilizando un tamiz cilíndrico de PVC, con malla de 160 µm en ambos extremos, sumergido en el agua (Figura 8.2). Dicho dispositivo se conectó a una bomba aspirante de bajo caudal.

La población de *Artemia* se mantuvo en estos cultivos durante periodos comprendidos entre 5 y 14 meses. De forma periódica se recolectaban muestras de biomasa y quistes para analizar su composición en ácidos grasos.



Figura 8.1. Sistema de tanques situados al aire libre para el cultivo de *Artemia* en mesocosmos.



Figura 8.2. Detalle del tamiz de malla de 160 μm sumergido en el interior del tanque. Nótese la presencia de quistes acumulados en la pared del tanque.

8.2.2. Estudio de la variación estacional en la composición de ácidos grasos en *A. persimilis*

Desde Enero de 2005 hasta Marzo de 2006 se llevó a cabo un experimento de cultivo de *Artemia* en mesocosmos con la finalidad de investigar los cambios en el perfil de ácidos grasos a lo largo de las diferentes estaciones del año y entre los diferentes estadios de desarrollo del crustáceo. La población sometida a estudio fue la original de las salinas de Algarrobo (ALG) (provincia de Buenos

Aires, Argentina) perteneciente a la especie *A. persimilis* (ver descripción en Capítulo 4).

Las biomasas y quistes recolectados en cada muestreo en el mesocosmos se clasificaban según los diferentes estadios de desarrollo (quistes, nauplios, metanauplios, juveniles y adultos) mediante el uso de mallas de nylon de 300 a 1000 μm de luz. Dado que la composición por tallas y edades de los individuos de las poblaciones cultivadas sometidas a condiciones naturales es impredecible, no siempre fue fácil el muestreo exhaustivo de las distintas fases de desarrollo, y sólo en determinados periodos se pudieron recolectar muestras representativas de todas las clases de edad. Por tal motivo, las muestras de quistes y adultos siempre fueron más abundantes que las de nauplios, metanauplios y juveniles. Tras la captura de las biomasas, los ejemplares se resuspendieron en agua de mar limpia para facilitar la separación de otros organismos y residuos. Una vez seleccionado el material, las muestras se lavaron con agua destilada, se escurrieron eliminando el agua intersticial, se congelaron a -80°C y se liofilizaron, manteniéndose en estas condiciones hasta el análisis posterior.

Dos veces por semana se hacía un control de los parámetros físico-químicos (oxígeno, temperatura, pH, salinidad) y biológicos (clorofila *a*, materia orgánica, ácidos grasos) del seston (Apartados 3.3 y 3.4) con el fin de establecer posibles correlaciones con los perfiles de ácidos grasos encontrados en las poblaciones.

8.2.2.1. Análisis estadísticos

Como índice estadístico para medir las relaciones lineales entre las diferentes variables ambientales se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson.

Las relaciones existentes entre las variables ambientales (temperatura, concentración de oxígeno y concentración de clorofila *a*) y los porcentajes de los ácidos palmítico (16:0), esteárico (18:0), palmitoleico (16:1n-7), *cis*-7-hexadecenoico (16:1n-9), *cis*-vaccenico (18:1n-7), oleico (18:1n-9), linoleico (18:2n-6), linolénico (18:3n-3, LNA), araquidónico (20:4n-6, ARA), eicosapentaenoico (20:5n-3, EPA), PUFA, PUFA n-3, PUFA n-6, HUFA n-3 y HUFA n-6 analizados en las biomasas y los quistes recolectados durante todo el experimento (en total 59 muestras), se establecieron mediante un análisis de correlación canónica (*Canonical Correlation Analysis*, CCA; ver Apartado 6.2.3.1). La matriz de datos utilizada se transformó mediante la sustracción del menor valor encontrado en

cada variable a cada uno de los datos, y la suma de la unidad (Thompson, 1984; Gifi, 1990)

Con el objetivo de clasificar las muestras recolectadas en función de su composición en ácidos grasos, en los distintos grupos previamente definidos (quistes, nauplios, metanauplios, juveniles y adultos), se realizó un análisis discriminante (*Discriminant Analysis*, DA). Se introdujeron 15 variables (las mismas 15 que los empleados en el CCA) y se utilizaron 59 casos para desarrollar un modelo que diferenciase las cinco clases de edad consideradas. Este análisis se basa en el cálculo de una serie de funciones discriminantes que son combinaciones lineales de las variables discriminatorias (porcentajes de ácidos grasos encontrados en cada ejemplar), constituidas de modo que, aplicadas a cada uno de los ejemplares de las muestras, las diferencias entre grupos sean máximas.

La forma de las funciones es:

$$f_{km} = u_0 + u_1 X_{1km} + \dots + u_p X_{pkm} \text{ donde:}$$

p es el número de variables discriminatorias (los ácidos grasos de individuos y quistes);

f_{km} es el valor que la función discriminante toma para el individuo m de la población k ;

X_{pkm} es el valor de la variable discriminatoria X_i para el individuo m de la población (grupo) k . Dependiendo de los valores aquí utilizados se pueden calcular funciones (f 's) para cada uno de los individuos medidos, o para cada uno de los grupos, si se usa el valor medio de las medidas de los individuos de un mismo grupo (en este caso los f 's se denominan centroides);

u_p es el coeficiente que calcula el análisis para que la función presente las características de máximas diferencias entre grupos.

Los resultados ofrecen una tabla de coeficientes u , bajo el nombre de coeficientes no estandarizados. Estos están calculados de modo que la media de todos los f 's sea cero y sus desviaciones típicas dentro de cada población sean todas iguales a uno. De esta forma se puede comparar la distancia entre pares de individuos y representarlos gráficamente en un sistema de coordenadas definido por las distintas funciones discriminantes.

El ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey sobre las puntuaciones que toman los grupos en las nuevas funciones discriminantes, permite establecer diferencias entre ellos.

La normalidad de todas las variables se comprobó previamente con la prueba de Kolmogorov y Smirnov (Sokal y Rohlf, 1981). Aquellas variables que no cumplieran con el supuesto de normalidad se transformaron mediante el logaritmo neperiano (\ln) o el arcoseno ($\arcsin \sqrt{\text{varx}/100}$) para los porcentajes.

8.2.3. Estudio comparativo del perfil de ácidos grasos en dos especies de *Artemia* en coexistencia

El experimento se llevó a cabo durante los meses de Enero a Junio de 2005. Las especies objeto de estudio se obtuvieron a partir de quistes de laboratorio de las poblaciones de la salina Algarrobo (ALG, *A. persimilis*) y del Great Salt Lake (GSL, *A. franciscana*).

El cultivo en mesocosmos se realizó siguiendo el procedimiento descrito en el Apartado 8.2.1. Previa inoculación del tanque, las poblaciones de *A. persimilis* y *A. franciscana* se cultivaron en laboratorio hasta que llegaron a su estadio adulto. En este momento se inocularon en el sistema de mesocosmos a una densidad aproximada de 80 individuos l^{-1} . Ambas especies se mantuvieron coexistiendo en competencia hasta el final del experimento. Durante el desarrollo del mismo la temperatura varió entre 4° y 25°C y la salinidad entre 65 y 95 g l^{-1} .

Una vez finalizada la experiencia se recolectaron tres muestras de biomasa mediante el tamizado de 1 l de medio en una malla de 1 mm de luz donde los animales quedaban retenidos. Se separaron tres muestras de biomasa adulta y también se aislaron 10 individuos adultos de cada especie. En total, se analizaron tres réplicas de biomasa (BP) y 10 de individuos (P1 a P10) correspondientes a *A. persimilis* y, de manera similar, se analizaron tres réplicas de biomasa (BF) y 10 de individuos (F1 a F10) para *A. franciscana*. La identificación y separación de ambas especies se basó en la morfometría *de visu* de acuerdo a Cohen y cols. (1999) y se confirmó más tarde mediante el análisis de biometría siguiendo la metodología del análisis discriminante descrita por Hontoria y Amat (1992a, b).

Las muestras se congelaron a -80°C y se liofilizaron antes de proceder al análisis de ácidos grasos, que se realizó como se describe en la metodología común (Apartado 3.4).

8.2.3.1. Análisis estadísticos

Los porcentajes de los principales ácidos grasos hallados en los lípidos totales de *Artemia*, esto es, ácido palmítico (16:0), esteárico (18:0), palmitoleico (16:1n-7), *cis*-7-hexadecenoico (16:1n-9), *cis*-vaccénico (18:1n-7), oleico (18:1n-9), linoleico (18:2n-6), linolénico

(18:3n-3), araquidónico (20:4n-6) y eicosapentaenoico (20:5n-3), se incluyeron como variables en el análisis de componentes principales (PCA, ver detalles del análisis en el Apartado 3.6), que establece nuevas variables, y permite estudiar las diferencias entre las dos especies de *Artemia* en coexistencia. Las nuevas variables (o componentes principales) medidas en cada una de las poblaciones se compararon mediante ANOVA de una vía y posterior prueba de comparación múltiple de Tukey.

8.3. RESULTADOS

8.3.1. Variación estacional en la composición de ácidos grasos en *A. persimilis*

8.3.1.1. Parámetros físico-químicos y biológicos

Al inicio del invierno la temperatura media del agua se mantuvo alrededor de los 8°C y aumentó hasta una media de 19°C durante la primavera (Tabla 8.1). En el periodo de verano alcanzó valores máximos de 25°C. Durante Octubre y Noviembre no hubo datos disponibles, pero hasta Marzo del año siguiente se aprecia un descenso considerable de la temperatura, que comienza a aumentar otra vez entrando en el mes de Abril. En general, los valores de salinidad oscilaron entre 65 y 100 g l⁻¹ (Tabla 8.1).

La disponibilidad de alimento, expresada como concentración de clorofila *a*, mostró un descenso hacia la primavera, un ligero incremento durante el verano y un aumento muy acusado al inicio del año siguiente (invierno). Las agudas fluctuaciones de clorofila *a* que se observan durante los diversos periodos son debidas a las adiciones de nuevo medio de cultivo que se realizaban a intervalos determinados. Como puede observarse en la Tabla 8.2, la concentración de oxígeno y de materia orgánica se correlacionan positivamente con la concentración de clorofila *a*. Así, un aumento en la concentración de clorofila *a* se traduce en un aumento significativo de los niveles de oxígeno y de la concentración de materia orgánica en el medio. Por el contrario, la concentración de clorofila *a* y oxígeno son inversamente proporcionales al aumento de temperatura.

Tabla 8.1. Parámetros físico-químicos y biológicos registrados entre Enero de 2005 y Marzo de 2006 en el sistema de mesocosmos.

Fecha	Clorofila a ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Oxígeno (mg l^{-1})	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Materia		pH
				Orgánica (mg ml^{-1})	Salinidad (‰)	
26/01/2005	32,94	8,30	1,40	0,10	80	8,96
03/02/2005	20,41	7,27	6,10	0,09	85	8,65
10/02/2005	16,74	7,31	8,60	0,09	65	8,83
17/02/2005	13,78	7,21	6,20	0,10	70	8,91
24/02/2005	10,05	10,03	6,10	0,12	75	8,79
08/03/2005	6,18	7,60	6,10	0,12	80	8,81
15/03/2005	244,95	5,32	12,90	0,22	85	8,02
22/03/2005	24,70	5,40	15,30	0,14	85	8,18
29/03/2005	1,20	4,10	15,40	0,16	90	8,26
07/04/2005	1,35	4,36	15,90	0,08	85	8,50
14/04/2005	0,50	3,45	16,80	0,06	90	7,98
19/04/2005	0,23	2,72	17,90	0,05	90	7,58
26/04/2005	0,01	3,44	20,10	0,06	90	7,61
04/05/2005	0,18	3,99	19,90	0,05	90	7,62
10/05/2005	3,00	5,21	21,30	0,08	95	7,84
24/05/2005	1,95	6,50	22,30	0,08	90	8,06
07/06/2005	0,05	3,91	24,50	0,07	100	8,45
14/06/2005	22,48	6,17	23,10	0,08	85	8,45
09/08/2005	18,88	9,84	23,10	0,12	65	9,87
23/08/2005	88,26	10,32	19,00	0,09	105	8,36
08/09/2005	2,21	8,13	18,00	0,03	95	7,82
16/09/2005	1,03	3,45	20,50	0,05	110	6,70
28/02/2006	233,72	12,66	5,50	0,11	75	8,09
02/03/2006	174,65	12,01	5,70	0,11	85	8,57
07/03/2006	177,39	11,08	9,10	0,11	85	8,32
09/03/2006	167,85	8,12	12,80	0,07	90	8,34
14/03/2006	93,23	10,42	12,10	0,10	95	7,43
16/03/2006	33,46	3,25	12,20	0,04	100	8,10
22/03/2006	4,15	4,65	12,50	0,03	95	7,62
Media	48,12	6,77	14,15	0,09	87,24	8,23
CV	156,51	42,93	46,18	46,32	12,21	7,34

Tabla 8.2. Análisis de correlación entre las variables estudiadas en el tanque del mesocosmos durante los diferentes periodos experimentales.

	Oxígeno	Temperatura	Materia Orgánica	Clorofila a
Oxígeno	1,000			
Temperatura	-0,492**	1,000		
Materia Organica	0,320	-0,296	1,000	
Clorofila a	0,720**	-0,546**	0,479**	1,000

Los asteriscos marcan correlaciones significativas con $P \leq 0,01$.

El porcentaje de los ácidos grasos analizados en las muestras de seston durante los diferentes muestreos se presenta en la Figura 8.3. El ácido graso 18:3n-3 alcanza sus mayores niveles en invierno y oscila de manera similar a como lo hace la clorofila *a* en el sistema (Tabla 8.1). Por otro lado, es el que contribuye en mayor proporción al total de ácidos grasos n-3 (Figura 8.3). El 20:5n-3 está presente en muy bajas cantidades aunque se observa un ligero aumento durante los meses de verano. Los porcentajes de 20:4n-6 y 20:5n-3 fluctúan de forma similar a los niveles de HUFA n-6 y HUFA n-3, respectivamente, excepto en el periodo de primavera, cuando éstos muestran un agudo aumento.

8.3.1.2. Análisis de correlación canónica

El porcentaje en ácidos grasos de los diferentes estadios de desarrollo de *A. persimilis* se recoge en la Tabla 8.3. En el resumen del análisis de correlación canónica (Tabla 8.4) se muestra la pérdida y el ajuste del modelo por cada conjunto en cada dimensión. Los valores de pérdida y ajuste informan de cuánto se ajusta la solución del análisis a la asociación entre los conjuntos. El valor de ajuste máximo es siempre el número de dimensiones (2 en este caso) y en la tabla se obtiene un valor de 1,935 lo que indica un buen ajuste de la solución. La pérdida media de las dos dimensiones (0,065) informa de la diferencia entre el máximo ajuste y el real (2-1,935). Los autovalores (0,993 y 0,942) muestran una distribución de cargas de explicación de la varianza del modelo muy parecida en las dos dimensiones, aunque algo superior en la dimensión 1 con respecto a la 2.

Las saturaciones en los componentes (Tabla 8.5) indican las correlaciones de cada una de las variables bioquímicas (ácidos grasos) y ambientales originales con el primer par de variables canónicas (primera variable canónica bioquímica y primera variable canónica ambiental), respectivamente. Es en la dimensión 1 de la primera variable canónica ambiental donde dominan la temperatura, la clorofila *a* y el oxígeno. Las dos primeras variables canónicas predicen un incremento en el porcentaje de poliinsaturados, 18:3n-3 y n-3 y un descenso en los niveles de: 20:5n-3, HUFA n-3, 16:1n-7, 16:1n-9, HUFA n-6 y 20:4n-6, a elevadas concentraciones de clorofila *a* y oxígeno y a bajas temperaturas. Este comportamiento se observa en el diferente signo y valor del coeficiente de correlación, positivo en clorofila *a* y oxígeno, y negativo en temperatura.

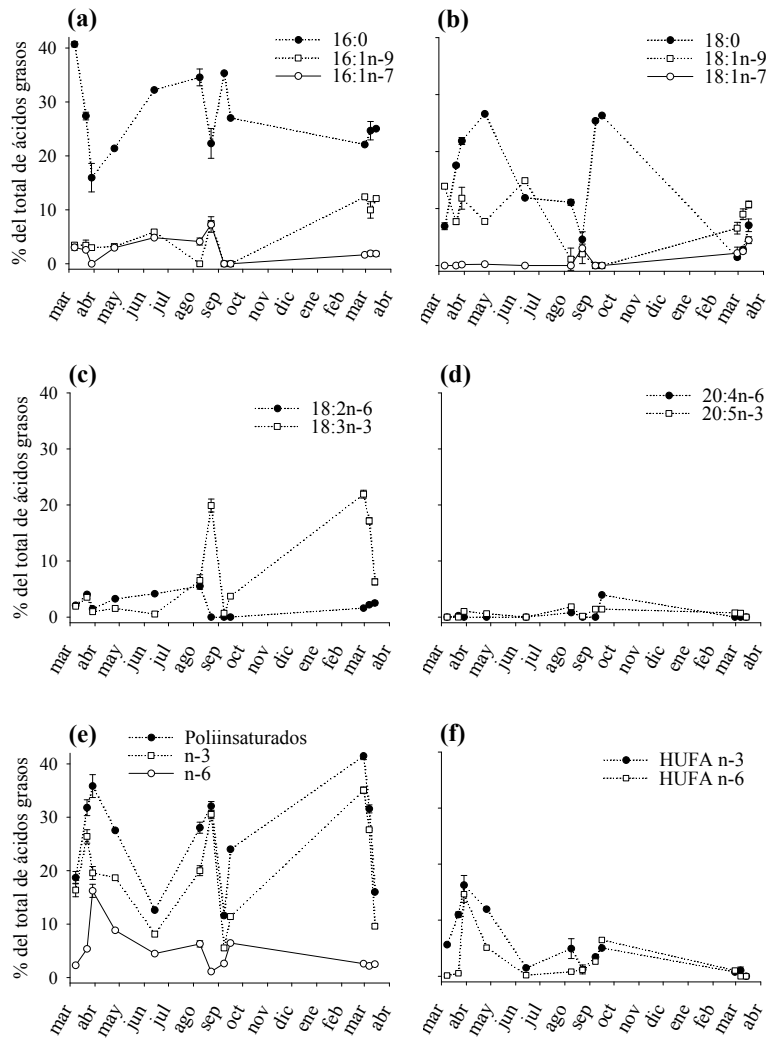


Figura 8.3. Variación estacional en el contenido (porcentaje del total de ácidos grasos) de (a) 16:0, 16:1n-9, 16:1n-7; (b) 18:0, 18:1n-9, 18:1n-7; (c) 18:2n-6, 18:3n-3; (d) 20:4n-6, 20:5n-3; (e) Poliinsaturados (PUFA), n-3 (PUFA n-3), n-6 (PUFA n-6); (f) HUFA n-3 (PUFA n-3 de 20 o más carbonos), HUFA n-6 (PUFA n-6 de 20 o más carbonos) analizado en el seston.

Tabla 8.3. Variación estacional en el contenido de ácidos grasos (porcentaje del total) de los diferentes estadios de desarrollo de la población de *A. persimilis* (ALG) cultivada en mesocosmos. Los datos se presentan como medias (desviación típica) (n=3).

	16:0	16:1n-9	16:1n-7	18:0	18:1n-9	18:1n-7	18:2n-6	18:3n-3	20:4n-6	20:5n-3	Polinsat.	n-3	n-6	HUFA n-3	HUFA n-6
ADULTOS															
Abril	12,2 (0,6)	0,7 (0,0)	7,3 (0,1)	6,9 (1,4)	12,9 (0,2)	13,2 (0,3)	3,7 (0,0)	20,0 (0,5)	0,8 (0,0)	8,0 (0,0)	39,9 (0,8)	33,6 (0,7)	4,9 (0,1)	8,6 (0,1)	1,2 (0,1)
Mayo	11,3 (0,2)	0,0 (0,0)	5,7 (0,1)	9,2 (0,3)	17,3 (0,3)	17,0 (0,2)	3,5 (0,0)	13,0 (0,2)	0,9 (0,0)	12,9 (0,2)	33,3 (1,0)	28,3 (0,5)	4,5 (0,0)	13,1 (0,2)	0,9 (0,0)
Junio	11,6 (0,4)	1,1 (0,3)	6,3 (0,8)	9,2 (0,0)	25,5 (0,9)	13,0 (0,7)	3,4 (0,1)	9,2 (0,5)	2,7 (0,2)	9,1 (0,4)	26,4 (0,2)	19,7 (0,2)	6,1 (0,2)	9,2 (0,5)	2,7 (0,2)
Septiembre	13,3 (0,4)	0,4 (0,2)	1,9 (0,4)	10,3 (0,6)	15,3 (0,1)	9,3 (0,5)	5,0 (0,2)	26,3 (1,5)	0,5 (0,0)	3,2 (0,2)	43,2 (1,5)	35,4 (1,6)	5,7 (0,1)	4,8 (0,2)	0,8 (0,0)
Febrero	12,2 (0,4)	0,6 (0,1)	3,0 (0,1)	9,1 (0,3)	17,5 (0,3)	11,6 (0,2)	5,6 (0,2)	22,8 (0,6)	0,5 (0,0)	5,4 (0,1)	40,1 (0,8)	32,5 (0,7)	6,3 (0,2)	5,9 (0,2)	0,7 (0,0)
Marzo	11,7 (0,3)	0,8 (0,0)	1,5 (0,1)	6,7 (0,6)	17,7 (0,4)	8,2 (0,4)	2,8 (0,1)	25,8 (0,8)	0,2 (0,0)	3,6 (0,1)	45,3 (0,9)	38,4 (1,0)	3,1 (0,1)	3,7 (0,2)	0,4 (0,0)
JUV.															
Abril	12,5 (0,3)	0,6 (0,0)	5,5 (0,2)	7,3 (0,4)	11,6 (0,2)	11,8 (0,4)	3,8 (0,0)	22,7 (0,2)	0,8 (0,0)	7,1 (0,1)	42,0 (1,0)	35,5 (0,1)	5,3 (0,0)	7,6 (0,1)	1,5 (0,0)
Mayo	12,0 (0,0)	0,3 (0,0)	5,7 (0,3)	9,3 (0,3)	16,8 (0,2)	17,0 (0,3)	3,6 (0,0)	13,0 (0,3)	0,8 (0,0)	12,6 (0,4)	33,5 (0,1)	27,7 (0,0)	4,4 (0,1)	12,8 (0,4)	0,8 (0,1)
Marzo	11,6 (0,1)	0,8 (0,0)	1,9 (0,1)	6,7 (0,1)	16,8 (0,6)	10,4 (0,1)	3,0 (0,3)	23,1 (0,3)	0,3 (0,0)	4,9 (0,2)	43,6 (0,2)	36,8 (0,7)	3,3 (0,4)	5,2 (0,2)	0,3 (0,1)
MET.															
Abril	12,8 (0,3)	0,6 (0,0)	3,8 (0,5)	7,4 (0,1)	10,9 (0,2)	9,0 (0,1)	4,4 (0,1)	26,2 (0,8)	0,9 (0,0)	5,9 (0,2)	44,8 (0,7)	37,8 (0,6)	6,0 (0,1)	6,4 (0,2)	1,7 (0,0)
Mayo	12,9 (0,0)	0,4 (0,0)	5,3 (0,0)	9,3 (0,0)	15,5 (0,3)	14,9 (0,3)	4,3 (0,0)	16,4 (0,1)	0,6 (0,0)	9,1 (0,0)	34,4 (0,2)	28,3 (0,2)	5,0 (0,0)	9,3 (0,1)	0,6 (0,0)
Marzo	9,2 (0,3)	0,6 (0,0)	1,6 (0,1)	10,7 (0,4)	16,1 (0,5)	14,0 (0,5)	2,8 (0,1)	17,1 (0,7)	0,4 (0,1)	7,6 (0,3)	37,0 (1,5)	32,6 (1,4)	3,2 (0,1)	8,0 (0,4)	0,4 (0,1)
NAU.															
Abril	11,9 (0,1)	0,4 (0,3)	7,2 (0,4)	6,8 (0,1)	11,8 (0,3)	13,4 (0,4)	3,9 (0,0)	20,7 (0,4)	0,7 (0,0)	8,4 (0,0)	41,0 (0,8)	34,6 (0,6)	5,2 (0,0)	9,1 (0,0)	1,3 (0,1)
Mayo	11,5 (0,5)	0,3 (0,1)	4,2 (0,1)	12,5 (2,0)	15,6 (0,6)	16,0 (0,5)	3,2 (0,1)	18,6 (0,6)	0,6 (0,0)	7,6 (0,3)	34,1 (1,9)	29,4 (1,4)	3,8 (0,2)	8,1 (0,6)	0,6 (0,0)
Marzo	12,9 (0,0)	0,8 (0,0)	1,9 (0,1)	8,2 (0,3)	17,5 (0,4)	7,0 (0,8)	2,4 (0,2)	26,8 (0,1)	nd	1,7 (0,7)	41,5 (0,2)	38,4 (0,1)	2,4 (0,2)	2,2 (0,8)	nd
QUISITES															
Abril	11,8 (0,1)	0,5 (0,0)	9,2 (0,1)	3,9 (0,0)	15,2 (0,1)	10,4 (0,1)	3,9 (0,1)	22,7 (0,3)	0,6 (0,0)	6,9 (0,1)	40,7 (0,5)	35,7 (0,4)	5,4 (0,1)	8,0 (0,1)	0,9 (0,0)
Mayo	11,3 (0,0)	0,9 (0,0)	7,5 (0,1)	4,7 (0,1)	15,9 (0,1)	9,5 (0,1)	3,6 (0,0)	25,5 (0,1)	0,5 (0,0)	6,8 (0,0)	42,9 (0,1)	38,4 (0,1)	4,4 (0,0)	7,7 (0,0)	0,7 (0,0)
Septiembre	13,3 (0,1)	0,6 (0,0)	2,5 (0,0)	6,8 (0,0)	15,1 (0,2)	6,6 (0,1)	5,1 (0,0)	34,4 (0,2)	0,2 (0,0)	2,7 (0,1)	49,0 (0,4)	43,2 (0,8)	5,3 (0,1)	3,8 (0,2)	0,2 (0,0)
Febrero	12,0 (0,1)	0,7 (0,0)	2,1 (0,0)	5,8 (0,0)	15,4 (0,0)	5,9 (0,1)	4,3 (0,0)	36,8 (0,0)	0,2 (0,0)	1,8 (0,0)	52,2 (0,0)	47,4 (0,1)	4,6 (0,0)	3,1 (0,1)	0,3 (0,0)
Marzo	12,3 (0,1)	0,9 (0,0)	2,1 (0,0)	4,9 (0,1)	17,2 (0,0)	6,0 (0,1)	3,4 (0,4)	34,1 (0,1)	0,1 (0,0)	2,1 (0,0)	49,2 (0,4)	45,3 (0,1)	3,6 (0,4)	3,4 (0,1)	0,2 (0,0)

Polinsat.: ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs); n-3: PUFAs n-3; n-6: PUFAs n-6; HUFA n-3: PUFAs n-3 de 20 o más carbonos; HUFA n-6: PUFAs n-6 de 20 o más carbonos. NAU.: nauplios; MET.: metanauplios; JUV.: juveniles.

Tabla 8.4. Resumen del análisis canónico de correlaciones.

		Dimensión		Suma
		1	2	
Pérdida	Conjunto 1	0,007	0,058	0,065
	Conjunto 2	0,007	0,058	0,065
	Media	0,007	0,058	0,065
Autovalor		0,993	0,942	
Ajuste				1,935

Tabla 8.5. Correlaciones de las variables bioquímicas y ambientales originales con el primer par de variables canónicas.

Variables originales	Dimensión	
	1	2
	Primer par de variables canónicas	
Bioquímicas	Primera variable canónica bioquímica	
16:0	-0,01	-0,11
16:1n-9	-0,60	-0,13
16:1n-7	-0,66	-0,05
18:0	-0,06	-0,28
18:1n-9	-0,26	-0,48
18:1n-7	-0,40	-0,22
18:2n-6	0,13	-0,30
18:3n-3	0,62	0,17
20:4n-6	-0,75	-0,16
20:5n-3	-0,56	-0,25
Poliinsaturados	0,64	0,32
n-3	0,66	0,27
n-6	-0,39	-0,26
HUFA n-3	-0,58	-0,31
HUFA n-6	-0,82	0,38
Ambientales	Primera variable canónica ambiental	
Temperatura (°C)	-0,75	-0,30
Oxígeno (mg l ⁻¹)	0,74	-0,56
Clorofila <i>a</i> (µg l ⁻¹)	0,63	0,03

n-3: ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) n-3; n-6: PUFAs n-6; HUFA n-3: PUFAs n-3 de 20 o más carbonos; HUFA n-6: PUFAs n-6 de 20 o más carbonos.

En la Figura 8.4 se muestra el gráfico de saturaciones en componentes que representa las cargas de los componentes para variables simples en el espacio de las dos dimensiones.

La representación de las 59 muestras de biomasa y quistes de la población de *A. persimilis* en función del primer par de variables canónicas, se representa en la Figura 8.5. Se observa una distribución en relación a la clase de edad (adultos, juveniles, metanauplios, nauplios y quistes) y a la estación de muestreo. Mientras que los periodos de primavera-verano (Abril, Mayo, Junio) registran las temperaturas más altas y las concentraciones de clorofila *a* y oxígeno más bajas (cuadrante izquierdo de la dimensión 1), los meses de invierno (Febrero, Marzo) son los que presentan temperaturas más bajas y concentraciones de clorofila *a* y oxígeno más altas (cuadrante derecho de la dimensión 1). En este sentido, las muestras de los periodos más fríos, presentan porcentajes más elevados de los ácidos grasos poliinsaturados, entre ellos los n-3, en particular el 18:3n-3. Por el contrario, en los meses más calurosos (excepto septiembre), hay una tendencia al descenso de estos ácidos grasos y a un aumento de los HUFA n-3 (20:5n-3), HUFA n-6 (20:4n-6) y 16:1n-7. Los adultos y quistes presentan una distribución más amplia en el espacio definido por el primer par de variables canónicas que los grupos de juveniles, metanauplios y nauplios, debido a un mayor número de muestras disponibles durante el experimento (ver Apartado 8.2.2).

Observando las fluctuaciones en los porcentajes de ácidos grasos hallados en el seston (Figura 8.3) y en *Artemia* (Tabla 8.3) se aprecia que el perfil en ambos varía de forma similar excepto para los ácidos grasos 18:1n-9 y 18:1n-7. Así, el porcentaje de 18:1n-9 registrado en el seston, que alcanza su valor máximo en el periodo de primavera-verano, muestra los niveles más altos en los grupos de *Artemia* durante el periodo de invierno. Lo contrario ocurre con el porcentaje de 18:1n-7 que, siendo mayor durante los meses de invierno en el seston, aparece en mayores cantidades en las muestras de *Artemia* recolectadas en primavera. Por otro lado, los niveles de 16:0 y 16:1n-9 están presentes en proporciones menores en los ejemplares de *Artemia* en comparación con el seston.

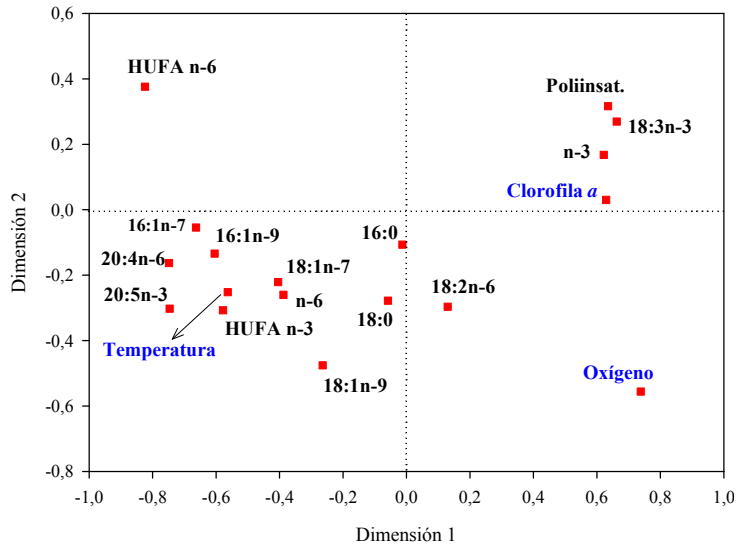


Figura 8.4. Gráfico de saturaciones en componentes. Poliinsat.: ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs); n-3: PUFAs n-3; n-6: PUFAs n-6; HUFA n-3: PUFAs n-3 de 20 o más carbonos; HUFA n-6: PUFAs n-6 de 20 o más carbonos.

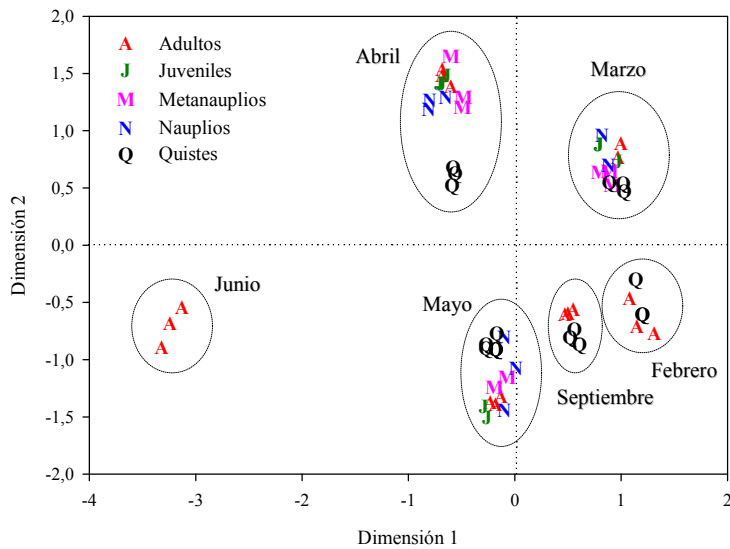


Figura 8.5. Localización de las poblaciones estudiadas en el espacio definido por el primer par de variables canónicas, cuando se utilizan los estadios de desarrollo y el periodo de muestreo como factores de clasificación.

8.3.1.3. Análisis discriminante

Los resultados del análisis discriminante sobre los porcentajes de ácidos grasos hallados en las muestras de adultos, juveniles, metanauplios, nauplios y quistes (Tabla 8.3) se muestran en la Tabla 8.6. Las cuatro funciones discriminantes son estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$). La primera función es la que presenta el autovalor más elevado y, por lo tanto, es la que mayor poder de discriminación presenta en el modelo. Las cuatro funciones explican el 100% de la varianza encontrada. Los altos niveles de correlación canónica (Tabla 8.6) indican que las funciones discriminantes explican gran parte de la variabilidad existente entre los grupos.

La lambda de Wilks puede convertirse en una función χ^2 , con lo que se puede probar su significación. Cuanto más baja es la significación más variabilidad queda explicada con la siguiente función en el modelo. El primer valor de significación que aparece se refiere a la probabilidad de que la discriminación ofrecida por la primera función que se va a calcular no sea importante. En las 4 primeras funciones esta discriminación es muy importante, tal y como demuestran las bajas probabilidades encontradas (ver nivel de significación en Tabla 8.6).

Tabla 8.6. Resultados y significación de las funciones discriminantes obtenidas tras el análisis discriminante de los porcentajes de los 15 ácidos grasos analizados en *Artemia*.

Función discr.	Auto-valor	% Var.	% Acum.	Correl. canónica	Tras la función	Lambda Wilks	χ^2	Grados libertad	Sig.
					0	0,000761	344,679	60	0,000
1	56,6980	89,81	89,81	0,9913	1	0,043911	150,029	42	0,000
2	4,0042	6,34	96,15	0,8945	2	0,219739	72,735	26	0,000
3	1,8075	2,86	99,02	0,8024	3	0,616922	23,185	12	0,026
4	0,6209	0,98	100,00	0,6189					

Función discr.: función discriminante; Var.: varianza; Acum.: var. acumulada; Correl. canónica: correlación canónica; Sig.: nivel de significación.

En la Figura 8.6 se representa la clasificación de todos los grupos estudiados utilizando únicamente las dos primeras funciones discriminantes. Se observa que entre quistes y biomasas hay una separación muy clara y que entre las biomasas, aunque la separación también se aprecia, no está tan marcada entre adultos y juveniles.

En la Figura 8.7 se representan los centroides (valores que toman las funciones discriminantes resueltas para las medias de las variables discriminatorias de cada grupo) calculados para las cuatro primeras funciones discriminantes. Aunque en general, la correlación entre las distintas variables (ácidos grasos) con las funciones discriminantes es baja (Tabla 8.7), se puede determinar qué variables son las que más contribuyen a la discriminación entre los distintos estadios de desarrollo. Los porcentajes de ácidos grasos que mayor peso tienen en la primera función discriminante son el 18:0, 18:1n-7 y los PUFAs n-3. El ANOVA sobre las medias de los grupos en la primera función discriminante mostró diferencias significativas entre los distintos estadios de desarrollo. La posterior prueba de Tukey halló diferencias entre quistes y biomasas, distinguiendo, a su vez, dentro de éstas, al grupo de los adultos (Figura 8.7). En los quistes el porcentaje de PUFAs n-3 es muy elevado (media de 42%) mientras que en biomasas este valor muestra un porcentaje medio de 30. La segunda función discriminante distingue a metanauplios y nauplios por presentar los primeros mayores niveles de PUFAs n-6. Los ácidos grasos que más influyen en la tercera función discriminante son los C18, PUFAs n-3 (18:3n-3), HUFA n-6 (20:4n-6) y HUFAs n-3 (Tabla 8.7). Aunque la prueba *a posteriori* de los datos no reveló diferencias significativas entre todos los grupos, se observa una tendencia hacia la disminución en el porcentaje de 18:0, 18:1 y HUFAs y al aumento de los PUFAs n-3 en los estadios más tempranos de desarrollo de *Artemia*. Los adultos se distinguen de los juveniles en la cuarta función discriminante, en la que se observa una alta correlación con los ácidos grasos 18:0, PUFAs n-6, PUFAs n-3 y HUFA n-6, entre otros (Tabla 8.7). Así, los juveniles presentan una mayor proporción de PUFAs n-3 y menor de HUFAs n-6 que los especímenes adultos.

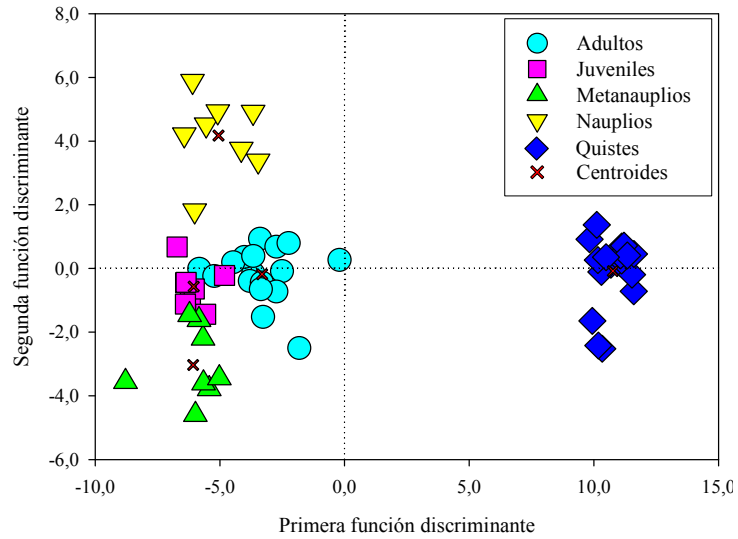


Figura 8.6. Gráfico de dispersión de los distintos grupos (estadios de desarrollo de *Artemia*), para las cuatro funciones discriminantes obtenidas tras el análisis discriminante.

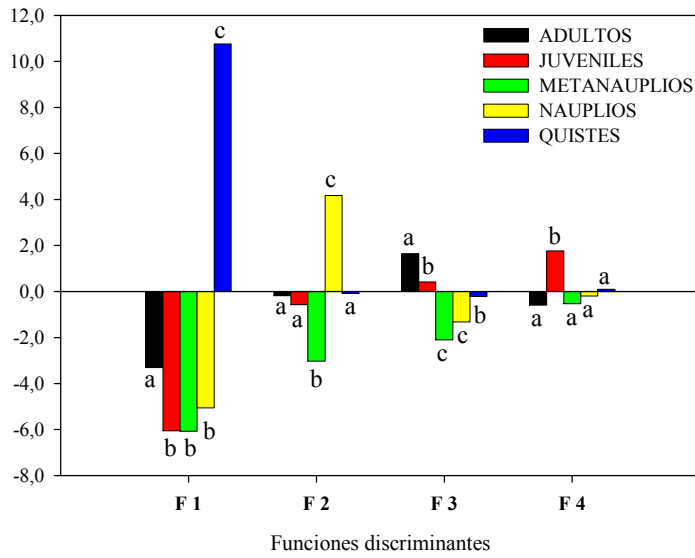


Figura 8.7. Centroides de los distintos grupos, para las cuatro funciones discriminantes obtenidas tras el análisis discriminante. Los grupos que comparten una misma letra en cada función no son significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

Tabla 8.7. Coeficientes estructurales de las funciones discriminantes obtenidas tras el análisis discriminante de los porcentajes de ácidos grasos analizados en *Artemia*.

	Función discriminante			
	1	2	3	4
16:0	0,008	0,067	0,124	0,059
16:1n-9	0,047	-0,052	0,092	0,149
16:1n-7	0,027	0,070	0,048	0,025
18:0	-0,130	0,053	-0,020	-0,428
18:1n-9	0,007	0,005	0,341	-0,248
18:1n-7	-0,104	0,033	0,045	-0,042
18:2n-6	0,028	-0,098	0,159	-0,252
18:3n-3	0,109	0,021	-0,153	0,148
20:4n-6	-0,051	-0,080	0,224	-0,212
20:5n-3	-0,060	-0,043	0,065	0,022
Poliinsat.	0,088	-0,033	-0,122	0,272
n-3	0,110	-0,001	-0,217	0,290
n-6	0,001	-0,113	0,219	-0,295
HUFA n-3	-0,048	-0,037	0,068	0,005
HUFA n-6	-0,046	-0,064	0,172	-0,182

Poliinsat.: ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs); n-3: PUFAs n-3; n-6: PUFAs n-6; HUFA n-3: PUFAs n-3 de 20 o más carbonos; HUFA n-6: PUFAs n-6 de 20 o más carbonos

8.3.2. Perfil de ácidos grasos en dos especies de *Artemia* en coexistencia

La Tabla 8.8 muestra los contenidos en ácidos grasos hallados en individuos (P, F) y biomasas (BP, BF) y los coeficientes de variación (CV), de las dos poblaciones *A. persimilis* y *A. franciscana* cultivadas coexistiendo en mesocosmos. Los CV más elevados corresponden a los análisis realizados sobre los individuos (CV entre 9 y 46%), mientras que en las biomasas muestran menor variabilidad (CV entre 0,4 y 24%).

El análisis previo al PCA mostró un valor de KMO de 0,69, excediendo el valor recomendado de 0,6. La prueba de Bartlett resultó estadísticamente significativa ($P=0,000$) asumiendo la factibilidad de la matriz de correlaciones para el PCA. Éste revela tres componentes con autovalores mayores que 1, explicando el 52,8, 19,3 y 13,1% de la varianza, respectivamente. Siguiendo el criterio de extracción de factores según el *screeplot* de Cattell (1966) se decidió retener los dos primeros componentes, explicativos del 72% de la varianza, para llevar a cabo los análisis posteriores.

Tabla 8.8. Ácidos grasos más abundantes (porcentaje del total de ácidos grasos) de individuos (P y F) y biomasas (BP y BF) de las poblaciones de *A. persimilis* y *A. franciscana* coexistiendo en mesocosmos. Los datos de P y F se presentan como medias de n=9 y n=10, respectivamente. BP y BF son la media de n=3. Se muestran los coeficientes de variación (CV) para cada conjunto de datos.

Ácido graso	Individuos				Biomasas			
	P	cv	F	cv	BP	cv	BF	cv
16:0	11,4	9,3	13,5	20,2	11,6	3,3	14,0	3,2
16:1n-9	1,4	26,7	1,3	26,8	1,1	24,0	0,9	2,4
16:1n-7	6,6	46,3	7,4	41,0	6,3	13,3	8,8	2,3
18:0	8,7	22,6	5,5	24,3	9,2	0,4	5,2	6,7
18:1n-9	24,6	11,2	23,4	13,1	25,5	3,4	23,4	2,2
18:1n-7	12,9	15,7	10,6	22,6	13,0	5,2	10,1	2,9
18:2n-6	3,4	27,0	5,2	14,3	3,4	2,9	5,0	0,7
18:3n-3	10,0	20,5	14,4	24,5	9,2	5,9	13,2	6,3
20:4n-6	2,4	32,3	1,5	29,2	2,7	6,3	1,3	7,4
20:5n-3	7,7	30,6	5,9	13,7	9,1	4,0	5,2	4,6
Poliinsat.	25,7	16,8	31,6	11,7	26,4	0,8	29,0	4,6
n-3	19,0	16,7	23,2	17,3	19,7	1,2	21,5	4,1
n-6	5,9	18,8	7,0	13,1	6,1	2,6	6,5	1,3
HUFAn-3	7,8	28,1	6,3	12,5	9,2	4,9	5,7	3,9
HUFAn-6	2,5	31,3	1,6	26,9	2,7	7,9	1,3	9,1

Poliinsat.: ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs); n-3: PUFAs n-3; n-6: PUFAs n-6; HUFA n-3: PUFAs n-3 de 20 o más carbonos; HUFA n-6: PUFAs n-6 de 20 o más carbonos.

La Tabla 8.9 recoge las puntuaciones de los ácidos grasos en el primer y segundo componente calculado, así como las comunalidades. Los ácidos grasos 20:4n-6, 18:3n-3, 18:0, 18:1n-7 y 20:5n-3 son los que presentan los valores de comunalidad más elevados y, por lo tanto, explican la mayor parte de la varianza, siendo los que mayor información aportan en la representación bidimensional de los nuevos componentes. Las variables muestran una alta correlación con el PC1 (eje horizontal) y baja con el PC2 (eje vertical) (Figura 8.8). Los ácidos grasos con signo positivo en el PC 1 son el 20:4n-6, 18:0, 20:5n-3 y 18:1n-7, mientras que el 18:3n-3, 18:2n-6 y 16:1n-7 presentan signo negativo. Basándonos en la composición de estos ácidos grasos, las especies se pueden distinguir claramente (Figura 8.8). Independientemente de que se trate de muestras de individuos aislados o biomasas, *A. franciscana* queda situada a la izquierda, y *A. persimilis* a la derecha del gráfico. Estos resultados evidencian la mayor proporción de 20:4n-6, 18:0, 20:5n-3, y 18:1n-7 en *A. persimilis* y de 18:3n-3, 18:2n-6, 16:1n-7 y 16:0 en *A. franciscana*. Se ha de destacar que las réplicas de los individuos

número 10 de *A. franciscana* y número 5 de *A. persimilis* quedan agrupadas con la especie contraria, lo que estaría indicando básicamente, que se trata de puntuaciones fuera de rango (*outliers*).

El análisis de la varianza (ANOVA) de las puntuaciones de los objetos en los nuevos factores revela diferencias significativas entre ambas especies en el PC1 ($F=9,52$, $P<0,05$) mientras que en el PC2 no se detectan diferencias significativas ($F=0,65$, $P>0,05$).

Tabla 8.9. Coeficientes de correlación de cada una de las variables originales con las componentes principales (PC1, PC2) y comunalidades.

<i>Ácidos grasos</i>	PC1	PC2	Comunalidades
16:0	-0,49	-0,19	0,28
16:1n-9	-0,19	0,80	0,68
16:1n-7	-0,57	-0,71	0,82
18:0	0,95	-0,03	0,90
18:1n-9	0,56	0,34	0,42
18:1n-7	0,85	-0,40	0,87
18:2n-6	-0,72	0,13	0,54
18:3n-3	-0,73	0,61	0,90
20:4n-6	0,96	0,15	0,95
20:5n-3	0,89	0,26	0,85
Varianza explicada (%)	52,83	19,25	-

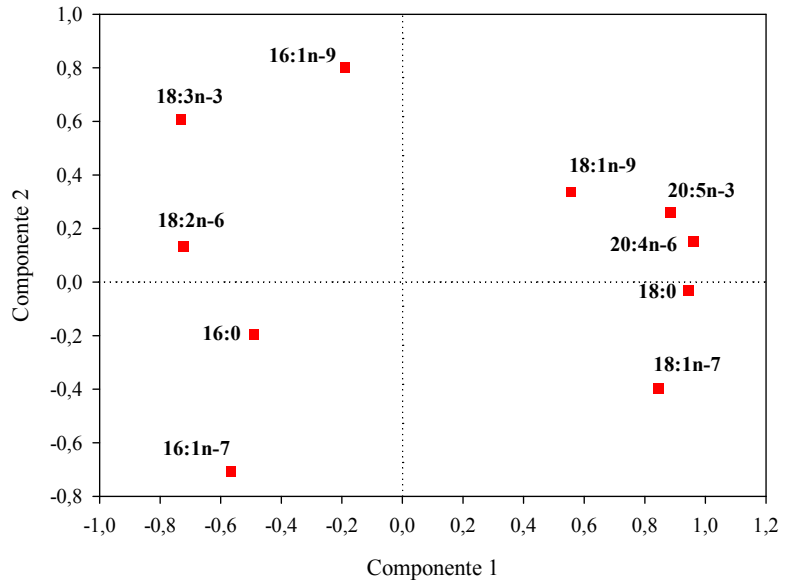


Figura 8.8. Gráfico de los coeficientes de las variables en los nuevos componentes principales.

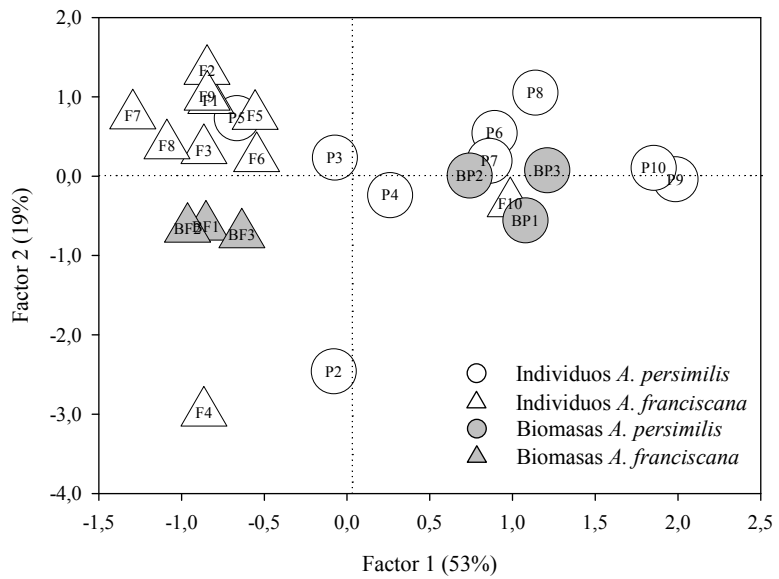


Figura 8.9. Gráfico de puntuaciones de los objetos en los nuevos componentes principales resultantes tras el PCA de los ácidos grasos analizados (porcentaje del total) en individuos y biomasa de *A. persimilis* (círculos) y *A. franciscana* (triángulos).

8.4 DISCUSIÓN

8.4.1. Estudio de la variación estacional en la composición de ácidos grasos en *A. persimilis*

Las características físico-químicas y biológicas medidas en el seston durante un tiempo prolongado, permiten estudiar la variabilidad estacional a la que está sometido el cultivo de *Artemia* al aire libre. El estudio de correlación entre las variables revela que los niveles más altos de oxígeno se registran, como sería de esperar, en los periodos de mayor producción fitoplanctónica (mayor concentración de clorofila *a*), que coinciden, a su vez, con la menor temperatura registrada.

Los resultados de este experimento muestran que los porcentajes de PUFAs n-3 medidos en el seston presentan tres picos importantes a lo largo del periodo de muestreo: uno al inicio de la primavera, otro en verano y, el más elevado, registrado en invierno. Estas fluctuaciones coinciden con la concentración de clorofila *a* medida en esos mismos periodos apuntando hacia la abundancia de las clorofíceas en el medio (Sargent y cols., 1988), en este caso, concretamente de *Dunaliella* sp. Por otro lado, las cianofíceas, que presentan elevados porcentajes de 18:1n-7, parecen aumentar en los meses de invierno, tal y como demuestra el incremento del porcentaje de 18:1n-7 en el seston durante ese periodo. Los porcentajes de HUFAs n-3 y HUFAs n-6 son muy bajos en general, excepto en primavera y verano cuando aumentan los ácidos grasos C20 y C22 debido posiblemente a la proliferación de diatomeas (20:5n-3) y dinofíceas (22:5n-6) (Sargent y cols., 1988). En los meses de verano el ácido graso que contribuye principalmente a la fracción de los HUFAs n-3 es el 20:5n-3, y además se evidencia un ascenso importante de 16:1n-7, indicando la abundancia de diatomeas en este periodo. Parrish y cols. (2000) llevaron a cabo un análisis detallado de los ácidos grasos biomarcadores del fitoplancton en un estudio realizado en Trinity Bay (Newfoundland, Canadá). Observaron una clara predominancia de los principales ácidos grasos biomarcadores de diatomeas (16:1n-7 y 20:5n-3) durante los meses de primavera. En este caso, sin embargo, debe tenerse en cuenta que la salinidad registrada era la del agua de mar (30-35 mg l⁻¹) y, por lo tanto, la elevada proliferación de diatomeas en Trinity Bay podría estar favorecida por la baja salinidad de sus aguas, circunstancia distinta si se la compara con la salinidad hallada en las lagunas y salinas donde habita *Artemia*.

Como consecuencia de las fluctuaciones estacionales halladas en la composición de ácidos grasos del alimento, y en los parámetros

ambientales registrados, el perfil de ácidos grasos analizado en los diferentes estadios de desarrollo de *Artemia* muestra marcadas variaciones, similares en todos los grupos considerados (quistes, nauplios, metanauplios, juveniles y adultos). En el análisis de correlación canónica entre las variables ambientales y bioquímicas (ácidos grasos), los muestreos adicionales realizados en Junio y Febrero para adultos y quistes respecto a nauplios, metanauplios y juveniles, corrobora su asociación estacional, lo cual se corresponde con un mayor rango de temperatura y concentración de clorofila *a* (Tabla 8.1). Durante los meses de invierno (Febrero, Marzo) la población presenta niveles de 18:3n-3 muy elevados, indicativos de una alimentación basada en la microalga *Dunaliella* sp. Por el contrario, en los grupos muestreados durante el periodo de primavera-verano (Abril, Mayo y Junio), este ácido graso disminuye, coincidiendo con el descenso de clorofila *a* en el medio, y aumentan otros como el 20:5n-3 y 16:1n-7. Esto parece indicar que *Artemia*, en ausencia de alimento en suspensión en el medio, tiene tendencia a alimentarse del sedimento (Savage y Knott, 1998) donde predominan las diatomeas, ricas en 20:5n-3 y 16:1n-7. Este hecho se refuerza observando la fluctuación en los niveles de HUFA n-3 y HUFA n-6 detectados en la población, que reflejan los niveles hallados en el medio.

Coincidiendo con los resultados hallados en el laboratorio (Capítulo 6), la dieta modifica el perfil de ácidos grasos de *Artemia* cuando es cultivada en mesocosmos. Sin embargo, el incremento en la proporción de HUFA n-3 y HUFA n-6 registrado en los animales a medida que la temperatura ambiente aumenta contradice en parte los resultados presentados en el Capítulo 7, donde se concluyó que un descenso de temperatura produce un aumento en el porcentaje de HUFAs del total de ácidos grasos. En este sentido, el presente estudio demuestra que, bajo condiciones ambientales naturales, es el alimento predominante y no la temperatura ambiental, el componente que determina en mayor medida el perfil de ácidos grasos de la población de *Artemia*. Sin embargo, es interesante destacar que determinados ácidos grasos (16:0, 16:1n-9, 18:1n-9 y 18:1n-7) aparecen en *Artemia* en cantidades independientes de las halladas en el alimento. Esto aboga claramente en favor de una intervención metabólica sobre el perfil de ácidos grasos de las poblaciones, coincidiendo con los resultados obtenidos bajo condiciones de laboratorio. Por lo tanto, los resultados presentados evidencian que la composición en ácidos grasos de los animales no solo está determinada por la dieta (efecto ambiental) sino que la actividad metabólica (efecto genotípico), propia

de cada una las poblaciones de *Artemia*, condiciona en parte su perfil lipídico.

La dinámica de los procesos metabólicos que tienen lugar en *Artemia* tras la alimentación con una determinada dieta puede asociarse a factores como el estadio de desarrollo de los animales (Wache y Laufer, 1998). Los distintos grupos de edad presentan diferencias en la composición de ácidos grasos, tal y como ha revelado el análisis discriminante. Los cambios ontogénicos muestran en general una tendencia al descenso de 16:1n-7 y de PUFAs n-3 (18:3n-3), y a un aumento de C18:1, HUFAs n-3 (20:5n-3) y HUFAs n-6 (20:4n-6) a medida que el animal crece. Los primeros estadios reflejan más claramente el perfil de ácidos grasos de la dieta consumida que los estadios de desarrollo más avanzados, aunque queda patente el efecto del alimento en todos ellos. Otros autores como Watanabe y cols. (1978b) y Schauer y cols. (1980) analizaron las proporciones relativas de ácidos grasos de quistes y nauplios de diferentes poblaciones de *Artemia* sin hallar variaciones significativas. Benijts y cols. (1975) también llegaron a las mismas conclusiones después de analizar nauplios y metanauplios. Por el contrario, Navarro y cols. (1991) observaron que el porcentaje de 16:1n-7 es mayor en quistes que en nauplios mientras que el 20:5n-3 aumenta, coincidiendo con los resultados aquí hallados.

El hecho de que los primeros estadios de desarrollo reflejen de una forma más notoria el perfil de la dieta que los adultos, puede explicarse por varias causas. Por un lado, las edades más tempranas tienden a acumular los ácidos grasos procedentes de la dieta como reserva lipídica. De hecho, Navarro y cols. (1991) observan una disminución en el porcentaje de lípidos neutros (principales lípidos de reserva) entre quistes y metanauplios, lo que indica la mayor utilización de ácidos grasos como fuente de energía, y/o para la biosíntesis de fosfolípidos, en las sucesivas etapas de desarrollo de *Artemia*. Por otro lado, al igual que se ha observado en copépodos (Kattner y cols., 1994), es posible que la bioconversión (elongación y desaturación) de determinados ácidos grasos procedentes de la dieta se vaya desarrollando progresivamente con el crecimiento de *Artemia*. Esto se corrobora en el presente estudio por los mayores porcentajes de HUFAs hallados en las fases más adultas del crustáceo.

8.4.2. Estudio comparativo del perfil de ácidos grasos en dos especies de Artemia en coexistencia

La aproximación de este estudio a escala de mesocosmos ha posibilitado conocer la composición de ácidos grasos de dos especies

de *Artemia* en coexistencia (*A. persimilis* y *A. franciscana*). Al coexistir en el mesocosmos, las dos poblaciones de *A. franciscana* y *A. persimilis* comparten los mismos recursos alimenticios y están sometidas a idénticas condiciones ambientales, de manera que se elimina así una fuente importante de variabilidad en el diseño experimental. A pesar de la igualdad en las condiciones experimentales, ambas especies muestran diferencias en los porcentajes de ácidos grasos analizados, y los resultados obtenidos señalan un mayor contenido de los principales C20 (20:5n-3, 20:4n-6) en *A. persimilis* y de 18:2n-6 y 18:3n-3 en *A. franciscana*.

Mediante el estudio del perfil de ácidos grasos de las muestras de individuos se ha podido determinar la variabilidad intraespecífica, algo escasamente reflejado en la literatura, donde los trabajos publicados analizan básicamente grupos de biomazas (Mura y cols., 1997, 1998; Cripps y cols., 1998). Así, por ejemplo, en diversos estudios de campo se han detectado diferencias interespecíficas en el perfil de ácidos grasos de anostráceos (Mura y cols., 1997), copépodos (Hagen y cols., 1993; Kattner y cols., 1994) y entre diferentes taxones de *Daphnia* spp. (Farkas, 1970), y ninguno de ellos contempla la variabilidad existente dentro de una misma especie o taxón. Entre los escasos estudios realizados en mesocosmos destaca el de Gozalbo (1990), quien señaló diferencias en la composición de ácidos grasos entre poblaciones partenogénicas y bisexuales de *Artemia*, aunque cultivadas en tanques independientes y sin considerar la variabilidad intraespecífica. En el trabajo aquí presentado se pone de manifiesto que las diferencias encontradas en el perfil de ácidos grasos entre *A. persimilis* y *A. franciscana* están asociadas a una clara variabilidad inter-específica mientras que la intraespecífica es mucho menor.

Aunque durante el presente experimento la adición de alimento (*Dunaliella* sp.) se realizó de forma periódica y controlada, las condiciones intrínsecas del diseño experimental (duración, cultivo al aire libre, volumen y superficie del tanque, etc.), favorecieron la aparición de otras especies de fitoplancton, particularmente de especies del grupo de las diatomeas bentónicas. La acumulación de diatomeas en el fondo del tanque de cultivo se hizo evidente a través del estudio de los ácidos grasos biomarcadores de diatomeas (Napolitano y cols., 1999; Dalsgaard y cols., 2003) en experimentos realizados en nuestras instalaciones (Navarro, comunicación personal). Savage y Knott (1998) observaron que la mayor parte del contenido digestivo de una población de *Artemia* procedente del lago Hayward (Australia), revelaba gran similitud con la composición microalgal y bacteriana del sedimento analizado. Estos autores pusieron de manifiesto que *Artemia* puede pasar de un

comportamiento de filtrador pasivo pelágico a un comportamiento de alimentación selectivo sobre el bentos o sedimento de los lagos.

En el presente estudio, la posibilidad de una alimentación distinta entre especies, sobre diferentes recursos alimenticios presentes en la columna de agua o en el bentos, se basa en el hecho de que el sistema (mesocosmos) puede sufrir algún tipo de estratificación térmica (al menos diurna) durante el experimento. De esta forma, las poblaciones de *Artemia* se ubicarán en la zona térmica más adecuada de acuerdo a su temperatura vital óptima. Estudios recientes establecen que *A. persimilis* está mejor adaptada a vivir a bajas temperaturas que *A. franciscana* (Medina y cols., 2007). Las diferencias en la tolerancia a diferentes rangos de temperatura pueden, en parte, explicar la distribución de ambas especies en Argentina, donde *A. persimilis* aparece confinada en el sur del país, área en la que predominan bajas temperaturas. Por lo tanto, en el cultivo en mesocosmos, *A. persimilis* ocuparía preferentemente los estratos del fondo del tanque, con temperaturas inferiores a la superficie en la época del año considerada (Enero/Junio, 2005) alimentándose de las diatomeas ricas en HUFAs depositadas sobre el sedimento, mientras que *A. franciscana* permanecería en la columna de agua, próxima a la superficie con temperaturas más elevadas, filtrando diversos tipos de células.

Hay dos hechos en los resultados obtenidos que deben considerarse en la explicación señalada anteriormente. Primero, la alimentación de *A. persimilis* sobre las diatomeas del sustrato está reflejada en la composición de las biomasas por un aumento en el porcentaje de 20:5n-3, que es un típico marcador del grupo de las diatomeas (Volkman y cols., 1998). Sin embargo, el 16:1n-7, que es también un ácido graso marcador de esta especie microalgal, no se encuentra en elevadas proporciones en *A. persimilis*, tal y como sería de esperar. En segundo lugar, la alimentación de *A. franciscana* en la columna de agua debería haber mostrado una mayor proporción de PUFAs C18 en su composición, como se evidencia en los experimentos llevados a cabo en condiciones controladas de laboratorio (Capítulo 7), ya que la principal microalga presente en la columna de agua del tanque es *Dunaliella* sp., caracterizada por su riqueza en 18:2n-6 y 18:3n-3 (Volkman y cols., 1998).

Por lo comentado hasta ahora, y en contra de lo que generalmente se menciona en la literatura, las variaciones en el perfil de ácidos grasos de poblaciones adultas de *Artemia*, aunque principalmente determinadas por el tipo de alimento, deberían interpretarse cuidadosamente frente a los cambios metabólicos que

pueden darse en los animales (Ito y cols., 1996; Zhukova y cols., 1998; Navarro y cols., 1999; Vismara y cols., 2003). Es evidente que en los branquiopodos se dan modificaciones endógenas de los ácidos grasos procedentes de la dieta (Kayama y cols., 1963; Navarro y cols., 1999). El mayor porcentaje de 20:4n-6 y la menor proporción de 18:2n-6 hallados en *A. persimilis* sugieren una mayor capacidad de bioconversión de 18:2n-6 a 20:4n-6 en *A. persimilis* si se compara con *A. franciscana*. Aunque el metabolismo lipídico en *Artemia* es muy poco conocido, esta vía metabólica ha sido propuesta en los nauplios de *Artemia* (Zhukova y cols., 1998), y su capacidad para elongar y desaturar 18:3n-3 a 20:5n-3 ha sido confirmada por Schauer y cols. (1985). Así, los resultados presentados aquí apuntan hacia una mayor tasa de bioconversión de 18:3n-3 a 20:5n-3 en *A. persimilis* que en *A. franciscana* bajo estas condiciones ambientales naturales, y se confirman los resultados incluidos en el Capítulo 7, donde los cultivos se llevaron a cabo en laboratorio y donde se hallaron evidencias que señalaban una mayor capacidad de desaturación y de elongación en *A. persimilis* respecto a *A. franciscana*. De esta manera, y como se ha planteado varias veces a lo largo de la memoria, parece haber un componente genotípico que determina un metabolismo lipídico distinto entre diversas especies de *Artemia*.

Los resultados presentados aquí ofrecen datos importantes sobre la variación en la composición de ácidos grasos en diferentes especies de *Artemia* en coexistencia. Aunque existe una importante influencia ambiental de la dieta, *A. persimilis* y *A. franciscana* siguen presentando una composición en ácidos grasos diferente, incluso a nivel individual, cuando son cultivadas a escala de mesocosmos. Por un lado, la temperatura ambiental puede estar afectando de manera importante una estratificación en la distribución de los organismos en el sistema, que condicionaría la alimentación diferencial de ambas especies en función de su temperatura vital óptima. Por otro lado, el metabolismo lipídico propio de los animales, podría explicar los mayores porcentajes de insaturación encontrados en los ácidos grasos de *A. persimilis* en comparación con *A. franciscana*. Posibles diferencias genéticas entre ambas especies estarían determinando diferentes respuestas metabólicas, en función del medio donde habitan, que conformarían en última instancia los perfiles de ácidos grasos encontrados. Este hecho se ve reforzado por las diferencias halladas también en los cultivos realizados en laboratorio (Capítulo 7) donde *A. persimilis* presenta un mayor grado de insaturación en sus ácidos grasos.

Como resumen de este capítulo puede concluirse que los experimentos llevados a cabo en condiciones de mesocosmos

demuestran una variación estacional en la composición de ácidos grasos en el medio a lo largo del año. Las elevadas proporciones de PUFAs n-3 durante el invierno reflejan la dominancia del grupo de las clorofíceas, aunque esta proliferación viene explicada en parte por la adición regular de la microalga *Dunaliella* sp. al sistema y por un régimen térmico más idóneo para la proliferación fitoplanctónica. Sin embargo, el aumento de los HUFAs n-3 y HUFAs n-6 observado en los meses de primavera-verano indica un *bloom* de diatomeas favorecido probablemente por un aumento de temperatura. La transferencia de los principales ácidos grasos biomarcadores (18:3n-3 y 20:5n-3) a través de la corta red trófica representada en el mesocosmos (fitoplancton-zooplancton) resulta obvia cuando se analiza la composición de ácidos grasos de *Artemia* en cualquiera de sus estadios de desarrollo (desde quiste hasta adulto). A pesar de ello, otros ácidos grasos (principalmente monoinsaturados) no sólo se hallan en los animales en niveles independientes a los analizados en el seston, sino que están en mayor proporción en *Artemia* durante los periodos en los que en el medio se registran en menores cantidades.

Si bien algunos grupos de ácidos grasos son adecuados como indicadores tróficos en los estudios de campo, se deben tener en cuenta otros factores tales como la dinámica de incorporación lipídica y su utilización por *Artemia*. La dinámica de los ácidos grasos en los animales está determinada, entre otras causas (p.ej. tipo de dieta), por el estado de desarrollo ontogenético de los animales. Así, el nivel de insaturación de los ácidos grasos tiende a incrementarse hacia los estadios más adultos. Sin embargo, estas diferencias constituyen variaciones mínimas en comparación con las variaciones causadas por las diferentes condiciones ambientales.

Aparte de las variaciones en el perfil de ácidos grasos que se pueden dar dentro de una misma población de *Artemia*, se han observado claras diferencias especie-específicas entre dos poblaciones coexistiendo en un mismo ambiente. Si bien hay que tener en cuenta la posibilidad de que ambas especies exploten diferentes estratos tróficos (seston/sedimento) y que la composición de ácidos grasos del alimento consumido se refleje en la del animal, parece evidente que existe un componente genético especie-específico en el perfil lipídico de las poblaciones. La especie de *Artemia*, su metabolismo (influido por la dieta disponible y/o por los diferentes estadios de desarrollo) y su capacidad de adaptación a las condiciones ambientales, son los factores determinantes de la composición en ácidos grasos de quistes y biomasas de *Artemia* en los ecosistemas donde habita.

RESUMEN

Los nauplios de *Artemia* son de uso obligado en acuicultura como alimento para la mayoría de larvas de peces y crustáceos. Su valor nutricional depende esencialmente del perfil de ácidos grasos de sus lípidos. En la actualidad existe gran cantidad de información acerca de la composición de ácidos grasos en quistes y nauplios de diferentes poblaciones de *Artemia*, sin embargo, se desconocen las causas determinantes de estos perfiles. Dado que los ácidos grasos son relativamente estables metabólicamente y algunos de ellos pueden ser asignados específicamente a un organismo dado, son especialmente útiles como biomarcadores mostrando las relaciones de predación y el destino de la materia orgánica en diversas localizaciones (Sargent y cols., 1988). Este trabajo se ha centrado en el estudio de los factores condicionantes de la composición de ácidos grasos de quistes y biomasas de *Artemia* profundizando en las relaciones tróficas que se dan en sus hábitats naturales. Al margen de su interés como recurso natural en acuicultura, el estudio de las relaciones tróficas en los ecosistemas donde habita *Artemia* es de gran relevancia desde el punto de vista de la investigación científica básica en estos crustáceos.

Gran parte del trabajo que recoge esta memoria se ha llevado a cabo utilizando como modelo *Artemia* procedente de Argentina. Ello ha venido propiciado, entre otras causas, por la oportunidad de trabajar con poblaciones de este país a raíz de la concesión y desarrollo del proyecto “Caracterización de nuevas poblaciones como origen del recurso natural quistes de *Artemia* para Acuicultura” (Ref. MCYT AGL2001-1969). La prospección de fuentes alternativas de *Artemia*, como recurso natural imprescindible en acuicultura marina, a raíz de la crisis del Gran Lago Salado de Utah (*Great Salt Lake*, GSL), ha permitido la localización de nuevas poblaciones en diversos países entre los que destaca Argentina. Estas poblaciones se hallaron en ecosistemas poco o nada estudiados, entre ellos un gran número de lagunas y lagos hipersalinos, algunos de gran extensión, de origen y localización muy diversos. Las dos especies endémicas de Sudamérica son *A. persimilis*, hasta ahora hallada sólo en Argentina y Chile, y *A. franciscana*, existente en el resto del continente americano.

El análisis de la composición de ácidos grasos de los quistes de *Artemia* procedentes de los biotopos argentinos (Capítulo 4) refleja una gran variabilidad mostrando perfiles de ácidos grasos tanto de tipo marino como de tipo dulceacuícola (Watanabe y cols., 1978a), independientemente del origen costero o continental de sus biotopos y de la composición iónica de las salmueras. Además, se han descrito por primera vez poblaciones de *A. persimilis* con elevados porcentajes de ácido eicosapentaenoico (20:5n-3, EPA).

La caracterización molecular de las poblaciones de *Artemia* permite su identificación sistemática y taxonómica, con lo que se adquiere una amplia y muy actualizada visión de la distribución de las dos especies autóctonas del continente americano. Asimismo, esta caracterización permite una primera aproximación al análisis genético con el que poder detectar patrones moleculares relacionados con los fenotipos marino/dulceacuícola. La caracterización de las poblaciones mediante marcadores moleculares (RFLPs) (Capítulo 5) ha confirmado los resultados hallados mediante análisis citogenéticos y morfológicos, mostrando una gran divergencia entre las dos especies argentinas de *Artemia*. La composición bioquímica de *Artemia* parece estar muy poco marcada por herencia genética, y posiblemente sea complejo averiguar esta influencia. Una primera aproximación molecular, de carácter meramente aleatorio, no ha permitido la localización de haplotipos adscribibles al fenotipo marino/dulceacuícola de las poblaciones de *A. persimilis*, aunque no por ello se descarta el efecto genotípico como uno de los factores determinantes de la composición en ácidos grasos de *Artemia*.

En los estudios de campo resulta difícil identificar los factores determinantes del perfil de ácidos grasos de las poblaciones debido a la gran cantidad de parámetros incontrolables. Los experimentos llevados a cabo en condiciones controladas de laboratorio han revelado que los quistes obtenidos de las poblaciones de *Artemia* alimentadas con diferentes dietas microalgales, muestran patrones similares a los del alimento suministrado, aunque no de un modo estricto (Capítulo 6). Se ha evidenciado que la dieta modifica el perfil de ácidos grasos en *Artemia* haciéndolo variar de tipo marino a dulceacuícola y viceversa. Sin embargo, ciertos ácidos grasos, en su mayoría saturados, se presentan en los quistes en niveles independientes al de los hallados en el alimento. Además, se han observado diferencias en el perfil de ácidos grasos entre poblaciones cultivadas bajo similares condiciones, hecho que sugiere un claro componente genotípico en la composición de ácidos grasos en *Artemia*. Dependiendo de la dieta suministrada (mixta/ monocultivo de diatomeas) a las poblaciones se han detectado diferencias en las tasas de supervivencia y reproducción, de manera que una dieta mixta con presencia de ácido linolénico (18:3n-3, LNA) y EPA aumenta el *fitness* de *Artemia*. El empleo de diatomeas, microalgas dotadas de una frústula de sílice y pobres en LNA, provoca una disminución en la fecundidad de estos crustáceos. Este hecho pone de manifiesto la menor calidad de un monocultivo de diatomeas comparado con un cultivo mixto para el crecimiento poblacional de *Artemia*. A pesar de compartir un mismo haplotipo, las poblaciones mostraron diferencias

notables en la fecundidad, lo que podría sugerir la existencia de diferencias genéticas intraespecíficas, no detectadas mediante los marcadores moleculares mitocondriales estudiados.

La temperatura (Capítulo 7) tiene un efecto notable sobre el perfil de ácidos grasos de *Artemia*. Así, a temperaturas más bajas se produce un aumento en el porcentaje de los ácidos grasos insaturados (HUFAs). Este hecho ha quedado demostrado tanto en quistes como en biomasas, donde además, el perfil de ácidos grasos es diferente entre especies (*A. persimilis* y *A. franciscana*) siendo esta diferencia más acusada en los primeros. Esta circunstancia vuelve a sugerir un posible efecto genotípico determinante del perfil de ácidos grasos en *Artemia*.

Los estudios realizados en mesocosmos (Capítulo 8) revelaron la influencia conjunta de diversos parámetros físico-químicos y biológicos en la composición de ácidos grasos en *Artemia*. La influencia del alimento presente en el medio dominó sobre otros factores ambientales tales como la temperatura. Aunque los diferentes estadios de desarrollo de *Artemia* mostraron distintos niveles de ácidos grasos, las variaciones estacionales afectan de un modo similar a todos ellos, reforzando la hipótesis de la plasticidad fenotípica de estos crustáceos. El trabajo con dos especies distintas (*A. persimilis/A. franciscana*) en el sistema de mesocosmos ha supuesto un mayor grado de complejidad y un nuevo reto en la investigación de las diferencias inter e intra-específicas en la composición bioquímica de dos poblaciones en coexistencia. La comparación de la abundancia relativa de los ácidos grasos entre ambas especies ha revelado que las diferencias interespecíficas son mayores que la variabilidad intraespecífica. Suponiendo que ambas poblaciones comparten un mismo hábitat, las diferencias encontradas estarían indicando la actuación de un componente genético en la determinación del perfil lipídico de ambas especies.

En conclusión, el presente estudio contribuye a la caracterización bioquímica y molecular de un gran número de poblaciones de *Artemia*, a la vez que ofrece un mayor conocimiento sobre los factores ecológicos que influyen en la composición de ácidos grasos de las poblaciones. Los posibles factores genéticos que determinan el perfil de ácidos grasos en *Artemia* se plantean como futuras líneas de investigación que permitan completar el estudio aquí presentado.

CONCLUSIONES

PRIMERA: Las prospecciones llevadas a cabo en Argentina, han evidenciado, por primera vez, la presencia de poblaciones de *A. persimilis* que producen quistes con perfil lipídico de tipo marino.

SEGUNDA: Se ha detectado la presencia de quistes con perfil dulceacuícola en ecosistemas costeros. Por lo tanto, el contenido de ácido linolénico (LNA) en los quistes de *Artemia* no es determinante para su adscripción a la localización continental/costera.

TERCERA: Se propone la relación 16:0/16:1 como un biomarcador más idóneo que el LNA para describir el carácter marino/dulceacuícola de las poblaciones de *Artemia*.

CUARTA: El perfil de ácidos grasos en *Artemia* no guarda una relación directa con la naturaleza talásica/atalásica de los biotopos donde habita.

QUINTA: La caracterización de las poblaciones de *Artemia* halladas en Argentina y en el Sur de Chile, mediante el estudio de polimorfismos de longitud en los fragmentos de restricción (RFLPs) del gen 16S rRNA, revela la presencia de las especies *A. franciscana* y *A. persimilis*, quedando delimitados sus patrones de distribución en el Cono Suramericano.

SEXTA: La diversidad genética hallada en *A. persimilis* mediante el estudio del fragmento 16S rRNA, no es explicada por el aislamiento geográfico entre poblaciones.

SÉPTIMA: No existe una asociación entre los patrones de RFLPs del 16S rRNA hallados en *A. persimilis* y sus perfiles de ácidos grasos (marino/dulceacuícola). Esta ausencia de correlación sugiere la necesidad de una búsqueda de otros marcadores moleculares, y/o regiones alternativas del genoma, para establecer la base genética de los perfiles de PUFAs en *Artemia*.

OCTAVA: Bajo condiciones forzadas de alimentación, independientemente del perfil marino/dulceacuícola original de las poblaciones y de la especie de *Artemia* considerada, la composición en ácidos grasos de los quistes puede variar de tipo marino a dulceacuícola, o viceversa, en función de la dieta suministrada. Sin embargo, existen evidencias de la influencia metabólica sobre la determinación final de la composición lipídica de quistes de *Artemia*.

NOVENA: Una dieta mixta basada en *Dunaliella* sp./*Tetraselmis suecica* es de una calidad superior, en términos de supervivencia y reproducción, que un monocultivo de la diatomea *Phaeodactylum tricorutum* para la mayor eficacia biológica de *Artemia*. Un cultivo basado en diatomeas induce oviparismo en las poblaciones. La

supervivencia y fecundidad se correlacionan positivamente con elevados niveles de LNA y bajos niveles de ácido eicosapentaenoico (EPA) en la dieta.

DÉCIMA: Las diferencias halladas en la fecundidad entre dos poblaciones de *Artemia*, que comparten un mismo haplotipo, señalan diferencias genéticas entre ambas, probablemente no detectadas mediante los marcadores moleculares mitocondriales.

UNDÉCIMA: El descenso de la temperatura provoca un aumento del grado de instauración de los ácidos grasos en *Artemia*, posiblemente como respuesta adaptativa para el mantenimiento de la fluidez de las membranas celulares.

DUODÉCIMA: Las poblaciones adultas de *A. franciscana* muestran una mayor plasticidad fenotípica que las de *A. persimilis* en su composición de ácidos grasos frente a las variaciones de temperatura. El perfil de la descendencia vendría condicionado, en parte, por el metabolismo característico de las poblaciones adultas.

DECIMOTERCERA: La transferencia de los principales ácidos grasos biomarcadores a través de la cadena trófica ha sido demostrada en un cultivo de *Artemia* en mesocosmos. En el perfil de ácidos grasos de las poblaciones experimentales (quistes y biomasas) no sólo influye el alimento consumido, sino que éste también depende del metabolismo propio de los especímenes presentes en las poblaciones, de su estado de desarrollo y de la especie considerada.

BIBLIOGRAFÍA

- Abatzopoulos, T.J., Zhang, Sorgeloos, P., 1998. International study on *Artemia* LIX: *Artemia tibetiana*: preliminary characterization of a new *Artemia* species found in Tibet (People's Republic of China). *Int. J. Salt Lake Res.*, 7, 41-44.
- Abatzopoulos, T.J., Beardmore, J.A., Clegg, J.S., Sorgeloos, P., 2002. *Artemia: Basic and Applied Biology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Londres, 286 pp.
- Abreu-Grobois, F.A., 1987. A review of the genetics of *Artemia*. En: Sorgeloos, P., Bengtson, D.A., Declair, W., Jaspers, E. (Eds.), *Artemia Research and its Applications*, vol. 1. Morphology, Genetics, Strain Characterization, Toxicology. Universa Press, Wetteren, Bélgica, pp. 61-99.
- Ackman, R.G., Jangaard, P.M., Hoyle, R.J., Brockerhoff, H., 1964. Origin of marine fatty acids. I. Analyses of the fatty acids produced by the diatom *Skeletonema costatum*. *J. Fish Res. Bd. Canada*. 21, 747-756.
- Ackman, R.G., Tocher, C.S., 1968. Marine phytoplankter fatty acids. *J. Fish Res. Bd. Canada*. 25, 1603-1620.
- Ahlgren, G., Lundsted, L., Brett, M.T., Forsberg, C., 1990. Lipid composition and food quality of some freshwater phytoplankton for cladoceran zooplankters. *J. Plankton Res.* 12, 809-818.
- Alava, V.R., Kanazawa, A., Teshima, S., Koshio, S., 1993. Effect of dietary phospholipids and n-3 highly unsaturated fatty acids on ovarian development of Kuruma prawn. *Nippon Suisan Gakkaishi* 59, 345-351.
- Albentosa, M., Cañizares, F., Hidalgo, F., 1987. Productividad natural, composición corporal y parámetros ambientales en *Artemia*. *Cuad. Marisq. Publi. Téc.* 12, 561-564.
- Álvarez-Cobelas, M., 1989. Lipids in microalgae: A review. Part II: Environment. *Grasas y Aceites* 40, 213-223.
- Amat, F., 1982. Diferenciación y distribución de las poblaciones de *Artemia* de España, IV. *Biometría de quistes y nauplios*. *Investig. Pesq.* 46, 55-62.

- Amat, F., 1985. Utilización de *Artemia* en acuicultura. Inf. Técn. Inst. Inv. Pesq. 59, 128-129.
- Amat, F., Hontoria, F., Navarro, J.C., Cohen R.G., Rodriguez Gil S.G., 1994. Aproximación preliminar a la distribución del género *Artemia* (especie *A. persimilis*) en Argentina, provincias de Buenos Aires y La Pampa. Actas del VIII Congreso Latinoamericano de Acuicultura, Santa Fe de Bogotá, Colombia, pp. 73-84.
- Amat, F., Cohen, R.G., Hontoria, F., Navarro, J.C., 2004. Further evidence and characterization of *Artemia franciscana* (Kellogg, 1906) populations in Argentina. J. Biogeogr. 31, 1735-1749.
- Amat, F., Hontoria, F., Ruiz, O., Green, A.J., Sánchez, M.I., Figueroa, J., Hortas, F., 2005. The American brine shrimp as an exotic invasive species in the western Mediterranean. Biol. Invasions 7, 37-47.
- Anderson, T.R., Pond, D.W., 2000. Stoichiometric theory extended to micronutrients: comparison of the roles of essential fatty acids, carbon and nitrogen in the nutrition of marine copepods. Limnol. Oceanogr. 45, 1162-1167.
- Angelelli, V., Schalamuk, I., Arrospide, A., 1976. Los yacimientos no metalíferos y rocas de aplicación de la región Patagonia-Comahue. Anales XVII. Ministerio de Economía, República Argentina.
- Arendt, K.E., Jónasdóttir, S.H., Hansen, P.J., Gaertner, S., 2005. Effects of dietary fatty acids on the reproductive success of the calanoid copepod *Temora longicornis*. Mar. Biol. 146, 513-530.
- Artom, C., 1931. L'origine e l'evoluzione della partenogenesi attraverso i differenti biotopi di una specie collettiva (*Artemia salina* L.) con speciale riferimento al biotipo partenogenetico di Sete. Memorie R. Accad. Ital. (Cl. Sci. fsi. Mat. Nat) 2, 1-57.
- Arts, M.T., Wainman, B.C., 1998. Lipids in Freshwater Ecosystems. Springer, Nueva York, 319 pp.

- Awise, J.C., Giblin-Davidson, C., Laerm, J., Patton, J.C., Lansman, R.A., 1979. Mitochondrial DNA clones and matriarchal phylogeny within and among geographic populations of the pocket gopher, *Geomys pinetis*. Proc. Natl. Acad. Sci. 72(12), 6694-6698.
- Awise, J.C., E. Bermingham, E., Kesler, L.G., Saunders, N.C., 1984. Characterization of mitochondrial DNA variability in a hybrid swarm between subspecies of bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*). Evolution 38, 931-941.
- Awise, J.C., 1989. Gene trees and organismal histories: a phylogenetic approach to population biology. Evolution 43, 1192-1208.
- Awise, J.C., Quattro, J.M., Vrijenhoek, R.C., 1992. Molecular clones within organismal clones. Evol. Biol. 26, 225-246.
- Awise, J.C., 1994. Molecular Markers. Natural History and Evolution. Chapman and Hall. Nueva York, 511 pp.
- Badaracco, G., Baratelli, L., Ginelli, E., Meneveri, R., Plevani, P., Valsasnini, P., Barigozzi, C., 1987. Variations in repetitive DNA and heterochromatin in the genus *Artemia*. Chromosoma 95, 71-75.
- Badaracco, G., Bellorini, M., Landsberger, N., 1995. Phylogenetic study of bisexual *Artemia* using random amplified polymorphic DNA. J. Mol. Evol. 41, 150-154.
- Baratelli, L., Barigozzi, C., 1990. Chromosome length: A differentiation parameter in the genus *Artemia*. Rendiconti Accademia Nazionale dei Lincei, Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali, Serie 9 (1), 459-464.
- Barghava, S.C., Jakher, G.R., Saxena, M.M., Sinha, R.K., 1987. Rearing *Artemia* in a salt pan near Sambhar Lake (India). En: Sorgeloos, P., Bengtson, D.A., Decler, W., Jaspers, E. (Eds.), *Artemia* research and applications. Vol. 3. Ecology, culturing and use in aquaculture. Universa Press, Wetteren, Bélgica, 556 pp.
- Barlow, D.I., Sleigh, M.A., 1980. The propulsion and use of water currents for swimming and feeding in larval and adult *Anemia*. En: Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O., Jaspers,

- E. (Eds.), The Brine Shrimp *Artemia*, Vol. 1. Universa Press, Wetteren, Bélgica, pp. 61-73.
- Bartlett, M.S., 1954. A note on multiplying factors for various chi-squared approximations, J. Royal Stat. Soc. Series B 16 296-298.
- Baxevanis, A.D., Abatzopoulos, T.J., 2004. The phenotypic response of ME₂ (M. Embolon, Greece) *Artemia* clone to salinity and temperature. J. Biol. Res. 1, 107-114.
- Baxevanis, A.D., Triantaphyllidis, G.V., Kappas, I., Triantafyllidis, A., Triantaphyllidis, C.D., Abatzopoulos, T.J., 2005. Evolutionary assessment of *Artemia tibetiana* (Crustacea, Anostraca) based on morphometry and 16S rRNA RFLP analysis. J. Zool. Syst. Evol. Res. 43, 189-198.
- Baxevanis, A.D., Kappas, I., Abatzopoulos, T.J., 2006. Molecular phylogenetics and asexuality in the brine shrimp *Artemia*. Mol. Phylogenet. Evol. 40, 724-738.
- Becker, C., Boersma, M., 2003. Resource quality effects of life histories of *Daphnia*. Limnol. Oceanogr. 48(2):700-706.
- Beebee, T., Rowe, G., 2003. An introduction of Molecular Ecology. En: Beebee, T., Rowe, G. (Eds.), Oxford University Press, Reino Unido, 320 pp.
- Bell, M.V., Henderson, R.J., Sargent, J.R., 1986. The role of polyunsaturated fatty acids in fish. Comp. Biochem. Physiol. 83(B), 711-719.
- Benijts, F., Van Voorden, E., Sorgeloos, P., 1975. Changes in the biochemical composition of early larval stages of the brine shrimp *Artemia salina* L. 10th European Symposium on Marine Biology 1, 1-9.
- Bergé, J.P., Barnathan, G., 2005. Fatty acids from lipids of marine organisms: molecular biodiversity, roles as biomarkers, biologically active compounds, and economical aspects. Adv. Biochem. Engin. Biotechnol. 96, 49-125.
- Berggreen, U., Hansen, B., Kiørboe, T., 1988. Food size spectra, ingestion and growth of the copepod *Acartia tonsa* during

- development: implications for determination of copepod production. *Mar. Biol.* 99, 341-352.
- Bermingham, E., Avise, J.C., 1986. Molecular zoogeography of freshwater fishes in the southeastern United States. *Genetics* 113, 939-965.
- Biddanda, B.A., Pomeroy, L.R., 1988. Microbial aggregation and degradation of phytoplankton-derived detritus in seawater. I. Microbial succession. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 42, 79-88.
- Birabén, M., 1954. Sobre la dispersión de *Artemia salina* en la Argentina. *Neotrópica* 1, 31-32.
- Bowen, S.T., Fogarino, E.A., Hitchner, K.N., Dana, G.L., Chow, V.H.S., Buoncristiani, M.R., Carl, J.R., 1985. Ecological isolation in *Artemia*: population differences in tolerance of anion concentrations. *J. Crust. Biol.* 5, 106-129.
- Bowen, S.T., Buoncristiani, M. R., Carl, J.R., 1988. *Artemia* habitats: Ion concentrations tolerated by one superspecies. *Hydrobiologia* 158, 201-214.
- Boyle, T.P., Fairchild, J.F., 1997. The role of mesocosm studies in ecological risk analysis. *Ecol. Appl.* 7(4), 1099-1102.
- Braun, J.G., 1980. The feeding of *Artemia* on *Phaeodactylum tricornutum*. En: Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O., Jasper, E., (Eds.), *The Brine Shrimp Artemia*, Vol. 2. Physiology, Biochemistry, Molecular Biology. Universa Press, Wetteren, Bélgica, 664 pp.
- Brett, M.T., Müller-Navarra, D., 1997. The role of highly unsaturated fatty acids in aquatic food web process. *Freshw. Biol.* 38, 483-499.
- Broglio, E., Jónasdóttir, S.H., Calbet, A., Jakobsen, H.H., Saiz, E., 2003. Effect of heterotrophic versus autotrophic food on feeding and reproduction of the calanoid copepod *Acartia tonsa*: relationship with prey fatty acid composition. *Aquat. Microb. Ecol.* 31, 267-278.

- Brown, M.R., 2002. Nutritional Value and Use of Microalgae in Aquaculture. Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola.
- Brown, W., George, M.J., Wilson, A., 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. 76, 1967-1971.
- Browne, R.A., Sallee, S.E., Grosch, D.S., Segrety, W.O. y Purser, S.M., 1984. Partitioning genetic and environmental components of reproduction and lifespan in *Artemia*. Ecology 65(3), 949-960.
- Bruggeman, E., Baeza-Mesa, M., Bossuyt, E., Sorgeloos, P., 1979. Improvements in the decapsulation of *Artemia* cysts. En: Styczynska-Jurewicz E, Backiel T, Jaspers E, Persoone G (Eds.). Cultivation of Fish Fry and its live food. European Mariculture Society, Special Publication (4), pp. 534.
- Bucher, E.H., 1992. Population and conservation status of flamingos in Mar Chiquita, Córdoba, Argentina. Colonial Waterbirds 15, 179-184.
- Burke, T., Rainey, W.E., White, T.J., 1992. Molecular variation and ecological problems. En: Berry, R.J., Crawford, T.J., Hewitt, G.M. (Eds.), Genes in Ecology. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 229-254.
- Cahu, C.L., Guillaume, J.C., Stephan, G., Chim, L., 1994. Influence of phospholipid and highly unsaturated fatty acids on spawning rate and egg and tissue composition in *Penaeus vannamei* fed semi-purified diets. Aquaculture 126, 159-170.
- Cahu, C.L., Cuzon, G., Quazuguel, P., 1995. Effect of highly unsaturated fatty acids, a-tocopherol and ascorbic acid in broodstock diet on egg composition and development of *Penaeus indicus*. Comp. Biochem. Physiol. 112, 417-424.
- Cai, Y., 1989. A redescription of the brine shrimp (*Artemia sinica*). The Wasmann Journal of Biology, 47 (1-2), 105-110.
- Calabretti, A., Cateni, F., Procida, G., Favretto, L.G., 2003. Influence of environmental temperature on composition of lipids in

- edible flesh of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). J. Sci. Food Agric. 83, 1493-1498.
- Catell, R.B., 1966. The screen test for the number of factors. Multivar. Behav. Res. 1, 245-276.
- Christie, W.W., 1982. Lipid Analysis (2ª edición). Pergamon Press, Oxford, 207 pp.
- Chuecas, L., Riley, J.P., 1969. Component fatty acids of the total lipids of some marine phytoplankton. J. Mar. Biol. Ass. UK 49, 97-116.
- Claustre, H., Marty, J.C., Cassiani, L., Dagaut, J., 1988. Fatty acid dynamics in phytoplankton and microzooplankton communities during a spring bloom in the coastal Ligurian sea: ecological implications. Mar. Microb. Food Webs 3, 51-66.
- Claustre, H., Marty, J.C., Cassiani, L., Dagaut, J., 1989. Intraspecific differences in the biochemical composition of a diatom during a spring bloom in Villefrance-sur-Mer Bay, Mediterranean Sea. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 129, 17-32.
- Cohen, R.G., Amat, F., Hontoria, F., Navarro, J.C., 1999. Preliminary characterization of some Argentinean *Artemia* populations from La Pampa and Buenos Aires provinces. Int. J. Salt Lake Res. 8, 329-340.
- Cole, G., Brown, R.J., 1967. The chemistry of *Artemia* habitats. Ecology 48, 858-861.
- Colihueque, N., Gajardo, G., 1996. Chromosomal analysis in *Artemia* populations from South America. Cytobios 88, 141-148.
- Comín, F.A., Alonso, M., 1988. Spanish salt lakes: their chemistry and biota. Hydrobiologia 158, 237-246.
- Conte, F.P., Conte, P.A., 1988. Abundance and spatial distribution of *Artemia salina* in Lake Albert, Oregón. Hydrobiologia 158, 167-172.
- Cook, H.W., 1996. Fatty acid desaturation and chain elongation in eukaryotes. En: Vance, D.E., Vance, J. (Eds.), Biochemistry

- of Lipids, Lipoproteins and Membranes. Elsevier, Amsterdam, pp. 129-152.
- Cotonnec, G., Brunet, C., Sautour, N., Thoumelin, G., 2001. Nutritive value and selection of food particles by copepods during a spring bloom of *Phaeocystis* sp. in the English Channel, as determined by pigment and fatty acid analyses. J. Plank. Res. 23, 693-703.
- Cowgill, U.M., Emmel, H.W., Boggs, G.U., Murphy, P.G., Gersich, F.M., Takahashi, I.T., Bengtson, D.A., 1987. Variations in chemical composition of *Artemia* cysts from three geographical locations. En: Sorgeloos, P., Bengtson, D.A., Decler, W., Jaspers, E. (Eds.), *Artemia* Research and its Applications. I. Morphology, Genetics, Strains Characterization, Toxicology. Universa Press, Wetteren, Bélgica, pp. 173-188
- Cripps, C., Blomquist, G.J., De Renobales, M., 1986. *De novo* biosynthesis of linoleic acid in insects. Bioch. Biophys. Acta 876, 572-580.
- Cripps, G.C., 1998. Changes in lipid composition of copepods and *Euphausia superba* associated with diet and environmental conditions in the marginal ice zone, Bellingshausen Sea, Antarctica. Deep-sea Research I 45, 1357-1381.
- Croghan, P.C., 1958. The osmotic and ionic regulation of *Artemia salina* (L.). J. Exp. Biol. 35, 219-34.
- D'Abramo, L.R., 1979. Dietary fatty acid and temperature effects on the productivity of the Cladoceran, *Moina macrocopa*. Biol. Bull. 157, 234-248.
- D'Agostino, A.S., 1980. The vital requirements of *Artemia*. Physiology and Nutrition. En: The Brine Shrimp *Artemia*: Physiology, Biochemistry, Molecular Biology. Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O., Jaspers, E. (Eds.), Universa Press, Wetteren, Bélgica, pp. 55-82.
- Dalsgaard, J., St.John, M., Kattner, G., Muller-Navarra, D., Hagen, W., 2003. Fatty acid trophic markers in the pelagic marine environment. Adv. Mar. Biol. 46, 225-340.

- Davis, S., 1990. Biological Management for the Production of Salt from Seawater. En: Introduction to Applied Phycology, Akatsuka I (Ed.) SPB Academic Publishing, La Haya, Holanda.
- Davis, S., Giordano, M., 1996. Biological and physical events involved in the origin, effects, and control of organic matter in solar saltworks. *Int. J. Salt Lake Res.* 4, 335-347.
- DeMott, W.R., Müller-Navarra, D.C., 1997. The importance of highly unsaturated fatty acids in zooplankton nutrition: Evidence from experiments with *Daphnia*, a cyanobacterium and lipid emulsions. *Freshw. Biol.* 38, 649-664.
- Densmore, L.D., Wright, J.W., Brown, W.M., 1985. Length variation and heteroplasmy are frequent in mitochondrial DNA from parthenogenetic and bisexual lizards (genus *Cnemidophorus*). *Genetics* 110, 689-707.
- Desvillettes, C.H., Bourdier, G., Breton, J.C., Combrouze, P., 1994. Fatty acids as organic markers for the study of trophic relationships in littoral cladoceran communities of a pond. *J. Plankton Res.* 16, 643-659.
- Desvillettes, C.H., Bourdier, G., Amblard, C.H., Barth, B., 1997. Use of fatty acids for the assessment of zooplankton grazing on bacteria, protozoans and microalgae. *Freshw. Biol.* 38, 629-637.
- Dobbeleir, J., Adam, N., Bossuyt, E., Bruggeman, E., Sorgeloos, P., 1980. New aspects of the use of inert diets for high density culturing of brine shrimp. En: Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O., Jaspers, E. (Eds.), *The Brine Shrimp Artemia, Ecology, Culturing and Use In Aquaculture*. Universa Press, Wetteren, Bélgica, 3, 165-174.
- Dutrieu, J., 1960. Observations biochimiques et physiologiques sur le développement d'*Artemia salina* Leach. *Arch. Zool. Exp. et Gen.* 99, 1-128.
- Eardlev, A.J., 1938. Sediments of Great Salt Lake, Utah. *Bull. Am. Soc. Petrol. Geol.* 22, 1344-1346.

- Estoup, A., Largiader, C.R., Perrot, E., Chourrout, D., 1996. Rapid one-tube DNA extraction for reliable PCR detection of fish polymorphic markers and transgenes. *Mol. Mar. Biol. Biotech.* 5, 295-298.
- Excoffier, L., Smouse, P.E., Quattro, J.M., 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131, 479-491.
- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S., 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinformatics Online* 1, 47-50.
- Fabre-Domergue, P., Bietrix, E., 1905. Développement de la sole (*Solea vulgaris*). Introduction à l'étude de la pisciculture marine. Travail du laboratoire de zoologie maritime de Concarneau, Paris, 243 pp.
- Fábregas, J., Otero, A., Morales, E., Cordero, B., Patiño, M., 1996. *Tetraselmis suecica* cultured in different nutrient concentrations varies in nutritional value to *Artemia*. *Aquaculture* 143, 197-204.
- Fábregas, J., Otero, A., Morales, E., Arredondo-Vega, B.O., Patiño, M., 1998. Modification of the nutritive value of *Phaeodactylum tricornutum* for *Artemia* in semicontinuous cultures. *Aquaculture* 169, 167-176.
- Fábregas, J., Maseda, A., Domínguez, A., Patiño, M., 2001. Growth rate of the microalga *Tetraselmis suecica* changes the biochemical composition of *Artemia* species.
- Fábregas, J., Maseda, A., Domínguez, A., Ferreira, M., Otero, A., 2002. Changes in the cell composition of the marine microalga *Nannochloropsis gaditana* during a light:dark cycle. *Biotech. Letters* 24, 1699-1703.
- Farkas, T., Herodek, S., 1959. Seasonal changes in the fat contents of the crustacean plankton in Lake Balaton. *Annal. Biol. Tihany.* 27: 3-7.

- Farkas, T., Herodek, S., 1964. The effect of environmental temperature on the fatty acid composition of crustacean plankton. *J. Lipid Res.* 5, 369-373.
- Farkas, T., 1970. Fats in fresh water crustaceans. *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.* 21 (2), 225-233.
- Farkas, T., 1979. Adaptation of fatty acid compositions to temperature: a study on planktonic crustaceans. *Comp. Biochem. Physiol. B* 64, 71-76.
- Farkas, T., Kariko, K., Csengeri, I., 1981. Incorporation of (1-¹⁴C) Acetate into fatty acids of the crustaceans *Daphnia magna* and *Cyclops strenus* in relation to temperature. *Lipids* 16, 418-422.
- Farkas, T., Nemez, G., Csengeri, I., 1984. Differential response of lipid metabolism and membrane physical state by an actively and passively overwintering planktonic crustacean. *Lipids* 19, 436-444.
- Farkas, T., Storebakken, T., Bhosle, N.B., 1988. Composition and physical state of phospholipids in calanoid copepods from India and Norway. *Lipids* 23, 619-622.
- Felsenstein, J., 2004. PHYLIP (Phylogeny Inference Package). Version 3.6c. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.
- Folch, J., Lees, N., Sloane-Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497-509.
- Fraser, A.J., Sargent, J.R., Gamble, J.C., Seaton, D.D., 1989. Formation and transfer of fatty acids in an enclosed marine food chain comprising phytoplankton, zooplankton and herring (*Clupea harengus* L.) larvae. *Mar. Chem.* 27, 1-18.
- Fujita, S., Watanabe, T., Kitajima, C., 1980. Nutritional quality of *Artemia salina* from different locations, as a living feed from the viewpoint of essential fatty acids for marine fish. En: Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O., Jaspers, E. (Eds.), *The Brine Shrimp Artemia. Ecology, Culturing, Use in Aquaculture.* Wetteren Universa Press, Bélgica, pp. 456.

- Gajardo, G., da Conceicao, M., Weber, L., Beardmore, J.A., 1995. Genetic variability and interpopulational differentiation of *Artemia* strains from South America. *Hydrobiologia* 302, 21-29.
- Gajardo, G., Colihueque, N., Parraguez, M., Sorgeloos, P., 1998. International Study on *Artemia*. LVIII. Morphologic differentiation and reproductive isolation of *Artemia* populations from South America. *Int. J. Saltk Lake Res.* 7, 133-151.
- Gajardo, G., Mercado, C., Beardmore, J.A., Sorgeloos, P., 1999. International Study on *Artemia*. LX. Allozyme data suggest that a new *Artemia* population in southern Chile (50° 29' S; 73° 45' W) is *A. persimilis*. *Hydrobiologia* 405, 117-123.
- Gajardo, G., Beardmore, J.A., Sorgeloos, P., 2001. International Study on *Artemia*. LXII. Genomic relationships between *Artemia franciscana* and *A. persimilis*, inferred from chromocentre numbers. *Heredity* 87, 172-177.
- Gajardo, G., Abatzopoulos, T.J., Kappas, I., Beardmore, J.A., 2002. Evolution and speciation. En: Abatzopoulos, T.J., Beardmore, J.A., Clegg, J.S., Sorgeloos, P. (Eds.). *Artemia: Basic and Applied Biology*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda, pp. 225-250.
- Gajardo, G., Crespo, J., Triantaphyllidis, A., Tzika, A., Baxevanis, A.D., Kappas, I., Abatzopoulos, T.J., 2004. Species identification of Chilean *Artemia* populations based on mitochondrial DNA RFLP analysis. *J. Biogeogr.* 31, 547-555.
- Gifi, A., 1990. *Nonlinear multivariate analysis*. John Wiley and Sons, Chichester, Reino Unido, 579 pp.
- Gilchrist, B.M., 1954. Haemoglobin in *Artemia salina*. *Proc. R. Soc. Lond.* 143B, 136-146.
- Gozalbo, G., 1990. *Principios nutritivos inmediatos en biomasas silvestres y cultivadas de Artemia*. Tesis Doctoral, Universidad de Valencia, España, 269 pp.
- Green, A.J., Sánchez, M.I., Amat, F., Figuerola, J., Hontoria, F., Ruiz, O., Hortas, F., 2005. Dispersal of invasive and native brine

- shrimps *Artemia* (Anostraca) via waterbirds. *Limnol. Oceanogr.* 50, 737-742.
- Guillard, R.R.I., Ryther, J.H., 1962. Studies on marine planktonic diatoms I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. *Can. J. Microbiol.* 8, 229-239.
- Guiñazú, N., 1960. Por un mejor conocimiento de la *Artemia salina* (L.) de Mar Chiquita, Córdoba. Actas y trabajos. I Congreso Sudamericano de Zoología. T. II, Secc. III. Invertebrados, La Plata, Argentina.
- Gulati, R. D., DeMott, W. R., 1997. The role of food quality for zooplankton: remarks on the state-of-the-art, perspectives and priorities *Freshw. Biol.* 38, 753-768.
- Günther, R.T., 1890. Crustacea. En: Günther R.T. (Ed.), Contributions to the Natural History of Lake Urmia, N. W. Persia and its Neighborhood. *J. Linn. Soc. (Zoology)* 27, 394-398.
- Gurr, M.I., Harwood, J.L., 1991. The nature of lipids and their place in living things. En: Gurr, M.I., Harward, J.L. (Eds.), *Lipid Biochemistry: An Introduction*, 4th ed. Chapman and Hall, Londres, Reino Unido, pp. 4-9.
- Gyllesten, U., Wilson, A.C., 1986. Mitochondrial DNA of salmonids. Inter- and intraspecific variability detected with restriction enzymes. En: Ryman, N., Utter, F. (Eds.), *Population Genetics and Fishery Management*. Washington sea grant program, University Washington Press, Londres, pp. 301-317.
- Hagen, W., Kattner, G., Graeve, M., 1993. *Calanoides acutus* and *Calanus propinquus*, Antarctic copepods with different lipid storage modes via wax esters or triacylglycerols. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 97, 135-142.
- Hammer, U.T. 1981. Primary production in saline lakes. *Hidrobiologia* 81, 47-57.
- Harrison, K.E., 1990. The role of nutrition in maturation, reproduction and embryonic development of decapod crustaceans: a review. *J. Shellfish Res.* 9, 1-28.

- Harrison, R.G., 1989. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends Ecol. Evol.* 4, 6-11.
- Hartl, D.L., Clark, A.G., 1989. *Principles of Population Genetics*. 2nd ed. Sinauer Associates, Massachusetts, EE.UU., 682 pp.
- Haynes, R.C., Hammer, U.T., 1978. The saline lakes of Saskatchewan IV: Primary production by phytoplankton in selected saline ecosystems. *Int. Revue. Ges. Hydrobiol.* 63, 337-351.
- Hazel, J.R., McKinley, S.J., Williams, E.E., 1992. Thermal adaptation in biological membranes: Interacting effects of temperature and pH. *J. Comp. Physiol.* 162(B), 593-601.
- Heath, H., 1924. The external development of certain phyllopods. *J. Morphol.* 38, 453-483.
- Hernández-Cruz, M.C., Salhi, M., Bessonart, M., Izquierdo, M.S., González, M.M., Fernández-Palacios, H., 1999. Rearing techniques for red porgy (*Pagrus pagrus*) during larval development. *Aquaculture*. 179, 489-497.
- Hinchcliff, P.R.; Riley, J.P., 1972. The effect of diet on the component fatty-acid composition of *Artemia salina*. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 52, 203-211.
- Hontoria, F., 1990. Caracterización de tres poblaciones originarias del área levantina española del crustáceo branquiópodo *Artemia*. Aplicación en acuicultura. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona, España, 326 pp.
- Hontoria, F., Amat, F., 1992a. Morphological characterization of adult *Artemia* from different geographical origin. Mediterranean populations. *J. Plankt. Res.* 14 (7), 949-959.
- Hontoria, F., Amat, F., 1992b. Morphological characterization of adult *Artemia* (*Crustacea*, *Branchiopoda*) from different geographical origin: American populations. *J. Plank. Res.* 14(10), 1461-1471.
- Ianora, A., Miralto, A., Poulet, S.A., Carotenuto, Y., Buttino, I., Romano, G., Casotti, R., Pohnert, G., Wichard, T., Colucci-D'Amato, L., Terrazzano, G., Smetacek, V., 2004. Aldehyde

suppression of copepod recruitment in blooms of a ubiquitous planktonic diatom. *Nature* 429, 403-407.

- Irigoien, X., Harris, R.P., Verheye, H.M., Joly, P., Runge, J., Starr, M., Pond, D., Campbell, R., Shreeve, R., Ward, P., Smith, A.N., Dam, H.G., Peterson, W., Tirelli, V., Koski, M., Smith, T., Harbour, D., Davidson R., 2002. Copepod hatching success in marine ecosystems with high diatom concentrations: the paradox of diatom-copepod interactions revisited. *Nature* 419, 387-389.
- Ito, M.K., Simpson, K.L., 1996. The biosynthesis of w3 fatty acids from 18:2w6 in *Artemia* spp. *Comp. Biochem. Physiol.* 115 B, 69-76.
- Javor, B., 1989. *Hypersaline environments: microbiology and biogeochemistry*. Springer Verlag, Berlin, 328 pp.
- Jiang, H.M., Gao, K.S., 2004. Effects of lowering temperature during culture on the production of polyunsaturated fatty acids in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 40(4), 651-654.
- Johnson, D.A., 1980. Evaluation of various diets for optimal growth and survival of selected life stages of *Artemia*. En: Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O., Jaspers, E. (Eds.), *The Brine Shrimp Artemia*. Vol. 3. Ecology, Culturing and Use in Aquaculture. Universa Press, Wetteren, Bélgica, pp. 185-192.
- Jónasdóttir, S.H., Fields, D., Pantoja, S., 1995. Copepod egg production in Long Island Sound, USA, as a function of the chemical composition of seston. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 119, 87-98.
- Jones, R.H., Flynn, K.J., 2005. Nutritional status and diet composition affect the value of diatoms as copepod prey. *Science* 307, 1457-1459.
- Kaiser, H.F., 1970. A second generation little jiffy. *Psychometrika* 35, 401-415.
- Kaiser, H.F., 1974. Analysis of factorial simplicity. *Psychometrika* 39, 31-36.

- Kappas, I., Abatzopoulos, T.J., Van Hoa, N., Sorgeloos, P., Beardmore, J.A., 2004. Genetic and reproductive differentiation of *Artemia franciscana* in a new environment. *Mar. Biol.* 146, 103-117.
- Kattner, G., Krause, M., 1987. Changes in lipids during the development of *Calanus finmarchicus* s.l. from copepodid I to adult. *Mar. Biol.* 96, 511-518.
- Kattner, G., Graeve, M., Hagen, W., 1994. Ontogenic and seasonal changes in lipid and fatty acid/alcohol compositions of the dominant Antarctic copepods *Calanus propinquus*, *Calanoides acutus* and *Rhincalanus gigas*. *Mar. Biol.* 118, 637-644.
- Kayama, M., Tsuchiya, Y., Mead, J.F., 1963. A model experiment of aquatic food chain with special significance in fatty acid conversion. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 29, 452-458.
- Kellogg, V.A., 1906. A new *Artemia* and its life conditions. *Science* 24, 594-596.
- Kinne, O., 1970. Temperature: animals-invertebrates. En: Kinne, O. (Ed.), *Marine ecology. I. Environmental factors*. Wiley-Interscience. Londres, pp. 407-514.
- Kinne, O., 1977. Cultivation of animals: research cultivation. En: Kinne, O. (Ed.), *Marine Ecology, Vol. 111, Cultivation, Part 2*. Wiley, Chichester, pp. 579-1293.
- Kristensen, I., Hulscher-Emeis, T.M., 1972. Factors influencing *Artemia* populations in Antillean salines. *Stud. Fauna Cur. Carib. Isl.* 9, 87-111.
- Lacoste, A., Poulet, S.A., Cueff, A., Kattner, G., Ianora, A., Laabir, M., 2001. New evidence of the copepod maternal food effects on reproduction. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 259, 85-107.
- Lansman, R.A., Avise, J.C., Aquadro, C.F., Shapira, J.F., Daniel, S.W., 1983. Extensive genetic variation in mitochondrial DNAs among geographic populations of the deer mouse, *Peromyscus maniculatus*. *Evolution* 37, 1-16.

- Latorre, A., Moya, A., Ayala, F.J., 1986. Evolution of mitochondrial DNA in *Drosophila subobscura*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 8649-8653.
- Lavens, P., Léger, P., Sorgeloos, P., 1989. Manipulation of the fatty acid profile in *Artemia* offspring produced in intensive culture systems. En: De Paw, N., Jaspers, E., Ackefors, H., Wilkins, N. (Eds.). Aquaculture: a Biotechnology in Progress, European Aquaculture Society, Bélgica, pp. 731-739.
- Lavens, P., Sorgeloos, P., 2000. The history, present status and prospects of the availability of *Artemia* cysts for aquaculture. Aquaculture 181, 397-403.
- Léger, P., Bengtson, D.A., Simpson, P.M., Sorgeloos, P., 1986. The use and nutritional value of *Artemia* as a food source. Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev. 24, 521-623.
- Lindeman, R.L., 1942. The trophic-dynamic aspect of ecology. Ecology 23, 399-418.
- Lipko, P., Papeschi, A.G., Cohen, R.G., Amat, F. 2004. Cytogenetic analysis of four Argentinean populations of *Artemia* (Crustacea Branchiopoda: Anostraca). Caryologia 57 (3): 283-289.
- Lynch, D.V., Jr. Thompson, G.A., 1982. Low temperature induced alterations in the chloroplast and microsomal membrane of *Dunaliella salina*. Plant Physiol. 69, 1369-1375.
- Lytle, J.S., Lytle, T.F., Ogle, L.T., 1990. Polyunsaturated fatty acid profiles as a comparative tool in assessing maturation diets of *Penaeus vannamei*. Aquaculture 89, 287-299.
- MacDonald, G.H., Browne, R.A., 1989. Population dynamics of an asexual brine shrimp *Artemia* population. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 133, 169-188.
- Mantel, N., 1967. Detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Res. 27, 209-220.
- Margalef, R., 1983. Limnología. Ediciones Omega, Barcelona, 1010 pp.

- Mayr, E., 1963. *Animal Species and Evolution*. Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts.
- McElroy, D., Moran, P., Bermingham, E., Kornfield, I., 1992. REAP - An Integrated environment for the manipulation and phylogenetic analysis of restriction data. *J. Hered.* 83, 157-158.
- Medina, G.R., Goenaga, J., Hontoria, F., Cohen, G., Amat, F., 2007. Effects of temperature and salinity on prereproductive life span and reproductive traits of two species of *Artemia* (Branchiopoda, Anostraca) from Argentina: *Artemia franciscana* and *Artemia persimilis*. *Hydrobiologia* 579, 41-53.
- Miralto, A., Barone, G., Romano, G., Poulet, S.A., Ianora, A., Russo, G.L., Buttino, I., Mazzarella, G., Laabir, M., Cabrini, M., Giacobbe, M.G., 1999. The insidious effect of diatoms on copepod reproduction. *Nature*, 402, 173-176.
- Monroig, O., 2006. Diseño y optimización de liposomas para su uso como sistema de suministro de nutrientes a larvas de peces marinos. Tesis Doctoral, Universidad de Valencia, España, 239 pp.
- Moritz, C., Dowling, T.E., Brown, W.M., 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: implications for population biology and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18, 269-292.
- Mortensen, S.H., Børsheim, K.Y., Rainuzzo, J.R., Knutsen, G., 1988. Fatty acid and elemental composition of the marine diatom *Chaetoceros gracilis* Schutt. Effects of silicate deprivation, temperature and light intensity. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 122, 173-185.
- Müller-Navarra, D., 1995. Evidence that a highly unsaturated fatty acid limits *Daphnia* growth in nature. *Arch. Hydrobiol.* 132(3), 297-307.
- Müller-Navarra, D.C., Brett, M.T., Liston, A.M., Goldman, C.R., 2000. A highly unsaturated fatty acid predicts carbon transfer between primary producers and consumers. *Nature* 403, 74-77.

- Mullis, K.B., Faloona, F.A., 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155, 335-350.
- Mura, G., Ferrara, F., Fabietti, F., Delise, M., Bocca, A., 1997. Biochemical (fatty acid profile) diversity in anostracan species of the genus *Chirocephalus*. *Hydrobiologia* 359, 237-241.
- Mura, G., Ferrara, F., Fabietti, F., Delise, M., Bocca, A., 1998. Intraspecific variation of fatty acid profile in wild populations of *Chirocephalus diaphanus* (Anostraca). *Crustaceana* 71, 785-800.
- Nanton, D.A., Castell, J.D., 1999. The effects of temperature and dietary fatty acids on the fatty acid composition of harpacticoid copepods, for use as a live food for marine fish larvae. *Aquaculture* 175, 167-181.
- Napolitano, G.E., Pollero, R.J., Gayoso, A.M., MacDonald, B.A., Thompson, R.J., 1997. Fatty acids as trophic markers of phytoplankton blooms in the Bahía Blanca estuary (Buenos Aires, Argentina) and in Trinity Bay (Newfoundland, Canada). *Biochem. Syst. Ecol.* 25, 739-755.
- Napolitano, G. 1999. Fatty acids as trophic and chemical markers in freshwater ecosystems. En: Arts, M.T., Wainman, B.C. (Eds.), *Lipids in freshwater ecosystems*. Springer, Nueva York, pp. 21-44.
- Navarro, J.C., 1990. Caracterización de las cepas españolas de *Artemia* desde el punto de vista de su valor nutritivo y de sus fenotipos electroforéticos. Implicaciones prácticas en Acuicultura. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia, España, 350 pp.
- Navarro, J.C., Amat, F., Sargent, J.R., 1991. A study of the variations in lipid levels, lipid class composition and fatty acid composition in the first stages of *Artemia* sp. *Mar. Biol.* 111, 461-465.
- Navarro, J.C., Amat, F., 1992. Effect of algal diets on the fatty acid composition of brine shrimp, *Artemia* sp. cysts. *Aquaculture* 101, 223-227.

- Navarro, J.C., Amat, F., Sargent, J.R., 1992. Fatty acid composition of coastal and inland *Artemia* sp. populations from Spain. *Aquaculture* 102, 219-230.
- Navarro, J.C., Amat, F., Sargent, J.R., 1993. The lipids of the cysts of freshwater-and marine-type *Artemia*. *Aquaculture* 109, 327-336.
- Navarro, J.C., Henderson, R.J., McEvoy, L.A., Bell, M.V., 1999. Lipid conversions during enrichment of *Artemia*. *Aquaculture* 174, 155-166.
- Nei, M., 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, Nueva York, pp. 512.
- Neidelman, S.L., 1987. Effect of temperature on lipid unsaturation. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 5, 245-268.
- Okimoto, R., Macfarlane, J.L., Clary, D.O., Wolstenholme, D.R., 1992. The mitochondrial genomes of two nematodes, *Caenorhabditis elegans* and *Ascaris suum*. *Genetics* 130, 471-498.
- Oren, A., 1992. The genera *Haloanaerobium*, *Halobacteroides*, and *Sporohalobacter*, En: Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.H., (Eds.), *The prokaryotes*, 2nd edition, Vol. 2. Springer Verlag, NuevaYork, pp. 1893–1900.
- Palumbi, S.R., 1996. Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. En: Hillis, D.M., Moritz, C., Mable, B.K. (Eds.), *Molecular Systematics*, Sinauer Associates, Sunderland, pp. 205-247.
- Papeschi, A.G., Cohen, R.G., Pastorino, G., Amat, F., 2000. Cytogenetic proof that the brine shrimp *Artemia franciscana* (Crustacea, Branchiopoda) is found in Argentina. *Hereditas* 133, 159-166.
- Parrish, C.C., Abrajano, T.A., Budge, S.M., Helleur, R.J., Hudson, E.D., Pulchan, K., Ramos, C., 2000. Lipid and phenolic biomarkers in marine ecosystems: analysis and applications. En: Wangersky, P. (Ed.), *The Handbook of Environmental Chemistry*, Vol. 5, Springer-Verlag, Berlín, pp. 193-223.

- Pérez-Velazquez, M., Lawrence, A.L., González-Félix, M.L., Gatlin, D.M., 2003. Changes in the lipid and fatty acid composition of adult male *Litopenaeus vannamei* in response to temperature acclimation and prolonged food deprivation. *Aquaculture Res.* 34(13), 1205-1213.
- Persoone, G., Sorgeloos, P., 1980. General aspects of the ecology and biogeography of *Artemia*. En: Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O., Jaspers, E. (Eds.), *The brine shrimp Artemia*. Universa Press, Wetteren, Bélgica, pp. 3-24.
- Picinelli, M., Prosdocimi, T., 1968. Descrizione taxonomica delle due specie *Artemia salina* L. e *Artemia persimilis* sp. *Rendiconti dell' Istituto Lombardo di Scienze e Lettere, B*, 102, 113-118.
- Pinturier-Geiss, L., Mejanelle, L., Dale, B., Karlsen, D.A., 2002. Lipids as indicators of eutrophication in marine coastal sediments, *J. Microbiol. Meth.* 48, 239-257.
- Piper, A.M., 1944. A graphic procedure in the geochemical interpretation of water analyses. *American Geophysical Union* 25, 914-923.
- Poerschmann, J., Spijkerman, E., Langer, U., 2004. Fatty acid patterns in *Chlamydomonas* sp. as a marker for nutritional regimes and temperature under extremely acidic conditions. *Microbial Ecol.* 48, 78-89.
- Pohl, P., Zurheide, F., 1979. Fatty acids and lipids of marine algae and the control of their biosynthesis by environmental factors. En: Hoppe, H.A., Levring, T., Tanaka, Y. (Eds.), *Marine algae in pharmaceutical science*. Walter de Gruyter, Berlin, pp. 473-523.
- Pond, D.W., Harris, R., Head, R., Harbour, D., 1996. Environmental and nutritional factors determining seasonal variability in the fecundity and egg viability of *Calanus elgolandicus* in coastal waters of Plymouth, UK. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 143, 45-63.
- Pond, D.W., Bell, M.V., Dixon, D.R., Sargent, J.R., 1997a. Occurrence of 16:2(n-4) and 18:2(n-4) fatty acids in the lipids of the hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata*:

- nutritional and trophic implications. Mar. Ecol. Prog. Ser. 156, 167-174.
- Pond, D.W., Segonzac, M., Bell, M.V., Dixon, D.R., Fallick, A., Sargent, J.R., 1997b. Lipid and lipid carbon stable isotope composition of the hydrothermal vent shrimp *Mirocaris fortunata*: evidence for nutritional dependence on photosynthetically-fixed carbon. Mar. Ecol. Progr. Ser. 157, 221-231.
- Pond, D.W., Allen, C.E., Bell, M.V., Van Dover, C.L., Fallick, A.E., Dixon, D.R., Sargent, J.R., 2002. On the origins of long-chain polyunsaturated fatty acids in the hydrothermal vent worms, *Ridgea piscesae* and *Protis hydrothermica*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 225, 219-226.
- Provasoli, L., Shiraisi, K., 1959. Axenic cultivation of the brine shrimp *Artemia salina*. Biol. Bull. 117, 347-355.
- Pruitt, N.L., 1990. Adaptations to temperature in the cellular membranes of crustacea- membrane structure and metabolism. J. Thermal Biol. 15, 1-8.
- Quirós, R., Dragó, E., 1999. The environmental state of Argentinean lakes: An overview. Lakes and Reservoirs: Research and Management 4: 55-64.
- Rand, D.M., Harrison, R.G., 1989. Molecular population genetics of mtDNA size variation in crickets. Genetics 121, 551-569.
- Reati, G.J., Florín, M., Fernández, G.J., Montes, C., 1997. The Laguna de Mar Chiquita (Córdoba, Argentina): a little known, secularly fluctuating, saline lake. Int. J. Salt Lake. Res. 5, 187-219.
- Reeb, C.A., Avise, J.C., 1990. A genetic discontinuity in a continuously distributed species: mitochondrial DNA in the American oyster, *Crassostrea virginica*. Genetics 124, 397-406.
- Reeve, M.R., 1963a. The filter-feeding of *Artemia*. I. In pure cultures of plant cells. J. Exp. Biol. 40, 195-205.

- Reeve, M.R., 1963b. The filter-feeding of *Artemia*. II. In suspension of various particles. J. Exp. Biol. 40(1), 207-214.
- Reeve, M.R., 1963c. The filter-feeding of *Artemia*. III. Faecal pellets and their associated membranes. J. Exp. Biol. 40, 215-221.
- Roberts, J.W., Grula, J.W., Posakony, J.W., Hudspeth, R., Davidson, E.H., Britten, R.J., 1983. Comparison of sea urchin and human mtDNA: evolutionary rearrangement. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80(15), 4614-4618.
- Rodríguez-Gil, S., Papeschi, A.G., Cohen, R.G., 1998. Mitotic and meiotic chromosomes of *Artemia* (Branchiopoda) from populations of La Pampa province, Argentina. J. Crustacean Biol. 18, 36-41.
- Roff, D.A., Bentzen, P., 1989. The statistical analysis of mitochondrial DNA polymorphisms: χ^2 and the problem of small samples. Mol. Biol. Evol. 6, 539-545.
- Rollefsen, G., 1939. Artificial rearing of fry of seawater fish. Preliminary communication. Rapp. P.-V. Reun. Cons. perm. int. Explor. Mer, 109-133.
- Ruiz, O., Medina, G.R., Cohen, G., Amat, F., Navarro, J.C., 2007. Diversity of the fatty acid composition of *Artemia* sp. cysts from Argentinean populations. Mar. Ecol. Progr. Series, 335, 155-165.
- Sargent, J.R., Gatten, R.R., McIntosh, R., 1977. Wax esters in the marine environment: their occurrence, formation, transformation and ultimate fates. Mar. Chem. 5, 573-584.
- Sargent, J.R., Whittle, K.J., 1981. Lipids and hydrocarbons in the marine food web. En: Longhurst, A.R. (Ed.), Analysis of marine ecosystems. Academic Press, Londres, pp 491-533.
- Sargent, J.R., Parkes, R.J., Mueller-Harvey, I., Henderson, R.J., 1988. Lipid biomarkers in marine ecology. Microbes in the Sea 5, 119-138.
- Sargent, J.R., Falk-Petersen, S., 1988. The lipid biochemistry of calanoid copepods. Hydrobiologia 168, 101-114.

- Saunders, N.C., Kessler, L.G., Avise, J.C., 1986. Genetic variation and geographic differentiation in mitochondrial DNA of the horseshoe crab, *Limulus polyphemus*. *Genetics*, 112, 613-627.
- Savage, A., Knott, B., 1998. *Artemia parthenogenetica* in Lake Hayward, Western Australia. II. Feeding biology in a shallow seasonally stratified, hypersaline lake. *Int. J. Salt Lake Res.* 7, 13-24.
- Schauer, P.S., Johns, D.M., Olney, C.E., Simpson, K.L., 1980. Lipid level, energy content and fatty acid composition of the cysts and newly hatched nauplii from five geographical strains of *Artemia*. En: Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O., Jaspers, E., (Eds.). *The Brine Shrimp Artemia*. Ecology, Culturing, Use in Aquaculture. Wetteren Universa Press, Wetteren, Bélgica, pp. 365-374.
- Schauer, P.S., Simpson, K.L., 1985. Bioaccumulation and bio-conversion of dietary labelled fatty acids in *Artemia* and winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 42, 1430-1438.
- Scott, A.P., Middelton, C. 1979. Unicellular algae as a food for turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae. The importance of dietary long-chain polyunsaturated fatty acids. *Aquaculture* 18, 227-241.
- Seale, A., 1933. Brine shrimp (*Artemia*) as a satisfactory live food for fishes. *Trans. Am. Fish. Soc.* 63, 129-130.
- Shin, K., Jang, M.C., Jang, P.K., Ju, Se-J., Lee, T.K., Chang, M., 2003. Influence of food quality on egg production and viability of the marine planktonic copepod *Acartia omorii*. *Prog. Oceanog.* 57, 265-277.
- Sinensky, M., 1974. Homeoviscous adaptation: a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 522-525.
- Skalli, A., Robin, J.H., Le Bayon N., Le Delliou H., Person-Le Ruyet, J., 2006. Impact of essential fatty acid deficiency on tissues' fatty acid composition of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 255, 223-232.

- Sneath, P.H.A., Sokal, R.R. 1973. Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification. En: Freeman, W.H., San Francisco, EE.UU., 359 pp.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J., 1981. Biometry, 2nd edition. Freeman, Nueva York, 859 pp.
- Sorgeloos, P., Lavens, P., Léger, P., Tackaert, W., Versichele, D., 1986. Manual for the culture and use of brine shrimp *Artemia* in aquaculture. Prepared for the Belgian Administration for Development Cooperation. The Food and Agricultural Organization of the United Nations. Gante, Bélgica, 319 pp.
- St.John, M.A., Lund, T., 1996. Lipid biomarkers: linking the utilization of frontal plankton biomass to enhanced condition of juvenile North Sea cod. Mar. Ecol. Prog. Ser. 131, 75-85.
- Stottrup, J.G., 2000. The elusive copepods: their production and suitability in marine aquaculture. Aquaculture Res. 31, 703-711.
- Strickland, J.D.H., Parsons, T.R., 1972. A practical handbook of seawater analysis (2nd ed.). J. Fish. Res. Bd. Canada, 310 pp.
- Sun, Y., Song, W.Q., Zhong, Y., Zhang, R.S., Abatzopoulos, T.J., Chen, R.Y., 1999. Diversity and genetic differentiation in *Artemia* species and populations detected by AFLP markers. Int. J. Salt Lake Res. 8, 341-350.
- Suutari, M., Rintamäki, A., Laakso, S., 1996. The effect of temperature on lipid classes and their fatty acid profiles in *Lipomyces starkeyi*. J. Am. Oil Chem. Soc. 72, 1071-1073.
- Thompson, B., 1984. Canonical Correlation Analysis: Uses and Interpretation. Sage Publications Ltd., Londres, 71 pp.
- Thompson, P.A., Gua, M., Harrison, P.J., Whyte, J.N.C., 1992. Effects of variation in temperature. II. On the fatty acid composition of eight species of marine phytoplankton. J. Phycol. 28, 488-497.
- Thompson, S.N., 1973. A review and comparative characterization of the fatty acid composition of seven insect orders. Comp. Biochem. Physiol. 45(B), 467-482.

- Triantaphyllidis, G.V., Criel, G.R.J., Abatzopoulos, T.J., Thomas, K.M., Peleman, J., Beardmore, J.A., Sorgeloos, P., 1997. International Study on *Artemia*. LVII. Morphological and molecular characters suggest conspecificity of all bisexual European and North African *Artemia* populations. Mar. Biol. 129, 477-487.
- Valverde, J.R., Batuecas, B., Moratilla, C., Marco, R., Garesse, R., 1994. The complete mitochondrial DNA sequence of the crustacean *Artemia franciscana*. J. Mol. Evol. 39, 400-408.
- Van Stappen, G., 1996. Introduction biology and ecology of *Artemia*. En: Lavens, P., Sorgeloos, P., (Eds.), Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture (FAO). Fisheries Technical Paper N° 361. Roma, Italia, pp. 101-121.
- Van Stappen, G., Sui, L.Y., Xin, N.H., Sorgeloos, P., 2003. Characterization of high-altitude *Artemia* populations from the Qinghai-Tibet Plateau, PR China. Hydrobiologia 500, 179-192.
- Vance, E., Vance, J.E., 1985. Biochemistry of lipids and membranes. Cummings Publishing company, Inc. EE.UU., 576 pp.
- Vandeginste, B.M.G., Massart, D.L., Buydens, L.M.C., De Jong, S., Lewi, P.J., Smeyers-Verbeke J., 1998. Handbook of chemometrics and qualimetrics: Part B. Data handling in science and technology, Vol. 20B. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 867 pp.
- Vanhaecke, P., Tackaert, W., Sorgeloos, P., 1987. The biogeography of *Artemia*: an updated review. En: Sorgeloos, P., Bengtson, D. A., Decler, W., Jaspers, E. (Eds.), *Artemia* research and its applications. Universa Press, Wetteren, Bélgica, pp. 129-155.
- Vismara, R., Vestri, S., Barsanti, L., Gualtieri, P., 2003. Diet-induced variations in fatty acid content and composition of two on-grown stages of *Artemia salina*. J. Appl. Phycol. 15, 477-483.
- Volkman, J.K., Jeffrey, S.W., Rogers, G.I., Nicholas, P.D., Garland, V., 1989. Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. J. Exp. Mar. Biol.Ecol. 128, 219-240.

- Volkman, J.K., Barrett, S.M., Blackburn, S.I., Mansour, M.P., Sikes, E.L., Gelin, F., 1998. Microalgal biomarkers: A review of recent research developments. *Org. Geochem.* 29, 1163-1179.
- Vos, J., Léger, P., Vanhaecke, P., Sorgeloos, P., 1984. Quality evaluation of brine shrimp *Artemia* cysts produced in Asian Salt ponds. *Hydrobiologia* 108, 17-23.
- Wache, S.C., Laufer, H., 1998. n-3 and n-6 PUFA as biochemical markers for developmental stages of brine shrimp developing toward “dumpy” or “slender” adults. *Comp. Biochem. Physiol.* 119(B), 599-610.
- Wacker, A., Von Elert, E., 2003. Food quality controls reproduction of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Oecologia* 135, 332-338.
- Wängberg, S.A., Garde, K., Gustavson, K., Selmer, J.S., 1999. Effects of UV-B radiation on marine phytoplankton communities. *J. Plankton Res.* 21, 147-166.
- Watanabe, T., Oowa, F., Kitajima, C., Fujita, S., 1978a. Nutritional quality of Brine Shrimp, *Artemia salina*, as a living feed from the viewpoint of essential fatty acids for fish. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish* 44, 1115-1121.
- Watanabe, T., Arakawa, T., Kitajima, C., Fukusho, K., Fujita, S., 1978b. Nutritional quality of living feeds from the viewpoint of essential fatty acids for fish. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 44, 1223-1227.
- Watanabe, T., Oowa, F., Kitajima, C., Fujita, S., 1980. Relationship between dietary value of brine shrimp *Artemia* and their content of w3 highly unsaturated fatty acids. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 46, 35-41.
- Watanabe, T., 1987. Requerimientos de ácidos grasos y nutrición lipídica en los peces. En: Espinosa de los Monteros J., Labarta U. (Eds.), *Nutrición en Acuicultura, Plan Form. Técn. Sup. Acuicultura.* (ISBN: 84-505-6001-2) Feuga, Madrid, pp. 99-165.
- West-Eberhard, M.J., 1989. Phenotypic plasticity and the origins of diversity. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 20, 249-278.

- Wilson, A.C., Cann, R.L., Carr, S.M., George, M., Gyllensten, U.B., Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biol. J. Linnean Soc.* 26(4), 375-400.
- Winer, B.J., 1971. *Statistical principles in experimental design.* McGraw-Hill, Nueva York, 907 pp.
- Witt, U., Quantz, G., Kuhlmann, D., Kattner, G., 1984. Survival and growth of turbot larvae *Scophthalmus maximus* L. reared on different food organisms with special regard to long chain polyunsaturated fatty acids. *Aquaculture Eng.* 3, 177-190.
- Wright, J. W., Spolsky, C., Brown, W.M., 1983. The origin of parthenogenetic lizard (*Cnemidophorus laredoensis*) inferred from mitochondrial DNA analysis. *Herpetologica* 39, 410-416.
- Xin, N., Sun, J., Zhang, B., Triantaphyllidis, G.V., Van Stappen, G., Sorgeloos, P., 1994. International study on *Artemia*. LI. New survey of *Artemia* resources in the Peoples's Republic of China. *Int. J. Salt Lake Res.* 3, 105-112.
- Xu, X.L., Ji, W. J., Castell, J.D., O'Dor, R.K., 1994. Influence of dietary lipid sources on fecundity, egg hatchability and fatty acid composition of Chinese prawn (*Penaeus chinensis*) broodstock. *Aquaculture* 119, 359-370.
- Zheng, M., 1997. *An Introduction to Saline Lakes on the Qinghai-Tibet Plateau.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 294 pp.
- Zhukova, N.V., Aizdaicher, N. A., 1995. Fatty acid composition of 15 species of marine Microalgae. *Phytochem.* 39, 351-356.
- Zhukova, N.V., Imbs, A.B., Yi, L.F., 1998. Diet-induced changes in lipid and fatty acid composition of *Artemia salina*. *Comp. Biochem. Physiol.* 120(B), 499-506.
- Zuñiga, O., Wilson, R., Amat, F., Hontoria, F., 1999. Distribution and characterization of Chilean populations of the brine shrimp *Artemia* (Crustacea, Branchiopoda, Anostraca). *Int. J. Salt Lake Res.* 8, 23-40.

ANEXO

Diversity of the fatty acid composition of *Artemia* spp. cysts from Argentinean populations

O. Ruiz^{1,*}, G. R. Medina¹, R. G. Cohen², F. Amat¹, J. C. Navarro¹

¹Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (CSIC), 12595 Ribera de Cabanes, Castellón, Spain

²Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, C/Ciudad Universitaria, Pabellón II, Buenos Aires 1428, Argentina

ABSTRACT: Nauplii of the branchiopod crustacean *Artemia* spp. are widely used as live food in aquaculture. Their nutritional value depends essentially on the fatty acid profile of their lipids, which can be very variable. Study of this variability (often species- and/or ecology-related) proposes interesting theoretical and applied questions. In the present study, cysts (dehydrated dormant eggs) from Argentinean *Artemia* spp. populations were analysed for their fatty acid profile. Most of the cyst samples analysed (n = 16) were obtained from *Artemia persimilis* populations, but 3 belonged to *A. franciscana*. Previous research indicated that *A. persimilis* populations are confined to inland biotopes, but in this study we report the presence of *A. persimilis* populations in coastal ecosystems. Cysts from all populations exhibited fatty acid profiles typical of either marine or freshwater, irrespective of the inland or coastal origin of their biotope. This study represents the first time that a significant amount of eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3) was detected in *A. persimilis* cyst samples. We hypothesize on some factors that presumably influence the fatty acid profiles of *Artemia* spp. cysts: (1) food resources from different habitats, which in turn can be influenced by environmental parameters, (2) the genetic make-up of each population, and/or (3) mechanisms of selective feeding.

KEY WORDS: *Artemia* · Fatty acids · Inland waters · Salt lakes · Ionic composition · Brines · Marine type · Freshwater type

— Resale or republication not permitted without written consent of the publisher —

INTRODUCTION

The biochemical composition of *Artemia* spp., in particular the fatty acid profiles of cysts (dehydrant dormant eggs) and nauplii, has been extensively studied because of the use of nauplii as live food in aquaculture (Bengtson et al. 1991). Yet scarce information is available on the factors that determine fatty acid composition and thus the nutritional value of diverse *Artemia* spp. as live food.

There are 2 limiting factors that constrain the use of *Artemia* nauplii in marine aquaculture. The first is related to the shortage of *Artemia* spp. resources, evidenced by the *Artemia* cyst crisis of the Great Salt Lake of Utah, GSL (Van Stappen 1997), which was exacerbated by a massive increase in cyst demand corresponding with increases in aquaculture world-wide. The second is fatty acid composition, which deter-

mines the nutritional value of different stocks as food for marine fish larvae.

At the Kyoto FAO technical conference on Aquaculture in 1976, the supply of *Artemia* spp. cysts was already foreseen as a restrictive factor in the development of world aquaculture. Since the mid 1980s, 90% of cysts consumed in world-wide aquaculture have been sourced from the GSL; consequently, Bengtson et al. (1991) strongly recommended that alternative cyst sources be prospected. Confounding this problem was the rapid spread of enrichment techniques (i.e. supplementation of essential nutrients by bioencapsulation) that allowed the use of nauplii of poor nutritional value in the larviculture of marine species and led to even more intensive harvesting of the cysts from the GSL and concomitant overexploitation of this ecosystem. Unsustainable practices, together with climatic phenomena like the El Niño Southern Oscillation (ENSO)

*Email: olga@iats.csic.es

and anthropogenic impacts, initiated a decrease in cyst harvesting, which then led to market fluctuations in cyst availability and quality and to increasing prices (Lavens & Sorgeloos 2000).

Presently, the maximum sustainable volume of harvestable cysts in the GSL is restricted to 6000 to 7000 t (wet weight) (Van Stappen 1997), and production in the GSL alone is not sufficient to supply the ever-expanding aquaculture industry. This situation has led to a more exhaustive study of *Artemia* biogeography, to the world-wide prospecting of sources of cysts, and to the exploitation of cysts from ecosystems that were previously poorly studied. Among these, the Argentinean sources deserve special attention because this country contains a broad range of saline lakes, lagoons and solar saltworks. Most of these environments are suitable for the development of natural populations of brine shrimp.

Amat et al. (1994) and Cohen et al. (1999) listed 4 locations between La Pampa and Buenos Aires provinces that represented alternative sources of cysts, and provided further evidence that the species involved was *Artemia persimilis*. Based on cytogenetic proofs, Papeschi et al. (2000) reported for the first time the presence of *A. franciscana* in Argentina. Subsequent cytogenetic analyses of *Artemia* from 4 Argentinean populations (Lipko et al. 2004) confirmed the presence of *A. franciscana*, and Amat et al. (2004) reported the presence of *A. franciscana* in Mar Chiquita salt lake, Las Tunas lagoon and a shallow lake in Salinas Grandes (Córdoba province). Amat et al. (2004) went on to confirm that *A. franciscana* was distributed north of 36° S and that *A. persimilis* was distributed south of 37° 10' S.

The validity of biomass and polyunsaturated fatty acid (PUFAs) profiles of *Artemia* nauplii as indices of nutritional value required to meet the elemental nutritional requirements of marine fish and crustacean larvae has been discussed extensively. It is known that nauplii from different cyst stocks comprise diverse and variable amounts of highly unsaturated fatty acids (HUFA) that are essential for marine organisms (Fujita et al. 1980). Watanabe et al. (1978) divided *Artemia* cyst samples into 2 categories according to their fatty acid profiles: freshwater-type *Artemia*, with a high concentration of linolenic acid (LNA, 18:3n-3) and low concentration of eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3), which are only suitable for feeding freshwater animals; and marine-type *Artemia*, with a higher EPA content and generally lower LNA, and which are more suitable for culturing marine species. It is widely acknowledged that some HUFA, i.e. EPA and docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3), are essential requirements of marine species if adequate larval growth and survival is to be obtained (Sargent et al. 1997). Essential fatty

acids in general, and DHA in particular, are ubiquitous in natural marine food resources (i.e. copepods), but larvae are not capable of their synthesis—hence use of the term 'essential dietary requirement'. Of importance are reports demonstrating that DHA is either absent or present only in trace amounts in *Artemia* cysts and nauplii (Navarro et al. 1992a, Léger et al. 1986).

The generalization that *Artemia* populations from coastal hypersaline biotopes are associated with high percentages of EPA, and those from inland ecosystems with increased amounts of LNA (Vos et al. 1984) is not true in all cases. Navarro et al. (1992a) reported on *Artemia* populations from inland that produced cysts with quantities of EPA as well as high levels of LNA. This 'intermediate' type of *Artemia* was also reported by Watanabe et al. (1978).

At present, information on the fatty acid composition of *Artemia* focuses mainly on the presence/absence of some fatty acids in cysts and nauplii of different populations: Amat et al. (2004) studied *A. franciscana* populations at Las Tunas and Mar Chiquita, and Sato et al. (2004) studied an *A. persimilis* population from Salinas Chicas de Buenos Aires, and an *A. franciscana* population from Salinas Grandes de Córdoba. The latter was presumably mistakenly reported (by Sato et al. 2004) as *A. persimilis* (Amat et al. 2004). The specific underlying factors that determine particular fatty acid profiles remain unclear.

Between 1992 and 2003, Argentina was surveyed for hypersaline biotopes and the presence of brine shrimp populations. A total of 17 new sampling spots from the provinces of Santiago del Estero, Córdoba, Santa Fe, Buenos Aires, La Pampa, Río Negro, Chubut and Santa Cruz were visited. The survey was not comprehensive, because the northern and western provinces could not be included for logistic reasons; however, the survey was at least representative of the areas of *Artemia* distribution within Argentina.

This study provides detailed information on the fatty acid profiles of *Artemia* cysts sampled in Argentina. Our objectives were to (1) gain an understanding of the factors that determine the fatty acid composition of *Artemia* cysts, and (2) obtain information of interest to aquaculture.

MATERIALS AND METHODS

Location and biotope characteristics. Evidence for the presence of brine shrimp was found in most biotopes, either as live populations under conditions of low salinity, or as accumulations of cysts along shores where high salinity brines did not allow the persistence of living populations. The biotopes and populations from where cysts were sampled are summarized

in Table 1. Mar Chiquita and Las Tunas populations, described by Amat et al. (2004), are included for the sake of comparison. The biotopes were very diverse: most were located inland, but a few were coastal (El Inglés, Caleta Olivia and San Julián) (Fig. 1). Biotope size was also extremely diverse, ranging from a few hectares at Caleta Olivia, San Julián and Ruta 3 to the small inland sea of Mar Chiquita, whose variable surface area comprises between 200 000 and 500 000 ha (Amat et al. 2004). Generally, most ecosystems covered a few thousand ha; some lay in shallow depressions

above sea level, whereas others enclosed deep endorheic basins, such as Gualicho (Bajo Gualicho salt mine), located 45 m below sea level.

Collection of samples. Samples of cysts were collected from the surface of brines or the banks of salt ponds or pools and preserved in saturated brine. Once in the laboratory, they were processed as described by Navarro (1985).

When present (see Table 3), brines were evaluated *in situ*. Temperature and pH were measured with a digital thermometer and pH meter (Hanna Instruments); salinity was recorded with a Shibuya S-1 refractometer (Optical Co.). Brine samples were collected and transported to the laboratory for ionic analysis. Carbonates and bicarbonates were determined by acid titration, chloride by AgNO₃ titration, and sulphate by precipitation titration with BaCl₂ and sodium rodizonate as an indicator in water-acetone medium. Na⁺ and K⁺ were analysed by atomic spectrophotometric emission, and Ca²⁺ and Mg²⁺ by atomic spectrophotometric absorption (Varian Techtron Model AA275) (Apha 1993). Analyses were performed in duplicate, and all relative errors were < 1.0%.

Total dissolved solids (TDS) were calculated as the sum of the above ion concentrations, because these accounted for most of the dissolved salts.

Fatty acid analysis. Lipid extractions and fatty acid analyses were carried out as in Navarro et al. (1992a,b). Prior to lipid extraction, cyst samples were hydrated in distilled water under strong aeration until cysts were observed to be completely spherical. They were then decapsulated with sodium hypochlorite. Total lipids were extracted and stored in chloroform/methanol (ratio 2/1 v/v) with 0.01% butylated hydroxytoluene (BHT) (Sigma Chemical) as an antioxidant. Lipid aliquots were transmethylated overnight after the addition of nonadecaenoic fatty acid (19:0) (99% pure; Sigma Chemical) as an internal standard. Fatty acid methyl esters (FAMES) were extracted with hexane/diethyl ether (ratio 1/1 v/v) and purified by thin-layer chromatography (silica gel G 60, Merck) using hexane/diethyl ether/acetic acid (ratio 85/15/1.5 by vol.) as the solvent

Table 1. Summary of sites prospected for *Artemia* cyst populations in Argentina. Salitral Negro sampled in 2 areas—2S and 3S

Province	Locality (species)	Area (ha)	Region	Latitude, longitude	
Santiago del Estero	El Saladillo (<i>A. franciscana</i>)	6100	Inland	28° 20' S, 62° 70' W	
Córdoba	Mar Chiquita (<i>A. franciscana</i>)	500 000	Inland	30° 20' S, 62° 10' W	
	Las Tunas (<i>A. franciscana</i>)	1700	Inland	33° 45' S, 62° 32' W	
La Pampa	Colorada Chica (<i>A. persimilis</i>)	1100	Inland	38° 23' S, 63° 36' W	
	Salinas Grandes de Hidalgo (<i>A. persimilis</i>)	3900	Inland	37° 13' S, 63° 26' W	
	Colorada Grande (<i>A. persimilis</i>)	6740	Inland	38° 18' S, 63° 42' W	
	Callaqueo (<i>A. persimilis</i>)	2140	Inland	38° 34' S, 63° 32' W	
	Salitral Negro 2S (<i>A. persimilis</i>)	2400	Inland	38° 44' S, 63° 13' W	
Buenos Aires	Salitral Negro 3S (<i>A. persimilis</i>)	2400	Inland	38° 45' S, 63° 27' W	
	Piedras (<i>A. persimilis</i>)	2200	Inland	40° 41' S, 62° 40' W	
	Algarrobo (<i>A. persimilis</i>)	200	Inland	40° 36' S, 62° 56' W	
	El Inglés (<i>A. persimilis</i>)	200	Coastal	40° 43' S, 62° 28' W	
	Palos Blancos (<i>A. persimilis</i>)	300	Inland	39° 28' S, 62° 45' W	
	Salinas Chicas (<i>A. persimilis</i>)	3460	Inland	38° 43' S, 62° 56' W	
	Salitral de la Vidriera (<i>A. persimilis</i>)	5000	Inland	38° 42' S, 62° 40' W	
	Río Negro	Gualicho (<i>A. persimilis</i>)	32 800	Inland	40° 24' S, 65° 13' W
	Santa Cruz	Caleta Olivia (<i>A. persimilis</i>)	30	Coastal	46° 27' S, 67° 32' W
		San Julián (<i>A. persimilis</i>)	42	Coastal	49° 17' S, 67° 46' W
Ruta 3 (<i>A. persimilis</i>)		12	Inland	47° 28' S, 67° 16' W	



Fig. 1. Sampling sites of Argentinean *Artemia* populations

system. Analyses of FAMES were performed with a Fisons Instruments GC 8000 (Thermo Electron) gas chromatograph equipped with a fused silica 30 m × 0.25 mm open tubular column (tracer, TR-WAX, film thickness: 0.25 µm; Teknokroma) and a cold on-column injection system, using helium as carrier and a 50 to 220°C thermal gradient. Peaks were recorded on a personal computer using the software Chrom-Card for Windows (Fisons CE Instruments), and were identified by comparison with known standards. All solvents used in lipid extractions and fatty acid analyses were analytical grade and purchased from Merck, with the exception of glacial acetic acid that was acquired from Panreac.

Statistical analyses. Fatty acid data were analysed statistically using a chemometric method. Variables

were entered into SPSS version 12.0 in order to conduct multivariate principal components analysis (PCA). In this analysis, different variables (relative proportions of selected fatty acids) are displayed on a single plane (principal axis) that accounts for maximum dispersion (variance). Principal component plots are positions of the original variables along the new axes (principal components; PC). Points in the component plot are the variables, and the coordinates of each variable are its factor loadings. Variables at the end of each axis have high loadings on only that factor. Variables near the intersection of the axes are associated with neither factor. The graphical representation (factor score plot) of scores of cases shows the relationships among populations, and is also useful for identifying outliers and unusual cases. The 9 most common fatty acids were used as variables (palmitic [16:0], stearic [18:0], palmitoleic [16:1n-7], *cis*-7-hexadecenoic [16:1n-9], *cis*-vaccenic [18:1n-7], oleic [18:1n-9], linoleic [18:2n-6], linolenic [18:3n-3], eicosapentaenoic [20:5n-3]), in addition to the 16:0/16:1 ratio.

The ionic composition of the brine samples available, together with data from literature (Angelelli et al. 1976, Amat et al. 2004), were plotted in a Piper diagram. With this method it is possible to display specific cations (Ca^{2+} , Mg^{2+} , $\text{Na}^+ + \text{K}^+$) and specific anions ($\text{CO}_3\text{H}^- + \text{CO}_3^{2-}$, Cl^- , SO_4^{2-}) as percentages of total cations and anions, respectively, on separate trilinear diagrams. The 2 points obtained for every sample in both trilinear diagrams are then projected onto a central diamond-shaped plot, parallel to the upper edges of the trilinear diagrams. This method allows the graphical representation of the classification of waters by hydrochemical facies, with the added benefit of allowing hydrochemical mixing trends to be identified.

RESULTS

According to biometrical, morphometrical, cytogenetic and DNA marker studies in progress, the population from El Saladillo (province of Santiago del Estero) together with those from Laguna Mar Chiquita and Las Tunas (previously reported by Amat et al. 2004) represented *Artemia franciscana*. The remainder of the populations included in the present study represented *A. persimilis*, as determined by morphometric studies and results obtained by the Instituto de Acuicultura Torre de la Sal (CSIC) (unpubl. data).

Fatty acid profiles of cysts from the Argentinean *Artemia* populations investigated are shown in Table 2. Based on the fatty acid profile of decapsulated *Artemia franciscana* cysts, populations from Mar Chiquita and Las Tunas Lagoons could be ascribed to marine-type *Artemia* (high EPA, low LNA,

Table 2. Fatty acid composition (% of total fatty acids) of total lipids from Argentinean populations of *Artemia* cysts. Data are mean of 3 replicates. Variability <10%. LNA: linolenic acid; ARA: arachidonic acid; EPA: eicosapentaenoic acid; DHA: docosahexaenoic acid; tr: trace amounts; nd: not detected; PUFA: polyunsaturated fatty acids; n-3 HUFA: $\geq 20:3n-3$; n-6 HUFA: $\geq 20:2n-6$

Fatty acid	Population																			
	Freshwater-type ^a							Marine-type ^a												
	El Saladillo (inland)	Hidalgo (inland)	Colorada Grande (inland)	Colorada Chica (inland)	Callaqueso (inland)	Salitral Negro/2S (inland)	Salitral Negro/3S (inland)	Piedras (inland)	El Inglés (coastal)	Salinas Chicas (inland)	Gualicho (inland)	Calata Olivia (coastal)	Tunas ^b (inland)	Las Chiquitas ^b (inland)	Mar Ydriera (inland)	Salitral (inland)	Algarrobo (inland)	Palos Blancos (inland)	Ruta 3 (inland)	San Julián (coastal)
14:0	nd	0.7	0.6	0.7	0.7	0.7	0.5	1.0	0.7	0.5	2.6	0.7	1.1	1.3	1.7	1.6	0.7	4.5	1.9	1.9
14:1	1.8	1.8	nd	2.1	nd	nd	nd	1.4	1.9	1.4	1.3	nd	1.2	0.6	1.4	1.2	0.6	1.0	nd	nd
15:0	0.6	0.3	0.2	0.3	0.2	0.1	0.3	0.4	0.4	0.2	0.4	0.3	0.9	0.5	0.8	0.5	0.5	0.9	1.1	1.1
15:1	1.0	1.7	0.7	1.4	0.5	0.7	0.5	nd	nd	1.3	nd	0.3	0.7	0.3	nd	nd	nd	nd	0.2	0.2
16:0	15.7	14.6	13.8	12.4	13.3	13.7	11.8	17.1	14.0	12.8	28.9	13.4	12.7	15.6	17.8	14.7	15.2	19.7	15.8	15.8
16:1n-9	0.9	0.5	0.4	0.1	0.4	0.5	0.5	0.4	0.3	0.1	0.1	1.2	nd	0.6	1.1	nd	nd	2.5	0.4	0.4
16:1n-7	6.0	5.7	4.9	7.4	5.1	4.9	5.4	6.3	7.1	4.3	7.2	6.0	10.8	10.1	15.8	20.8	26.4	13.4	16.5	16.5
16:2	nd	0.2	0.4	0.4	0.2	0.5	0.3	nd	0.2	0.1	0.4	0.3	0.6	0.3	0.7	0.6	0.5	1.1	0.5	0.5
17:0	1.9	0.4	0.8	0.1	0.8	1.0	0.8	0.5	0.6	0.1	0.6	0.7	nd	nd	1.0	0.8	0.6	1.0	1.2	1.2
18:0	1.7	1.4	1.7	1.1	1.6	1.4	1.2	2.2	1.2	1.0	2.8	0.9	4.1	1.5	1.5	0.9	0.9	1.3	2.83	2.83
18:1n-9	4.1	4.7	4.1	4.4	4.0	4.1	3.7	4.5	4.4	3.9	5.7	4.1	3.7	3.7	4.8	4.7	4.1	5.0	4.8	4.8
18:1n-7	8.1	7.8	6.6	10.9	7.1	6.2	7.3	7.8	8.6	6.4	5.2	9.3	9.4	7.1	12.5	12.3	12.5	9.3	8.4	8.4
18:2n-6	10.5	3.8	5.5	5.3	5.7	5.7	5.3	4.2	4.0	4.3	3.6	4.0	3.3	4.1	1.8	1.8	1.7	2.3	2.9	2.9
18:3n-6 (LNA)	nd	nd	nd	nd	nd	0.1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.3	0.1	0.3	0.2	0.2	nd	0.2	0.2
18:3n-3 (LNA)	21.1	5.4	5.6	4.6	5.6	5.6	5.7	5.1	5.9	7.0	2.3	4.8	0.8	3.3	1.1	1.0	1.9	1.0	1.5	1.5
20:0	0.3	0.3	0.3	0.1	0.3	0.2	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.9	0.3	0.3
20:1n-9	0.3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.2	nd	0.1	nd	0.1	nd	0.1	nd	nd	nd
20:1n-7	0.3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.2	nd	0.1	nd	0.1	nd	0.1	nd	nd	nd
20:2n-6	nd	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2	nd	0.1	0.2	0.1	nd	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3	1.3	1.3
20:3n-6	nd	0.2	nd	0.1	nd	nd	nd	nd	0.2	0.2	0.1	tr	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.3	1.3	1.3
20:3n-3	nd	0.5	0.6	0.2	0.5	0.7	0.5	0.2	0.3	0.6	0.2	0.3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
20:4n-6 (ARA)	0.5	0.1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.2	0.1	0.1	0.8	1.8	1.1	1.1	1.6	0.6	1.8	1.3	1.3
20:4n-3	0.6	0.7	0.8	0.6	0.8	0.8	0.8	0.4	0.6	0.8	0.3	0.8	0.2	0.7	0.4	0.3	0.4	0.3	0.4	0.4
20:5n-3 (EPA)	3.6	0.2	0.1	0.1	0.5	0.1	0.2	0.3	1.4	0.3	1.1	10.1	11.6	8.7	14.4	16.0	11.0	9.7	14.2	14.2
22:0	0.4	nd	0.1	0.2	0.3	0.1	0.3	0.3	0.2	nd	0.4	0.2	0.2	0.2	nd	nd	nd	nd	0.3	0.3
22:5n-3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.1	nd	0.3	nd	nd	nd	0.3	nd	nd	0.6	nd	nd
22:6n-3 (DHA)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	tr	tr	nd	nd	tr	nd	tr	1.5	tr	tr
24:1n-9	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Total	91.3	89.3	87.5	88.1	87.2	86.3	85.2	92.8	90.2	88.9	93.1	93.7	90.1	94.4	93.8	94.1	96.5	95.4	92.4	92.4
Saturates	22.7	20.7	19.5	18.0	19.3	19.6	17.4	23.5	20.3	17.5	38.4	19.4	18.4	21.2	26.0	22.3	21.0	31.4	25.2	25.2
Monoenes	34.1	32.3	28.4	36.0	28.3	27.7	28.3	30.0	31.9	26.8	31.1	35.4	39.4	37.8	44.0	47.3	51.7	42.8	40.3	40.3
PUFA	34.5	36.3	39.6	34.2	39.6	39.0	39.6	38.3	38.0	44.7	23.6	39.0	32.0	35.1	23.8	24.5	23.9	21.2	26.9	26.9
n-3	21.3	30.4	31.8	27.2	31.9	31.2	32.2	32.8	32.2	36.9	16.7	33.0	21.4	27.7	18.2	19.2	19.9	14.5	19.0	19.0
n-6	11.0	4.3	5.7	5.6	5.9	5.8	5.5	4.3	4.6	4.7	3.8	4.8	5.6	5.5	3.5	3.9	2.7	4.3	5.7	5.7
n-3 HUFA	4.2	1.5	1.6	0.8	2.0	1.6	1.6	0.8	2.3	1.7	2.0	11.2	11.9	9.5	15.0	16.4	12.0	12.0	14.8	14.8
n-6 HUFA	0.5	0.3	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2	0.4	0.2	0.1	0.8	1.9	2.0	1.3	1.4	1.8	0.8	2.0	2.7	2.7
16:0/16:1	2.3	2.4	2.0	1.7	2.4	2.6	2.0	2.7	1.9	2.9	4.0	1.9	1.1	1.4	1.1	0.7	0.6	1.2	0.9	0.9

^aClassification according to Watanabe et al. (1978)

^bPopulations described by Amat et al. (2004)

16:0/16:1 ratio ≤ 1 ; Navarro et al. 1992b), whereas the population from El Saladillo could be categorised as freshwater-type *Artemia* (high LNA, low EPA). Among the cysts of *A. persimilis* populations, those from Salitral de la Vidriera, Palos Blancos, Algarrobo, Ruta 3 and San Julián were marine-type. Cysts from all the other *A. persimilis* were freshwater-type, exhibiting 16:0/16:1 ratios close to 2 or higher, as in the case of Gualicho.

Palmitic acid (16:0) was found in relatively constant proportions (range: 11.8 to 19.7% of total fatty acids) in the cysts of all populations regardless of type, again with the exception of Gualicho where 16:0 contributed 28.9%. Proportions of palmitoleic acid (16:1n-7) were higher in marine-type populations. Arachidonic acid (ARA, 20:4n-6) was found in all marine-type cysts, but was present in only a few freshwater-type cyst samples and in lower quantities, except in those samples from Caleta Olivia.

High proportions of n-3 HUFA were found in the marine-type when compared with freshwater-type cysts, again with the exception of Caleta Olivia (Table 2). As expected, DHA was generally absent, or present only in trace amounts in some samples, for both kinds of cysts. Ruta 3 was an exception: in this population, DHA accounted for 1.5% of total fatty acids.

The component plot (Fig. 2) obtained from a PCA shows variables that were responsible for separation along the 2 PCs calculated. The 2 PCs of this analysis accounted for 71% of the variation in the data set. When the fatty acid data were projected onto the PCs generated, a factor score plot was obtained (Fig. 3) in which the populations were grouped according to variable (fatty acid) loadings. Variables defining marine- (16:1n-7, 20:5n-3, 18:1n-7) or freshwater-type (18:2n-6, 18:3n-3, 16:0/16:1 ratio) are associated with Component 1, and both sets are negatively correlated. Freshwater-type populations are located on the righthand side of Component 1, and marine-type populations on the lefthand side. Intermediate-type populations are grouped between both. Note that the population of Gualicho has the most extreme score in Factor 2, being 3.4 SD larger than the mean Factor 2 score. This population is an outlier because of its high 16:0/16:1 ratio. Populations were essentially grouped according to their profile type—marine vs. freshwater—and grouping could not be associated with

coastal/inland locations, providing evidence for the presence of both freshwater- and marine-types regardless of geographical distribution.

Table 3 gives the concentrations of major ions, expressed as % of total major ions. These concentrations, displayed on the cation/anion triangles in the Piper plot (Fig. 4), represent sodium- and chloride-dominated brines, classified as $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ facies, which are typical of marine and deep ancient ground waters.

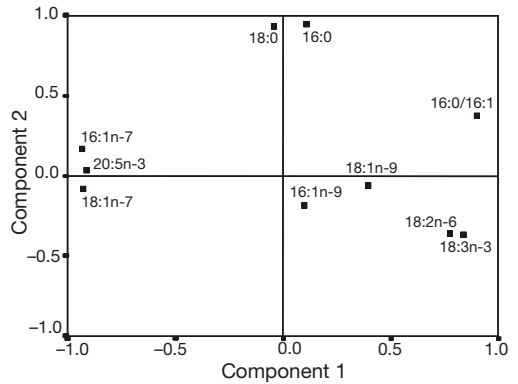


Fig. 2. Component plot of principal component analysis (PCA) of selected fatty acids from total lipids of Argentinean *Artemia* cysts

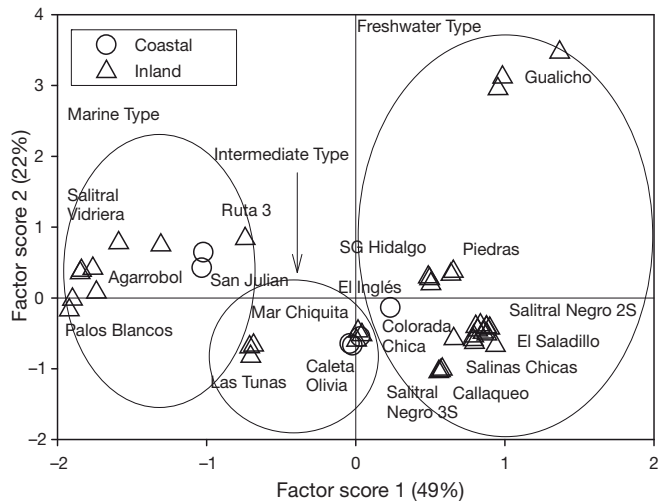
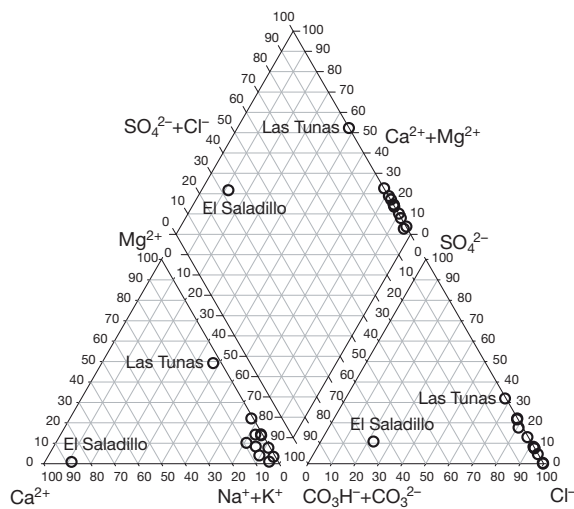


Fig. 3. Factor score plot of PCA of selected fatty acids from total lipids of Argentinean *Artemia* cysts. Grouping is based on the freshwater- (righthand side of Factor 1, x-axis) or marine-type (lefthand side of Factor 1) fatty acid character of *Artemia* cysts

Table 3. Physicochemical parameters and ion chemistry of brines of selected sampling sites. Values are mg l^{-1} , unless otherwise stated. S: salinity

	Mar chiquita ^a (Chaco-Pampa Plain)	Las Tunas ^a (Chaco-Pampa Plain)	El Saladillo ^b (Chaco-Pampa Plain)	Hidalgo ^b (Chaco-Pampa Plain)	Piedras (Patagonia Plateau)	El Inglés (Patagonia Plateau)	Salinas Chicas (Chaco-Pampa Plain)	Palos Blancos (Chaco-Pampa Plain)	Caleta Olivia (Patagonia Plateau)	Ruta 3 (Patagonia Plateau)	San Julián (Patagonia Plateau)
T (°C)	30	34	—	—	18	26	19.9	24	9	7.50	6
S (%)	48	40	185	300	345	240	—	280	230	12	80
pH	8.1	9	7.72	—	7	7	7.77	7.1	7.68	8.80	8.40
Ca ²⁺	21100	20000	524	11900	969	798	857	826	684	68	1522
Mg ²⁺	8000	172000	3.1	33000	15120	10224	2112	9168	3826	10	1320
Na ⁺	317900	299400	77.4	361000	97431	110819	111600	105613	84728	1904	25585
K ⁺	29600	22300	1.5	3800	3591	6949	4156	2693	1004	40	206
Σ cations (ppm)	376600	513700	606	409700	117111	128790	118725	118300	90242	2022	28633
% Ca ²⁺	5.60	3.89	86.47	2.80	0.83	0.62	0.72	0.70	0.76	3.36	5.32
% Mg ²⁺	2.12	33.48	0.51	7.94	12.91	7.94	1.78	7.75	4.24	0.49	4.61
% Na ⁺	84.41	58.28	12.77	88.11	83.20	86.05	94.00	89.28	85.44	94.16	89.35
% K ⁺	7.86	4.34	0.25	0.93	3.07	5.40	3.50	2.28	1.11	1.98	0.72
CO ₃ H ⁻	700	3400	444	100	461	282	193.4	461	824	95	293
SO ₄ ²⁻	171000	444300	56.6	62200	190000	23040	11500	19200	24960	2668	13440
Cl ⁻	444300	386400	87.2	556900	190000	188000	173597	174000	123380	7587	35820
Σ anions (ppm)	616000	635800	587.8	619200	190462	211322	185290.4	193661	149164	3450	49553
% CO ₃ H ⁻	0.11	0.53	75.54	0.02	0.24	0.13	0.10	0.24	0.55	2.75	0.59
% SO ₄ ²⁻	27.76	38.69	9.63	10.90	6.21	9.91	6.21	9.91	16.73	22.26	27.12
% Cl ⁻	72.13	60.77	14.83	89.94	99.76	88.96	93.69	89.85	82.71	74.99	72.29

^aFrom Amat et al. (2004)^bFrom Angelelli et al. (1976)Fig. 4. Piper diagram of the ions (%) of brines of some Argentinean *Artemia* populations: El Saladillo, Mar Chiquita, Las Tunas, Hidalgo, Piedras, Salinas Chicas (Buenos Aires), El Inglés, Salitral de la Vidriera, Palos Blancos, Caleta Olivia, Ruta 3 and San Julián (only outliers named on diagram)

Only 1 brine sample (from El Saladillo) was characterised by Ca^{2+} - CO_3H^- dominance, typical of shallow and fresh ground waters, and was consequently separated from all other brines.

DISCUSSION

Several authors reported that the fatty acid profile of *Artemia* and other zooplankton reflects the fatty acid profile of their food (Léger et al. 1986, Navarro & Amat 1992). Vos et al. (1984), Léger et al. (1986) and Lavens et al. (1989) have suggested that variations in HUFA content among cyst batches might result from variations in the composition of the microalgae available as food for the parental *Artemia* populations in the natural habitat. Consequently, the fatty acid profile of *Artemia* cysts could be considered as a biomarker for the composition of algal food consumed by the brine shrimp parental population.

Sargent et al. (1988) established that biomarkers are chemical components of organisms that can be analyzed directly from the environment and, ideally, can be interpreted both quantitatively and qualitatively in terms of *in situ* biomass. Some fatty acids, or groups of them, are preferentially associated with certain classes of algae, and can therefore be useful as biomarkers for these algal classes whose presence (diversity) and growth may in turn vary depending on the characteris-

tics of the medium in which they live. Mesocosm-type studies conducted by Fraser et al. (1989) revealed the presence of 18:4n-3 and 18:5n-3 in marine phytoplankton samples (Loch Thurnaig, Scotland) at the beginning of experimentation, suggesting the proliferation of Chrysophyceae, Haptophyceae and Dinoflagellata. The phytoplankton profiles then exhibited a decrease in the proportions of these fatty acids, and increases in proportions of 16:4 and 20:5n-3—major PUFA of diatoms—were instead observed. If *Artemia* reflect the fatty acid profile of their diet, then some fatty acids could be used as indicators of the food composition within each ecosystem.

Fatty acids can be used as biomarkers not only in terms of *in situ* biomass but also on a larger scale, characterizing for example inland and/or coastal biotopes, as reported in the study of Navarro et al. (1992b). These authors pointed to LNA as a phenotypic indicator of *Artemia* cysts from inland biotopes, supporting the results of Léger et al. (1986) on the fatty acid composition of cysts from 2 inland *A. franciscana* populations (from Canada and GSL). LNA as a biomarker of inland habitat is also evident in Amat et al.'s (2004) research on the fatty acid profiles of cysts from the inland populations included in this study: Mar Chiquita and Las Tunas.

In the present study we reported that inland populations of *Artemia persimilis* lack high levels of LNA (Salitral de la Vidriera, Algarrobo and Ruta 3), or exhibit a moderate proportion of LNA (6.5%) as in the case of cysts from Palos Blancos. However, it should be noted that although Palos Blancos Lagoon is not very close to the sea (50 to 60 km), it was connected with it in the past. Nowadays the brine composition of the lagoon is typical of sea water, even though it is altered by the inflow of the Rio Colorado local irrigation systems. In contrast, high LNA levels were found in cysts from coastal biotopes (Caleta Olivia and El Inglés). To the best of our knowledge, this is the first time that freshwater-type cysts have been reported in coastal *Artemia* populations. Thus, although the difference in LNA content between both general types of population—inland and coastal—is indicative of their freshwater (high LNA, low EPA) or marine (low LNA, high EPA) character, it does not determine their ascription to these groups.

Watanabe (1987) reported that ARA was associated with marine-type *Artemia*. All marine-type populations described here exhibited higher values of ARA than did freshwater types, in contrast with the results of Navarro et al. (1992b) whereby this fatty acid was present regardless of the inland (freshwater-type) or coastal (marine-type) origin of populations.

Another issue that deserves close attention is the ratio of 16:0/16:1. Navarro et al. (1993) stated that this

ratio was lower in marine-type than in freshwater-type cysts. The results of the present study support this assertion, because the 16:0/16:1 ratio was lower (~0.5 to 1) in all marine-type populations than in freshwater types (Table 2). It can thus be concluded that the 16:0/16:1 ratio is a good biomarker that characterizes samples in terms of marine- vs. freshwater-type. For instance, cysts from the Caleta Olivia population exhibited high LNA (17%) and high EPA (10.1%), and hence would be classified as mixed type, but their high 16:0/16:1 ratio (1.9) would allow their classification as freshwater type.

The hypersaline biotopes studied here are characterized by variable ecological parameters that depend on local climate, altitude and the ionic composition of brines. Quirós & Drago (1999) studied Argentina according to geomorphological traits and established 6 major regions: (1) Puna, (2) Chaco-Pampa Plain, (3) Peri-Pampean Sierras, (4) Andean-Patagonia, (5) Patagonia Plateau and (6) Misiones Plateau. They determined that the principal mechanisms influencing the chemistry of inland waters were rock dominance and evaporation, with atmospheric contributions being less important. Mineral weathering mainly controls the chemical composition of the diluted continental water bodies, whereas the evaporation-precipitation process influences the saline and hypersaline water bodies.

The populations studied here are located in 2 of the above-mentioned regions: the Chaco-Pampa Plain and the Patagonia Plateau. The Chaco-Pampa Plain is represented by El Saladillo, Mar Chiquita, Las Tunas, Salinas Grandes de Hidalgo, Colorada Grande, Colorada Chica, Callaqueo, Salinas Chicas, Salitral Negro, Salitral de la Vidriera and Palos Blancos. This region exhibits a large degree of hydrochemical heterogeneity that ranges from the much-diluted waters of the aeolian shallow lakes (located in the central and north-western portions of the Corrientes Province) to the highly saline waters in the provinces of Buenos Aires and La Pampa. Populations from El Inglés, Piedras, Algarrobo, Gualicho, Caleta Olivia, Ruta 3 and San Julián are located on the Patagonia Plateau region, whose large hypersaline 'salares' host medium-high salinity (10 to 100 g l⁻¹) waters.

We compared the percentages of major ions from brines analysed in this study with those reported by Quirós & Drago (1999) for Argentinean lakes; 7 lagoons are located within the Chaco-Pampa Plain (Table 3), whereas the remaining 5 lagoons are located on the Patagonia Plateau and are largely characterized by water chemistry typical of endorheic basins.

Owing to great climatic variability and a peculiar north-south orographic distribution, the Argentinean lakes system includes a broad diversity of aquatic environments. Perhaps the most updated information on

this topic is available from Quirós & Drago (1999); however, this review only gives the common characteristics of a few representative lakes from each region, and it is therefore very difficult to characterize each lake individually. Within the biotopes associated with the *Artemia* populations studied here, the anionic fraction of brines was dominated by Cl^- and the cationic fraction by Na^+ . This indicates the nature of each biotope and demonstrates that all waters are thalassic solutions, with the exception of El Saladillo which was rich in CO_3H^- and Ca^{2+} and hence athalassic. In summary, the waters of the biotopes studied here were sodium chloride-dominated (only one being calcium bicarbonate-dominated), regardless of the geomorphological region to which they belong. Therefore, it was not possible to associate particular fatty acid profiles (marine- or freshwater-type) to particular ionic compositions.

Very high and variable salinity levels favour several species of blue-green algae and flagellates that are low in n-3 HUFAs (Scott & Middleton 1979). In contrast, diatoms and flagellates from low-salinity waters exhibit higher n-3 HUFA levels. This could explain the higher proportions of n-3 HUFA in the cysts of *Artemia* populations from Mar Chiquita and Las Tunas lagoons, whose waters are less saline (Table 3).

Navarro & Amat (1992) brought attention to a possible genotypic influence on the fatty acid profile of *Artemia*, given the presence and proportion of some fatty acids in cysts irrespective of dietary levels available to parental populations. Phenotype is the result of gene interaction with the environment; i.e. variability in phenotypic expression is determined by 2 components: genotypic and environmental variability. In a descriptive study such as this, it is very difficult to ascertain both components. Preliminary controlled experimental studies conducted in our laboratory (unpubl. data) point towards an important phenotypic influence on the diet that is less evident on a mesocosm scale.

The biosynthesis of lipids in algae can be markedly influenced by the physiological state of the organism and by environmental conditions (Sargent et al. 1988). Algae grown at high light intensities tend to increase concentrations of n-3 PUFAs in their total lipids (Pohl & Zurheide 1979). Decreasing temperatures tend to increase the concentration of n-3 PUFAs in cellular total lipid (Ackman & Tocher 1968). We can hypothesize that the factors that influence the nutritional value of *Artemia* cysts could be related to phytoplankton dynamics, which are responsive to variable environmental conditions such as temperature, light and nutrients. In phytoplankton, variable tracer lipid signals have been observed within and between species in the same group (Chuecas & Riley 1969). St John & Lund (1996) observed variations in the ratio of 16:0/16:1 in *Skeletonema costatum* that ranged from 0.43 to 2, and

attributed these variations to different environmental conditions. In the present study, as in many others, information on environmental parameters (temperature, photoperiod, rainfall, nutrients, etc.) over extended time periods was not available. All the available hydrological and environmental data were instantaneous; thus, it becomes difficult to establish any relationships between fatty acid profiles and ecological environmental conditions.

Another potential influence on the fatty acid profile of *Artemia* could be the salinity of brines. Salinity influences biodiversity in hypersaline biotopes: biodiversity decreases as salinity increases, owing to the mere exclusion of less-tolerant organisms (Davis 1990). *Artemia* will graze on a diversity of microparticulate food (microalgae, bacteria) whose composition is determined by its salinity tolerance.

Studies conducted by Jones & Flynn (2005) indicate that, in terms of the conversion of prey carbon-nitrogen (CN) into predator CN, copepod population growth is higher when feeding on a mixed diet (diatoms and dinoflagellates) rather than on a monospecific diet. These authors emphasized the importance of selective feeding, necessary to ensure a mixed diet and to maximize growth rates. Given the selective feeding abilities of copepods, the occurrence of a near-monospecific phytoplankton bloom does not mean that the dominant organism is the only or even the main food item consumed. *Artemia* also likely exhibits preferential selective grazing under natural environmental conditions that are suboptimal in terms of microparticulate food availability. This is substantiated by the behaviour of *Artemia*, which grazes on algae settled on the bottom or walls of culture containers where diatom n-3 HUFA-rich (EPA-rich) plankton thrives (Savage & Knott 1998; authors' unpubl. data). These factors may help to account for the variable fatty acid profiles of *Artemia* cysts.

The lipid metabolism of *Artemia* is largely unknown. Unusual features such as the capacity for bioconversion from linoleic acid (Schauer & Simpson 1985) to EPA have been suggested. The different activity of enzymes involved in chain elongation and desaturation might be influenced by external factors. High proportions of HUFA, mainly EPA, are characteristic of *Artemia tibetiana* cysts (Van Stappen et al. 2003; authors' unpubl. data regarding 3 Tibetan samples—Ying Yu, Lagor Ko and Gaize). Van Stappen et al. (2003) pointed out a link between the HUFA patterns of phytoplankton living at high altitudes and increasing UV radiation, and proposed that the unusually rich HUFA content of *A. tibetiana* cysts may reflect the feeding environment of the parent population.

In the relatively cold Tibetan biotopes (which exceed 4500 m above sea level and are exposed to high levels

of UV radiation), *Dunaliella salina* and *Chlamydomonas* sp. (Chlorophyta) are the dominant algae (Zheng 1997). These species are poor in HUFA when cultured, reflecting *in situ* conditions (Poerschmann et al. 2004); in contrast, the HUFA content in *Artemia tibetiana* cysts is high, reaching values up to e.g. 16 to 21% for EPA (Van Stappen et al. 2003). From this viewpoint, a direct correlation between the fatty acid profile of *A. tibetiana* cysts or nauplii and that of dominant algae remains undemonstrated. However, it is commonly suggested that certain PUFAs affect animal physiology via their impact on cell membrane fluidity. PUFAs can act as a membrane lipid antifreeze. The capacity to adjust cell membrane fluidity is an advantageous characteristic of organisms that remain active at low temperatures (Pruitt 1990). This has been well established for many aquatic invertebrates such as freshwater cladocerans and marine and freshwater copepods (Farkas 1979). It is possible that the HUFAs found in cysts of *A. tibetiana* (Van Stappen et al. 2003) have a similar lipid-antifreeze function. This same phenomenon may account for the fatty acid profile of cysts from the San Julian population in Argentina. San Julian was the most southern Argentinean *Artemia* population studied here, and therefore the coldest and the most exposed to UV radiation.

It remains unclear why inland Argentinean populations of *Artemia franciscana* (like those from Mar Chiquita and Las Tunas Lagoons) show marine-type profiles whereas most *A. persimilis* populations present in habitats of similar nature exhibit freshwater-type profiles. An explanation might be found in a combination of factors, such as (1) the variability of environmental conditions (salinity, ionic composition, UV intensity, microalgae composition etc.) in different ecosystems, (2) the genetic characteristics of each population or species, which perhaps predetermines the fatty acid profile to some extent, (3) selective feeding, dependent on the food resources available, or (4) all of the above.

Further research and genetic characterization of marine- and freshwater-type populations is needed to contribute to an understanding of factors that affect the fatty acid profile and thus the nutritional value of *Artemia persimilis* in particular, and *Artemia* in general. Research on some of these aspects is already underway in our laboratories. Argentinean *Artemia* may be ideal for such studies, given the great diversity of biotopes and the peculiar distribution of the species, and the fact that cultures remain apparently free from accidental or deliberate inoculations.

Acknowledgements. We thank M. A. Montolio and F. Fernandez for their technical assistance. Comments by O. Monroig and F. Hontoria improved the manuscript. This research was supported in part by the Spanish Ministry of Science and

Technology project AGL2001-1968 and EU project ICA4-CT-2001-10020 (INCO). O.R. is a pre-doctoral fellow of the Spanish Education and Culture Ministry.

LITERATURE CITED

- Ackman RG, Tocher CS (1968) Marine phytoplankton fatty acids. *J Fish Res Board Can* 25:1603–1620
- Amat F, Hontoria F, Navarro JC, Cohen RG, Rodriguez Gil SG (1994) Aproximación preliminar a la distribución del género *Artemia* (especie *A. persimilis*) en Argentina, provincias de Buenos Aires y La Pampa. In: Hernández A, Hernández CT, Morales JR, Pereira F, Perdomo JM (eds) *Actas del VIII Congreso Latinoamericano de Acuicultura*, Santa Fe de Bogotá, p 73–84
- Amat F, Cohen RG, Hontoria F, Navarro JC (2004) Further evidence and characterization of *Artemia franciscana* Kellogg, 1906 populations in Argentina. *J Biogeogr* 31: 1–15
- Angelelli V, Schalamuk I, Arrospeide A (1976) Los yacimientos no metalíferos y rocas de aplicación de la región Patagonia-Comahue. *Anales XVII. Ministerio de Economía*, Buenos Aires
- APHA (American Public Health Association) (1993) Standard methods for the examination of water and wastewaters. American Public Health Association, Washington, DC
- Bengtson DA, Léger P, Sorgeloos P (1991) Use of *Artemia* as a food source for aquaculture. In: Browne RA, Sorgeloos P, Trotman CAN (eds) *Artemia* biology. CRC Press, Boca Raton, FL, p 255–285
- Chuecas L, Riley JP (1969) Component fatty acids of the total lipids of some marine phytoplankton. *J Mar Biol Assoc UK* 49:97–116
- Cohen RG, Amat F, Hontoria F, Navarro JC (1999) Preliminary characterization of some Argentinean *Artemia* populations from La Pampa and Buenos Aires provinces. *Int J Salt Lake Res* 8:329–340
- Davis S (1990) Biological management for the production of salt from seawater. In: Akatsuka I (ed) *Introduction to applied phycology*. SPB Academic Publishing, The Hague, p 479–488
- Davis S, Giordano M (1996) Biological and physical events involved in the origin, effects, and control of organic matter in solar saltworks. *Int J Salt Lake Res* 4:335–347
- Farkas T (1979) Adaptation of fatty acid compositions to temperature: a study on planktonic crustaceans. *Comp Biochem Physiol B* 64:71–76
- Fraser AJ, Sargent JR, Gamble JC, Seaton DD (1989) Formation and transfer of fatty acids in an enclosed marine food chain comprising phytoplankton, zooplankton and herring (*Clupea harengus* L.) larvae. *Mar Chem* 27:1–18
- Fujita S, Watanabe T, Kitajima C (1980) Nutritional quality of *Artemia salina* from different locations, as a living feed from the viewpoint of essential fatty acids for marine fish. In: Persoone G, Sorgeloos P, Roels O, Jaspers E (eds) *Proc. Int Symp brine shrimp Artemia*. Universa Press, Wetteren, p 277–290
- Jones RH, Flynn KJ (2005) Nutritional status and diet composition affect the value of diatoms as copepod prey. *Science* 307:1457–1459
- Lavens P, Sorgeloos P (2000) The history, present status and prospects of the availability of *Artemia* cysts for aquaculture. *Aquaculture* 181:397–403
- Lavens P, Léger P, Sorgeloos P (1989) Manipulation of the fatty acid profile in *Artemia* offspring produced in intensive culture systems. In: De Paw N, Jaspers E, Acke-

- fors H, Wilkins N (eds) Aquaculture: biotechnology in progress. European Aquaculture Society, Bredene, p 731–739
- Léger P, Bengtson DA, Simpson PM, Sorgeloos P (1986) The use and nutritional value of *Artemia* as a food source. *Oceanogr Mar Biol Annu Rev* 24:521–623
- Lipko P, Papeschi AG, Cohen RG, Amat F (2004) Cytogenetic analysis of four Argentinean populations of *Artemia* (Crustacea Branchiopoda: Anostraca). *Caryologia* 57:283–289
- Navarro JC (1985) Aportaciones al conocimiento del valor nutritivo de nauplios de *Artemia* de diferentes cepas como alimento para larvas de peces y crustáceos. MS thesis, Universidad de Valencia
- Navarro JC, Amat F (1992) Effect of algal diets on the fatty acid composition of brine shrimp *Artemia* sp. cysts. *Aquaculture* 101:223–227
- Navarro JC, Amat F, Sargent JR (1992a) Fatty acid composition of coastal and inland *Artemia* sp. populations from Spain. *Aquaculture* 102:219–230
- Navarro JC, Amat F, Sargent JR (1992b) Lipid composition of cysts of the brine shrimp *Artemia* sp. from Spanish populations. *J Exp Mar Biol Ecol* 155:123–131
- Navarro JC, Amat F, Sargent JR (1993) The lipids of the cysts of freshwater-and marine-type *Artemia*. *Aquaculture* 109:327–336
- Papeschi AG, Cohen RG, Pastorino X, Amat F (2000) Cytogenetic proof that the brine shrimp *Artemia franciscana* (Crustacea, Branchiopoda) is found in Argentina. *Hereditas* 133:159–166
- Poerschmann J, Spijkerman E, Langer U (2004) Fatty acid patterns in *Chlamydomonas* sp as a marker for nutritional regimes and temperature under extremely acidic conditions. *Microb Ecol* 48:78–89
- Pohl P, Zurheide F (1979) Fatty acids and lipids of marine algae and the control of their biosynthesis by environmental factors. In: Hoppe HA, Levring T, Tanaka Y (eds) *Marine algae in pharmaceutical science*. Walter de Gruyter, Berlin, p 473–523
- Pruitt NL (1990) Adaptations to temperature in the cellular membranes of crustacea- membrane structure and metabolism. *J Therm Biol* 15:1–8
- Quirós R, Drago E (1999) The environmental state of Argentinean lakes: an overview. *Lakes Reserv Res Manage* 4:55–64
- Sargent JR, Parkes RJ, Mueller-Harvey I, Henderson RJ (1988) Lipid biomarkers in marine ecology. *Microbes Sea* 5:119–138
- Sargent JR, McEvoy LA, Bell JG (1997) Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. *Aquaculture* 155:117–127
- Sato NE, Mallo JC, Fenuccii JL (2004) Calidad de los quistes de *Artemia persimilis* (Piccinelli & Prosdocimi) (Crustacea: Branchiopoda) de diferentes zonas de Argentina, como alimento en acuicultura. *Rev Biol Mar Oceanogr* 39:79–92
- Savage A, Knott B (1998) *Artemia parthenogenetica* in Lake Hayward, Western Australia. II. Feeding biology in a shallow seasonally stratified, hypersaline lake. *Int J Salt Lake Res* 7:13–24
- Schauer PS, Simpson KL (1985) Bioaccumulation and bioconversion of dietary labelled fatty acids in *Artemia* and winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). *Can J Fish Aquat Sci* 42:1430–1438
- Scott AP, Middelton C (1979) Unicellular algae as a food for turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae. The importance of dietary long-chain polyunsaturated fatty acids. *Aquaculture* 18:227–241
- St John MA, Lund T (1996) Lipid biomarkers: linking the utilization of frontal plankton biomass to enhanced condition of juvenile North Sea cod. *Mar Ecol Prog Ser* 131:75–85
- Van Stappen G (1997) Introduction, biology and ecology of *Artemia*. In: Lavens P, Sorgeloos P (eds) *Manual on the production and use of live food for aquaculture*. FAO Fish Tech Pap No. 361. FAO, Rome, p 79–106
- Van Stappen G, Sui LY, Xin NH, Sorgeloos P (2003) Characterisation of high-altitude *Artemia* populations from the Qinghai-Tibet Plateau, PR China. *Hydrobiologia* 500:179–192
- Vos J, Léger P, Vanhaecke P, Sorgeloos P (1984) Quality evaluation of brine shrimp *Artemia* cysts produced in Asian Salt ponds. *Hydrobiologia* 108:17–23
- Watanabe T (1987) Requerimientos de ácidos grasos y nutrición lipídica en los peces. In: Espinosa de los Monteros J, Labarta U (eds) *Nutrición en acuicultura, plan de formación de técnicos superiores en acuicultura*. Feuga, Madrid, p 99–165
- Watanabe T, Arakawa T, Kitajima C, Fukusho K, Fujita S (1978) Nutritional quality of living feed from the viewpoint of essential fatty acids for fish. *Bull Jpn Soc Sci Fish* 44:1223–1227
- Zheng M (1997) An introduction to saline lakes on the Qinghai-Tibet Plateau. Kluwer, Dordrecht

Editorial responsibility: Robert Feller (Contributing Editor), Columbia, South Carolina, USA

Submitted: March 30, 2006; Accepted: September 12, 2006
Proofs received from author(s): March 29, 2007

A comparative study of the fatty acid profile of *Artemia franciscana* and *A. persimilis* cultured at mesocosm scale

O. Ruiz*, F. Amat, J.C. Navarro

Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (CSIC), 12595 Ribera de Cabanes, Castellón, Spain

Received 22 February 2007; received in revised form 17 September 2007; accepted 18 September 2007

Abstract

The goal of this study was to examine the fatty acid (FA) profile of two *Artemia* species, *A. persimilis* (Argentina) and *A. franciscana* (Great Salt Lake, Utah; USA) in coexistence at mesocosm scale. The experiment was carried out to 1) evaluate putative differences in the fatty acid composition of both species while they share resources and 2) to investigate the causes of such differences. Although the coexistence of these species in nature has not yet been observed, it remains possible that this situation may arise in the future mainly due to the invasive ability of *A. franciscana*. FA analyses were performed on individuals as well as on pooled biomasses of each species, and integrated in multivariate principal components analysis (PCA). Comparison of the relative abundance of FA between the two species revealed that interspecific differences in FA composition are greater than intraspecific variability. Higher percentages of unsaturation were found in the fatty acids of *A. persimilis* compared to *A. franciscana*, demonstrating that aside from a high phenotypic effect of diet on the FA composition of the animals, a species-specific genotypic effect should not be discarded.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Artemia franciscana*; *Artemia persimilis*; Fatty acids; Mesocosm

1. Introduction

The brine shrimp *Artemia* sp. (Branchiopoda, Anostraca) is the most conspicuous inhabitant of hypersaline lakes, lagoons and solar salt ponds both coastal and inland all over the world.

Artemia of all life stages are used in aquaculture as a live prey, where newly hatched nauplii are the most utilized food for crustacean and fish larvae (Léger et al., 1986). The nutritional value of nauplii seems to be determined by their content of n-3 highly unsaturated fatty acids (HUFA) (Watanabe et al., 1980; Léger et al.,

1986; Navarro, 1990). It is known that the fatty acid composition of *Artemia* nauplii can vary among strains and also from one batch to another within the same strain (Léger et al., 1986). This led Watanabe et al. (1978) to classify *Artemia* into two groups: freshwater-type *Artemia*, with n-3 unsaturated fatty acids such as linolenic acid (18:3n-3) but lacking eicosapentaenoic acid (20:5n-3), producing good survival and growth among freshwater animals, and marine-type *Artemia* whose lipids contain 20:5n-3 thereby making them suitable for feeding marine animals.

Little is known about the causes of the variability in the fatty acid profile of adult *Artemia*. Previous studies have focused on the factors affecting the fatty acid profile of cysts and nauplii (Léger et al., 1986; Navarro,

* Corresponding author. Tel.: +34 964319500; fax: +34 964319509.
E-mail address: olga@iats.csic.es (O. Ruiz).

1990; Navarro and Amat 1992; Ruiz et al., 2007). Specifically, variations in the fatty acid composition of *Artemia* cysts and nauplii are determined by differences in the fatty acid composition of the food ingested by the parental population (Vos et al., 1984; Léger et al., 1986; Lavens et al., 1989), the genotype (Navarro and Amat, 1992) or the selective choice of substrate for feeding (Ruiz et al., 2007).

In contrast, factors affecting the fatty acid composition of adult specimens have been scarcely studied. Gozalbo (1990) found that adult *Artemia* biomasses from different species fed in the laboratory with the same algae showed differences in their fatty acid profile. This classical approach is useful to gain an insight into a variety of responses; however, the extrapolation of these insights to field situations is difficult. For this reason, we carried out experimental work under seminatural conditions to approach those found in a natural environment. To the best of our knowledge, no studies have been carried out on the variations of the fatty acid composition in species in competence, i.e., coexisting in the same enclosure at mesocosm scale. Here, we use the term “mesocosm” to distinguish from the controlled traditional development of laboratory bioassays, that is, an experimental system that simulates open air (outdoor) conditions as closely as possible.

Furthermore, our comparative approach allowed us to study factors that condition the fatty acid profile of different populations in their environment. We identify a need to examine the extent in which *Artemia* fatty acid composition varies between species and how much of this variance is due to intraspecific variation. Interestingly, intraspecific variation of fatty acid content in zooplankton is considered a key variable in stoichiometric models (Anderson and Pond, 2000).

In addition to the trophic simulation of the mesocosm system, coexistence of different *Artemia* species would mimic natural conditions found in the wild. In the New World, the genus *Artemia* is represented by two endemic bisexual species: *A. persimilis* (Picinelli and Prosdocimi, 1968) (Argentina and Chile) and *A. franciscana* (Kellogg 1906) (North, Central and South America). North American brine shrimp cysts of *A. franciscana* (San Francisco Bay and Great Salt Lake, USA) have been commercially exported worldwide since the 1950s for use in aquarium trade and fish farming. Aquaculture is expanding around the world leading to the release of *A. franciscana* into native *Artemia* populations. In Argentina, *A. franciscana* populations are biogeographically constrained to north of 36°S while *A. persimilis* populations have been found south of 37°10'S. Cooccurrence of autochthonous and American brine shrimp

A. franciscana populations was observed in some Mediterranean solar salterns and salt lakes (Amat et al., 2005), however there is no current evidence of coexistence of *A. persimilis* and *A. franciscana* in their original Argentinean biotopes. The invasive ability of *A. franciscana* and the intentional or nonintentional inoculations through aquacultural or pet market activities might cause a rapid replacement of the Argentinean *A. persimilis* populations by the American brine shrimp. In the present study we will attempt to reflect on a potential scenario likely to occur in the wild in the near future.

Here, we report on the differences in the fatty acid composition of biomasses and individuals of *A. persimilis* and *A. franciscana* grown and cooccurring in identical environmental conditions at mesocosm scale.

2. Materials and methods

2.1. Culture conditions

A mesocosm-scale experiment was carried out from January–June 2005. The populations used were obtained from original cysts collected in the Algarrobo salterns (2003), located in the south of the Argentinean province of Buenos Aires (40°36' S; 62° 56' W) and from Great Salt Lake (Utah, USA) (40° 45' N; 111° 53' W).

Prior to inoculation, *A. persimilis* and *A. franciscana* specimens were grown in the laboratory. Original cysts were hatched in seawater at 28 °C under continuous aeration and illumination. After 24 h the newly hatched nauplii were harvested and then cultured into 150 L cylindro-conical tanks filled with filtered (1 µm), UV-sterilized sea water (35 g L⁻¹), and aerated from the bottom. Animals were progressively fed *ad libitum* with a mixture of algal species: *Dunaliella tertiolecta*/*Tetraselmis suecica* (1:1, v/v), mass cultured in the Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (IATS). Salinity was progressively raised to 70 g L⁻¹ for a week, and temperature kept at 24 °C until the population reached adulthood. Specimens were then transferred to a 4000 L cylindrical tank and fed periodically with *D. tertiolecta*.

Culture media for the algal mass culture were prepared with filtered and sterilized seawater (35 g L⁻¹) and brine (100 g L⁻¹) for *T. suecica* and *D. tertiolecta*, respectively, and fertilized according to Guillard and Ryther (1962). Algae were initially grown in 500 ml Erlenmeyer flasks at 20 °C and 12:12 h light: dark photoperiod without aeration. Cultures were then scaled up in a 4000 L outdoor raceway system in order to maintain a continuous food supplementation for the *Artemia* mesocosm culture.

The culture was maintained with both populations coexisting in competence until the end of June. During

the experiment, temperature varied between 4–25 °C and salinity between 65–95‰.

2.2. Biomass sampling and analysis

At the end of the experiment (June 26th 2005), three replicates of *Artemia* biomass were collected by filtering 1 L of the mesocosm brine through a 1 mm mesh. Adult *Artemia* samples were selected from the triplicate samples as biomasses (BP, *A. persimilis* and BF, *A. franciscana*) as well as up to ten separate individuals from each species (Pn=P1 to P10 for *A. persimilis* and Fn=F1 to F10 for *A. franciscana*). Species identification was based on *de visu* morphometry according to Cohen et al. (2000) and further confirmed by biometrical analysis following the multivariate discriminant analysis methodology described by Hontoria and Amat (1992), and the results integrated in the morphological data base developed at the IATS (Amat et al., 1995).

Samples were freeze-dried and stored at –80 °C until further analysis. Fatty acid analyses from total lipid extracts (Folch et al., 1957) were carried out as described in Ruiz et al. (2007). The P1 sample was lost during the lipid analysis process, so Pn samples were 9 for *A. persimilis* while Fn samples were 10 for *A. franciscana*.

2.3. Statistical analyses

The percentages of the main fatty acids from the total lipid of *Artemia* sp. biomasses and individuals (palmitic [16:0], *cis*-7-hexadecenoic [16:1n-9], palmitoleic [16:1n-7], stearic [18:0], oleic [18:1n-9], *cis*-vaccenic [18:1n-7], linoleic [18:2n-6], linolenic [18:3n-3], arachidonic [20:4n-6] and eicosapentaenoic [20:5n-3]) were included as variables in a principal components analysis (PCA) model using the SPSS program Version 12.0 (SPSS Inc., Chicago, USA). Prior to performing PCA, the suitability of data for factor analysis was assessed by the Kaiser–Meyer–Oklin method (KMO) (Kaiser, 1970, 1974) and the Bartlett's test of sphericity (Bartlett, 1954).

In a chemometric PCA model a data set from a group of interrelated variables is reduced into a smaller set of factors (components). Parsimony is achieved by explaining the maximum amount of common variance in a correlation matrix using the smallest number of explanatory concepts. Factors are statistical entities that can be visualised as classification axes along which measurement variables can be plotted. The coordinate of a variable along a classification axis is known as a factor loading. The communalities indicate how much of the variance of a variable is explained by the common factors.

Factor scores were subsequently analyzed by one way ANOVA and Tukey's HSD multiple comparison tests.

3. Results

Table 1 lists the main fatty acids found in *A. persimilis* and *A. franciscana* individuals (P and F) and biomasses (BP and BF), together with the coefficients of variation (CV). Our results show that the CV of the mean fatty acids found in isolated individuals were higher than those analyzed in biomasses for all the fatty acids examined. Individual samples showed CV between 9 and 46%, whereas analysis of biomasses were less variable showing CV in the range of 0.4 to 24%.

We obtained a Kaiser–Meyer–Oklin (KMO) value of 0.69, which exceeded the recommended value of 0.6, and the Bartlett's test of sphericity reached statistical significance ($P=0.000$), supporting the factorability of the correlation matrix. PCA revealed three components with eigenvalues exceeding 1, which explained 52.8, 19.3 and 13.1% of the variance. An inspection of the screeplot revealed a clear break after the second component. Using Cattell's (1966) scree test, it was decided to retain two components explaining 72% of the total variance, for further analyses.

Table 1
Main fatty acids (% from total FA) from the total lipids of *A. persimilis* and *A. franciscana* individuals (P and F) and biomasses (BP and BF)

Fatty acid	Individuals				Biomasses			
	Mean P	CV	Mean F	CV	Mean BP	CV	Mean BF	CV
16:0	11.37	9.25	13.46	20.22	11.62	3.32	14.02	3.18
16:1n-9	1.35	26.71	1.34	26.83	1.11	24.02	0.86	2.41
16:1n-7	6.61	46.31	7.38	41.04	6.30	13.34	8.75	2.29
18:0	8.72	22.61	5.48	24.26	9.20	0.39	5.16	6.70
18:1n-9	24.64	11.16	23.42	13.14	25.46	3.44	23.44	2.23
18:1n-7	12.90	15.71	10.58	22.56	12.98	5.15	10.08	2.92
18:2n-6	3.43	26.96	5.23	14.27	3.37	2.88	5.04	0.72
18:3n-3	10.01	20.53	14.41	24.45	9.17	5.92	13.16	6.25
20:4n-6	2.42	32.34	1.54	29.17	2.66	6.26	1.26	7.35
20:5n-3	7.70	30.57	5.91	13.73	9.09	4.02	5.24	4.58
PUFA	25.71	16.76	31.58	11.67	26.42	0.76	28.95	4.58
n-3	18.96	16.74	23.16	17.31	19.72	1.16	21.54	4.07
n-6	5.92	18.81	6.98	13.05	6.11	2.57	6.52	1.25
HUFAn-3	7.82	28.12	6.27	12.45	9.22	4.90	5.72	3.88
HUFAn-6	2.49	31.30	1.63	26.89	2.72	7.91	1.32	9.06

P and F are the mean of 9 and 10 replicates, respectively.

BP and BF are the mean of 3 replicates. CVs are the coefficients of variation.

PUFA: polyunsaturated fatty acids; HUFA n-3: PUFAs n-3 equal or longer than C₂₀; HUFA n-6: PUFAs n-6 equal or longer than C₂₀.

Table 2
Loadings of fatty acids on the first and second components

Fatty acid	PC1	PC2	Communality
16:0	-0.49	-0.19	0.28
16:1n-9	-0.19	0.80	0.68
16:1n-7	-0.57	-0.71	0.82
18:0	0.95	-0.03	0.90
18:1n-9	0.56	0.34	0.42
18:1n-7	0.85	-0.40	0.87
18:2n-6	-0.72	0.13	0.54
18:3n-3	-0.73	0.61	0.90
20:4n-6	0.96	0.15	0.95
20:5n-3	0.89	0.26	0.85
Variance explained (%)	52.83	19.25	–

Table 2 shows the loadings of the fatty acids on the first and second components as well as the communalities. Arachidonic acid (20:4n-6), 18:3n-3, 18:0, 18:1n-7 and 20:5n-3 explain most of the variance, being the most informative variables in the 2-dimensional representation.

Fig. 1 illustrates the factor loading plot for the fatty acid data. Variables correlate highly with factor 1 (horizontal axis) and have low correlation with factor 2 (vertical axis). Positive loadings of fatty acids on the principal component 1 are represented by 20:4n-6, 18:0, 20:5n-3 and 18:1n-7, whereas 18:3n-3, 18:2n-6 and 16:1n-7 show negative loadings.

Fig. 2 shows the factor scores plot, based on the population scores from the constituent variables. The two species were well separated, with *A. franciscana* to the left and *A. persimilis* to the right, whether they were

obtained from individual (F, P) or biomass (BF, BP) sampling. These results indicate that *A. persimilis* has higher proportions of 20:4n-6, 18:0, 20:5n-3, 18:1n-7 and 18:1n-9 than *A. franciscana*, whose lipids show higher percentages of 18:3n-3, 18:2n-6, 16:1n-7, 16:0 and 16:1n-9. The factor scores tested by ANOVA yielded significant differences between the *A. franciscana* and *A. persimilis* groups in the first component ($F=9.52$, $P<0.001$), while no differences in the second component were found ($F=0.65$, $P>0.001$).

The analysis of the fatty acid profiles from both biomasses and/or individuals showed similar patterns. It is noteworthy to mention that F10 and P5 clustered together with the contrary species thereby indicating their outlier property.

4. Discussion

The mesocosm-scale approach allowed us to examine the fatty acid composition of coexisting adult *A. persimilis* and *A. franciscana* populations in an environmental framework simulating natural conditions. In addition, we were able to monitor the experimental conditions, which usually is not possible to follow up in the field due to the existence of uncontrolled factors. Through coexistence, both species shared resources (i.e. food) and were subjected to similar environmental parameters thereby reducing much of the variability between treatments/species. Even then, *A. persimilis* and *A. franciscana* showed differences in their fatty acid percentages, a result that we were not

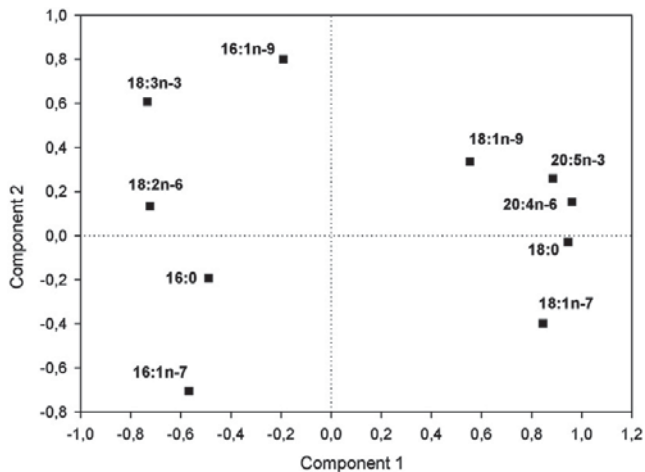


Fig. 1. Factor loadings plot for the fatty acid data.

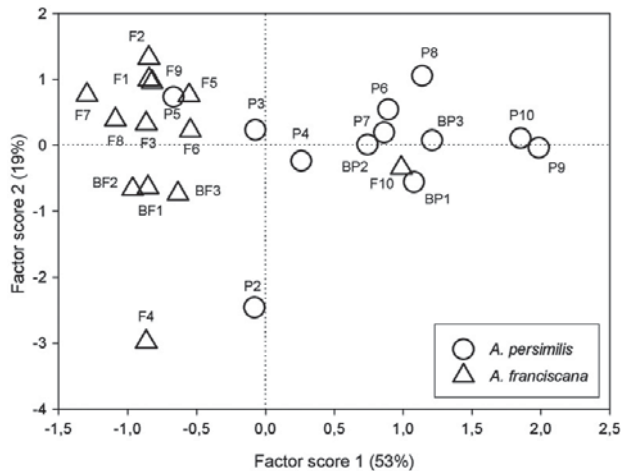


Fig. 2. Plot of sample scores on principal components 1 (horizontal) and 2 (vertical).

expecting. By examining the fatty acid profile of individuals, intraspecific variability was unveiled. In general, this variability is not taken into account in the available literature, where sampling is carried out in biomasses of pooled individuals (Mura et al., 1997, 1998; Cripps and Hill, 1998). Our experimental approach demonstrated that the fatty acid differences found between *A. persimilis* and *A. franciscana* was associated with a clear interspecific variability, whereas the intraspecific variability was lower (Fig. 2).

Variations in the fatty acid profile have been found in other anostracan species (Mura et al., 1997), and previous studies showed differences in the amounts of 20:5n-3 and 22:6n-3 between zooplankton taxa like *Daphnia* spp. and various copepod species in freshwater habitats (Farkas, 1970). Additionally, species-specific differences have been reported in copepods (Hagen et al., 1993; Kattner et al., 1994). In *Artemia*, Gozalbo (1990) found differences in the fatty acid composition between monocultures of parthenogenetic and bisexual populations cultured at mesocosm scale, but over-looked the causes of such variability.

Several authors reported that the fatty acid composition of *Artemia* and other zooplankton is conditioned by the different components found in their diet (Schauer et al., 1980; Léger et al., 1986; Navarro and Amat 1992; Mura et al., 1997, 1998; Dalsgaard et al., 2003) and, therefore, fatty acids have been proposed to be useful trophic biomarkers that reveal the type of food ingested (Sargent et al., 1988; Napolitano, 1999; Dalsgaard et al., 2003).

Although food was continuously supplied, the experimental conditions (i.e. the length of the experimental period, the tank exposure to open air as well as the volume and surface of the tank) did not preclude the possibility of other species of phytoplankton appearing in the tank, particularly benthonic diatom-like species (Ruiz et al., unpublished). Savage and Knott (1998) reported that a very large part of the gut content of *Artemia* from an Australian lake, derived from sources not available to filter feeding animals, but from substrate grazing. These authors recommended further work to examine the cues that induce the switch from filter feeding to a deliberate and distinctive substrate grazing in *Artemia*. In the present experiment, the existence of a different species-dependent grazing behaviour on different food sources in the water column and on the benthos could be associated with the variability and differences detected in the fatty acid profile of both species. When taking into account that the system could display some sort of thermal stratification (at least diurnal) during the experiment, *Artemia* populations would steer to the most suitable temperature according to their thermopreferendum. Recent results from Medina et al. (2007) state that *A. persimilis* populations are likely better adapted to lower temperatures than *A. franciscana*. The different tolerances to temperature ranges could partly explain the distribution of both American brine shrimp species in Argentina where *A. persimilis* appears constrained to lower temperatures at the south of the country. Then, *A. persimilis* preferentially would occupy the cooler bottom regions of the

containers, grazing on HUFA-rich diatom-like patches of microalgae while *A. franciscana* would remain in the water column filter feeding on the different cell types present. However, our results (derived from the study of the fatty acid as biomarkers) seem to contradict the latter hypothesis. Firstly, grazing on diatoms patches would be reflected in the fatty composition of *A. persimilis* by enhanced proportions of 20:5n-3, which is a definite diatom fatty acid marker (Volkman et al., 1998). Palmitoleic acid (16:1n-7), another typical diatom marker, was not found in higher quantities in *A. persimilis* population as expected. Secondly, if *A. franciscana* was feeding on the water column there would be a much higher proportion of C₁₈ polyunsaturated fatty acids (PUFAs), as observed in controlled laboratory conditions (unpublished results), since the main algae present in the water column of the mesocosm enclosure was *Dunaliella* sp. (Chlorophyta), which is characterized by C₁₈ PUFA markers such as 18:2n-6 and 18:3n-3 (Volkman et al., 1998).

Thus, these variations in the fatty acid profiles of adult *Artemia* (and other zooplankton), although mainly influenced by feeding, should be interpreted carefully against a background of ontogenetic and metabolic changes that can occur in the animals (Ito and Simpson 1996; Zhukova et al., 1998; Navarro et al., 1999a; Vismara et al., 2003). A key aspect of fatty acid dynamics in *Artemia* and other zooplankton is whether they modify dietary fatty acids, and if so, to what extent these modifications take place. In fact, once we set aside the main phenotypic influence of food, our data still supports differences in the genetic species-specific capacities of PUFA biosynthesis. This is evident not only by the fact that *A. persimilis* still retains part of its “marine-type” character (Watanabe et al., 1978) with its lower 18:3n-3 and higher 20:5n-3 percentages (Table 1; Figs. 1, 2), but also in that the fatty acid profile of both species is different even at the individual level (Fig. 2).

It is evident that endogenous modifications of dietary fatty acids can take place in branchiopods (Kayama et al., 1963; Navarro et al., 1999b). The higher content of 20:4n-6 fatty acid in *A. persimilis* together with the lower 18:2n-6 proportion, compared to *A. franciscana*, suggests a higher bioconversion capacity from 18:2n-6 to 20:4n-6 in *A. persimilis*. Although lipid metabolism in *Artemia* is poorly known, this metabolic pathway has been reported in *A. salina* nauplii (Zhukova et al., 1998), and the bioconversion capacity of *Artemia* to elongate and desaturate 18:3n-3 to 20:5n-3 was confirmed by Schauer and Simpson (1985). Hence, the present data suggests that a higher bioconversion rate from 18:3n-3 to 20:5n-3 in *A. persimilis* than in *A. franciscana* exists under this “mesocosm” conditions.

The American brine shrimp *A. franciscana* has been considered as an expanding invasive species (Amat et al., 2005) that has already reached the Old World. Today, it is present in several Western Mediterranean localities where it becomes competitively dominant and displaces the autochthonous populations. However, there is no information available on the hypothetical southwards displacement of *A. persimilis* by the invasive *A. franciscana* in Argentina.

Most invasive aquatic species are characterized by adaptations to the new environment, leading to rapid population growth supported by high fecundities (Browne, 1980; Browne and Halanych, 1989; Browne and Wanigasekera, 2000; Amat et al., 2005). The usefulness of lipid as an index of potential reproductive capacity was confirmed by Holm and Shapiro (1984) in freshwater cladoceran populations. However, the studies of the variation in the fatty acid profiles have only focused on the nutritional condition of the animals, while their relationship with the population’s reproductive performance is still unknown and requires further investigation.

The present data provides important insights in fatty acid variation of adult *Artemia* species coexisting in the same environment. Although there is an important phenotypic influence of the diet in the fatty acid composition of *Artemia*, different species behave biochemically differently when cultured at mesocosm scale. It is known that temperature plays an important role in the fatty acid metabolism of poikilotherm animals and can influence some physiological mechanisms related to lipid composition and fatty acid profiles, which in turn could explain the higher percentages of unsaturation in the fatty acids seen in *A. persimilis* in comparison with *A. franciscana*. The different genetic background of both *Artemia* species coexisting in habitats of similar nature could determine the different responses in the metabolic processes that determine the final fatty acid profiles. Further work is necessary to evaluate to what extent biochemical responses of brine shrimp species are the result of phenotypic plasticity and/or are determined by a genetic background.

Acknowledgments

This work was supported in part by the Spanish Ministry of Science and Technology project AGL2001-1968 and the EU project ICA4-CT-2001-10020 (INCO). We would like to thank O. Monroig for helpful comments on the manuscript and M. Bagheri for editing the English. Olga Ruiz is a Predoctoral fellow of the Spanish Education and Science Ministry. [SS]

References

- Amat, F., Barata, C., Hontoria, J.C., Navarro, J.C., Varó, I., 1995. Biogeography of the genus *Artemia* (Crustacea, Branchiopoda, Anostraca) in Spain. *Int. J. Salt Lake Res.* 3, 175–190.
- Amat, F., Hontoria, F., Ruiz, O., Green, A.J., Sánchez, M.I., Figueroa, J., Hortas, F., 2005. The American brine shrimp as an exotic invasive species in the western Mediterranean. *Biol. Invasions* 7, 37–47.
- Anderson, T.R., Pond, D.W., 2000. Stoichiometric theory extended to micronutrients: comparison of the roles of essential fatty acids, carbon and nitrogen in the nutrition of marine copepods. *Limnol. Oceanogr.* 45, 1162–1167.
- Bartlett, M.S., 1954. A note on multiplying factors for various chi-squared approximations. *J. R. Stat. Soc. Series B* 16, 296–298.
- Browne, R.A., 1980. Competition experiments between parthenogenetic and sexual strains of the brine shrimp, *Artemia salina*. *Ecology* 61 (3), 471–474.
- Browne, R.A., Halanynch, K.M., 1989. Competition between sexual and parthenogenetic *Artemia*: a reevaluation. *Crustaceana* 57 (1), 57–71.
- Browne, R.A., Wanigasekera, G., 2000. Combined effects of salinity and temperature on survival and reproduction of five species of *Artemia*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 244, 29–44.
- Cattell, R.B., 1966. The scree test for the number of factors. *Multivar. Behav. Res.* 1, 245–276.
- Cohen, R.G., Amat, F., Hontoria, F., Navarro, J.C., 2000. Preliminary characterization of some Argentinean *Artemia* populations from La Pampa and Buenos Aires provinces. *Int. J. Salt Lake Res.* 8, 329–340.
- Cripps, G.C., Hill, H.J., 1998. Changes in lipid composition of copepods and *Euphausia superba* associated with diet and environmental conditions in the marginal ice zone, Bellingshausen Sea, Antarctica. *Deep-sea Res.* 45, 1357–1381.
- Dalsgaard, J., St John, M., Kattner, G., Muller-Navarra, D., Hagen, W., 2003. Fatty acid trophic markers in the pelagic marine environment. *Adv. Mar. Biol.* 46, 225–340.
- Folch, J., Lees, N., Sloane-Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509.
- Farkas, T., 1970. Fats in freshwater crustaceans. *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.* 21 (2), 225–233.
- Gozalbo, G., 1990. Principios nutritivos inmediatos en biomazas silvestres y cultivadas de *Artemia*. MS Thesis. Universidad de Valencia, Spain. 269 pp.
- Guillard, R.R.L., Ryther, J.H., 1962. Studies on marine planktonic diatoms I. *Cyclotella nana* Husde and *Detonula confervacea* Cleve. *Can. J. Microbiol.* 8, 229–239.
- Hagen, W., Kattner, G., Graeve, M., 1993. *Calanoides acutus* and *Calanus propinquus*, Antarctic copepods with different lipid storage modes via wax esters or triacylglycerols. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 97, 135–142.
- Holm, N.P., Shapiro, J., 1984. An examination of lipid reserves and the nutritional status of *Daphnia pulex* fed *Aphanizomenon flos-aquae*. *Limnol. Oceanogr.* 29, 1137–1140.
- Hontoria, F., Amat, F., 1992. Morphological characterization of adult *Artemia* (Crustacea, Branchiopoda) from different geographical origin: American populations. *J. Plank. Res.* 14 (10), 1461–1471.
- Ito, M.K., Simpson, K.L., 1996. The biosynthesis of w3 fatty acids from 18:2w6 in *Artemia* sp. *Comp. Biochem. Physiol.* 115 B, 69–76.
- Kaiser, H.F., 1970. A second generation little jiffy. *Psychometrika* 35, 401–415.
- Kaiser, H.F., 1974. An index of factorial simplicity. *Psychometrika* 39, 31–36.
- Kattner, G., Graeve, M., Hagen, W., 1994. Ontogenic and seasonal changes in lipid and fatty acid/alcohol compositions of the dominant Antarctic copepods *Calanus propinquus*, *Calanoides acutus* and *Rhincalanus gigas*. *Mar. Biol.* 118, 637–644.
- Kayama, M., Tsuchiya, Y., Mead, J.F., 1963. A model experiment of aquatic food chain with special significance in fatty acid conversion. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 29, 452–458.
- Kellogg, V.A., 1906. A new *Artemia* and its life conditions. *Science* 24, 594–596.
- Lavens, P., Léger, P., Sorgeloos, P., 1989. Manipulation of the fatty acid profile in *Artemia* offspring produced in intensive culture systems. In: De Paw, N., Jaspers, E., Acekfor, H., Wilkins, N. (Eds.), *Aquaculture: A Biotechnology in Progress*. European Aquaculture Society, Bredene (Belgium), pp. 731–739.
- Léger, P., Bengtson, D.A., Simpson, P.M., Sorgeloos, P., 1986. The use and nutritional value of *Artemia* as a food source. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 24, 521–623.
- Medina, G.R., Goenaga, J., Hontoria, F., Cohen, G., Amat, F., 2007. Combined effects of temperature and salinity on reproductive traits of two populations of *Artemia* (Crustacea, Branchiopoda) of Argentina. *Hydrobiologia* 579, 41–53.
- Mura, G., Ferrara, F., Fabietti, F., Delise, M., Bocca, A., 1997. Biochemical (fatty acid profile) diversity in anostracan species of the genus *Chirocephalus*. *Hydrobiologia* 359, 237–241.
- Mura, G., Ferrara, F., Fabietti, F., Delise, M., Bocca, A., 1998. Intraspecific variation of fatty acid profile in wild populations of *Chirocephalus diaphanus* (Anostraca). *Crustaceana* 71, 785–800.
- Napolitano, G.E., 1999. Fatty acids as trophic and chemical markers in freshwater ecosystems. In: Arts, M.T., Wainman, B.C. (Eds.), *Lipids in freshwater ecosystems*. Springer, New York, pp. 21–44.
- Navarro, J.C., 1990. Caracterización de las cepas españolas de *Artemia* desde el punto de vista de su valor nutritivo y de sus fenotipos electroforéticos. Implicaciones prácticas en Acuicultura. MS Thesis. Universidad de Valencia, Spain. 350 pp.
- Navarro, J.C., Amat, F., 1992. Effect of algal diets on the fatty acid composition of brine shrimp, *Artemia* sp. cysts. *Aquaculture* 101, 223–227.
- Navarro, J.C., Amat, F., Sargent, J.R., 1999a. A study of the variations in lipid-levels, lipid class composition and fatty-acid composition in the 1st stages of *Artemia* sp. *Mar. Biol.* 111, 461–465.
- Navarro, J.C., Henderson, R.J., McEvoy, L.A., Bell, M.V., 1999b. Lipid conversions during enrichment of *Artemia*. *Aquaculture* 174, 155–166.
- Picinelli, M., Prosdoci, T., 1968. Descrizione taxonomica delle due specie *Artemia salina* L. e *Artemia persimilis* sp. *Rendiconti dell' Istituto Lombardo di Scienze e Lettere B*, vol. 102, pp. 113–118.
- Ruiz, O., Medina, G.R., Cohen, G., Amat, F., Navarro, J.C., 2007. Diversity of the fatty acid composition of *Artemia* sp. cysts from Argentinean populations. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 335, 155–165.
- Sargent, J.R., Parkes, R.J., Mueller-Harvey, I., Henderson, R.J., 1988. Lipid biomarkers in marine ecology. *Microbes in the Sea* 5, 119–138.
- Savage, A., Knott, B., 1998. *Artemia parthenogenetica* in Lake Hayward, Western Australia II. Feeding biology in a shallow seasonally stratified, hypersaline lake. *Int. J. Salt Lake Res.* 7, 13–24.
- Schauer, P.S., Simpson, K.L., 1985. Bioaccumulation and bioconversion of dietary labelled fatty acids in *Artemia* and winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 42, 1430–1438.
- Schauer, P.S., Johns, D.M., Olney, C.E., Simpson, K.L., 1980. Lipid level, energy content and fatty acid composition of the cysts and newly hatched nauplii from five geographical strains of *Artemia*. In: Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O., Jaspers, E. (Eds.), *Proc.*

- International Symposium on The Brine Shrimp *Artemia*, 1. Universa Press, Wetteren (Belgium), pp. 365–374.
- Vismara, R., Vestri, S., Barsanti, L., Gualtieri, P., 2003. Diet-induced variations in fatty acid content and composition of two on-grown stages of *Artemia salina*. *J. Appl. Phycol.* 15, 477–483.
- Volkman, J.K., Barrett, S.M., Blackburn, S.I., Mansour, M.P., Sikes, E.L., Gelin, F., 1998. Microalgal biomarkers: a review of recent research developments. *Org. Geochem.* 29, 1163–1179.
- Vos, J., Léger, P., Vanhaecke, P., Sorgeloos, P., 1984. Quality evaluation of brine shrimp *Artemia* cysts produced in Asian Salt ponds. *Hydrobiologia* 108, 17–23.
- Watanabe, T., Arakawa, T., Kitajima, C., Fukusho, K., Fujita, S., 1978. Nutritional quality of living feed from the viewpoint of essential fatty acids for fish. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 44, 1223–1227.
- Watanabe, T., Oowa, F., Kitajima, C., Fujita, S., 1980. Relationship between dietary value of brine shrimp *Artemia salina* and their content of w3 highly unsaturated fatty acids. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 46, 35–41.
- Zhukova, N.V., Imbs, A.B., Yi, L.F., 1998. Diet-induced changes in lipid and fatty acid composition of *Artemia salina*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 120, 499–506.



Title:

Genetic characterization of Argentinean *Artemia* species with different fatty acid profiles

Authors:

Olga Ruiz ^{1,*}, Francisco Amat ¹, Carlos Saavedra¹, Alba Papeschi ², Rosa G. Cohen², Athanasios D. Baxevanis ³, Ilias Kappas ³, Theodore J. Abatzopoulos ³ and Juan C. Navarro ¹

Affiliations:

¹ Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (CSIC), 12595 Ribera de Cabanes, Castellón, Spain

² Departamento de Biodiversidad y Biología experimental, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 1428 Buenos Aires, Argentina

³ Department of Genetics, Development and Molecular Biology, Aristotle University of Thessaloniki, 541 24 Thessaloniki, Greece

Correspondence address:

Olga Ruiz

Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (CSIC), 12595 Ribera de Cabanes, Castellón, Spain. E-mail: olga@iats.csic.es. Tel.: +34 964319500, Fax: +34 964319509

Abstract

The Anostracan genus *Artemia* is composed by several sibling species reproductively isolated but identical or very similar in outward appearance. The genus shows also an underlying striking variability from the biochemical point of view, regarding especially the fatty acid profile of the cysts and nauplii. In Argentina *Artemia* is represented by two bisexual species: *A. franciscana* and *A. persimilis*. Former studies have shown that *A. franciscana* is present northern of 36° and that *A. persimilis* is constrained southwards of 37° S. In general, there is good agreement between morphological and cytogenetic comparisons of Argentinean populations with respect to species discrimination. However, new Argentinean *Artemia* populations are being analyzed morphologically and it becomes necessary to further investigate if the genetic adscription of these populations is congruent with the results obtained from the current morphological analyses. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of a fragment of the 16S rRNA mitochondrial gene was used to investigate the genetic diversity and population structure of 10 new *Artemia* populations from Argentina. The mitochondrial DNA (mtDNA) results showed a similar pattern to that of previous cytogenetic and morphological analyses with the two Argentinean species appearing as highly divergent. The presence of *A. persimilis* in southern Argentina and the southernmost Chilean population was confirmed unveiling a novel picture of species distribution in the country. *Artemia franciscana* showed a unique haplotype. Populations of *A. persimilis* appeared highly structured, although their clustering did not follow a clear geographic pattern. The different Argentinean *Artemia* populations analysed were characterised by high variability in their fatty acids, showing both marine- and freshwater-type profiles. For the first time,

the investigation of the relatedness between the fatty acid composition in *Artemia* and genetic markers was attempted. The study aimed at the putative association of molecular markers with marine- vs freshwater-type populations. A lack of correlation between RFLP patterns at mtDNA and the fatty acid (FA) profiles was found in the *A. persimilis* populations which was discussed from the point of view of two main genetic hypotheses and/or phenotypic plasticity.

Keywords: *Artemia*; genetic diversity; molecular markers; polyunsaturated fatty acids

Introduction

The brine shrimp *Artemia* (Branchiopoda, Anostraca) is widely distributed in salterns and hypersaline water bodies all over the world, except Antarctica (Triantaphyllidis et al., 1998; Van Stappen, 2002). In the New World, the genus is represented by two bisexual species; *A. franciscana*, present in North, Central and South America, and *A. persimilis*, which to date has been found in some hypersaline biotopes in Argentina (Amat et al., 1994; Cohen et al., 1999; Amat et al., 2004) and in southern Chile (Gajardo et al., 1999, 2004).

Several studies have dealt with the characterization of Argentinean *Artemia* populations, although a definite picture for this part of the world is still far from complete. Amat et al. (1994) presented a preliminary account of the distribution of the genus *Artemia* in Argentina. Later, Cohen et al. (1999) provided evidence through morphological analyses and cross-breeding tests that Argentinean populations from Salinas Grandes de Hidalgo, Laguna Callaqueo, Laguna Colorada Chica and Salinas Chicas belong to *A.*

persimilis. Moreover, there is evidence that brine shrimp populations from Mar Chiquita and Las Tunas belong cytogenetically to *A. franciscana* (Papeschi et al., 2000). This was further corroborated through morphometric and reproductive studies by Amat et al. (2004). These authors suggested the likely exclusive presence of *A. persimilis* southwards of 37° S and the possible existence of an occasional hybridization between *A. franciscana* and *A. persimilis* populations in Las Tunas lagoon. Generally, the differentiation between *A. franciscana* and *A. persimilis* as gauged by allozyme and cytogenetic studies (Abreu-Grobois, 1987; Badaracco et al., 1987; Baratelli & Barigozzi, 1990; Colihueque & Gajardo, 1996; Gajardo et al., 1998; Rodríguez Gil et al., 1998) is congruent with the findings obtained by multivariate discriminant analysis of morphometric characters (Hontoria & Amat, 1992; Cohen et al., 1999).

New Argentinean *Artemia* populations are being analyzed morphologically and through cross-breeding tests, and results are corroborating the presence of *A. persimilis* in southern Argentina. It is therefore critical to investigate if the conclusions drawn from the previous studies match with results obtained from molecular DNA analyses. This will allow a more detailed evaluation of patterns of morphological and genetic differentiation with the aim of species identification and subsequent determination of distribution areas in Argentina.

Together with the progressive aquaculture development worldwide, *Artemia* has become the most frequently used organism as live food for culturing fish and crustacean larvae (Lavens & Sorgeloos, 2000). The nutritional value of nauplii seems to be determined by their content of n-3 highly unsaturated fatty acids (ω 3-

HUFA) (Watanabe et al., 1980; Léger et al., 1986; Navarro, 1990). This led Watanabe et al. (1980) to classify different *Artemia* populations according to their fatty acid (FA) profile and suitability for feeding marine or freshwater organisms, in two broad groups (phenotypes). The so-called marine-types are characterized by a high percentage of eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3) and a low percentage of linolenic acid (LNA, 18:3n-3). The freshwater-types show low levels of EPA and high levels of LNA. Traditionally, although with a lack of sound scientific evidence, marine-type profiles have been associated to the marine-type nature of primary productivity in coastal ecosystems (Vos et al., 1984). However, marine-type profiles have also been reported in inland biotopes (Navarro et al., 1993, Van Stapen et al., 2003). To complete the picture, recently, in the most complete survey carried out on *A. persimilis*, Ruiz et al. (2007) have reported for the first time freshwater-type FA profiles in coastal Argentinean ecosystems. Hypotheses for the factors that could determine these and other patterns were provided in that study, including the existence of an underlying genetic component.

The aim of the present work was two-fold. First, to present genetic data on *A. persimilis* and *A. franciscana* populations from Argentina and one (southernmost) *A. persimilis* population from Chile. Second, to infer the genetic structure of *A. persimilis* populations in order to discern whether RFLP markers correlate with the patterns of biochemical (fatty acid) data (marine vs freshwater-type). The investigation was based on the 16S rRNA gene of the mitochondrial (mt) DNA and the method of RFLP genotyping that has proven reliable for fast and easy identification of species and populations of *Artemia* (Baxevanis & Abatzopoulos, 2004; Baxevanis

et al., 2005, 2006; Gajardo et al., 2004) and for studies of genetic population structure (Palumbi, 1996)

Materials and Methods

Study locations and sample collection

Between 1992 and 2003 Argentina was explored from north to south in search of hypersaline biotopes hosting brine shrimp populations. In addition, Los Cisnes (CIS) lagoon from southern Chile was sampled and incorporated in the present study. The population from Los Cisnes lagoon is the southernmost *Artemia* population ever sampled.

The biotopes and populations included in the study are summarized in Table 1. In total, 12 populations were investigated including reference samples of *A. franciscana* (San Francisco Bay, SFB) and *A. persimilis* (Buenos Aires, BAI) (Gajardo et al., 2004). Note that all combinations of coastal/inland and marine/freshwater FA profiles in *A. persimilis* were available for the study.

Stock culture conditions

Cysts were hatched in sea water at 28°C under continuous aeration and illumination (hatching percentage > 80%). After 24 h, newly hatched nauplii were transferred to 4 l plastic containers.

The animals were fed *ad libitum* (density 5 - 8 x 10⁵ cells ml⁻¹) with a mixture (1:1, v/v) of two algal strains, *Dunaliella salina* and *Tetraselmis suecica*, under mild aeration at a 12D:12L photoperiod. The salinity was maintained at 70‰ and the temperature at 24 ± 1°C.

The medium was monitored for food and renewed every two days. With the onset of sexual maturity (survival > 90%), evidenced by the ovisac development in females and antenna in males, adult specimens (similar ratio of females and males) were collected from the mass cultures and preserved in absolute ethanol (Merck).

Mitochondrial DNA analysis

Total DNA was extracted from 18-20 individuals from each population using the Chelex protocol described in Estoup et al. (Estoup et al., 1996).

Part of the 16S rRNA gene was amplified using the universal primers L₂₅₁₀ and H₃₀₈₀ (Palumbi, 1996). PCR reactions were prepared in a final volume of 20 µl and were composed of 0.5 pmoles of each primer, 0.125 mM of each dNTP, 10 mM Tris-HCl (pH 8.4), 25 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂ and 0.025 U of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, Carlsband, California). The amplification profile consisted of an initial denaturation at 95°C for 4 min, 32 cycles of 94°C for 50 s, 48°C for 50 s, 72°C for 1 min and a final extension step of 72°C for 5 min. PCR products (5 µl) were digested with seven restriction endonucleases, electrophoretically separated in 1.5% agarose gels, stained with ethidium bromide, visualized and photographed under UV light. The restriction enzymes used were: *NotI*, *AluI*, *DpnII*, *DdeI*, *HaeIII*, *RsaI* and *MspI* (New England BioLabs[®], Beverly, MA). For molecular weight size standard, a 100 bp ladder (New England BioLabs[®], Beverly, MA) was used.

Data analysis

Distinct endonuclease restriction patterns were identified by a specific letter. Each specimen was assigned a multi-letter code (restriction profiles for each enzyme were given letter designations in order of discovery A, B, etc.) that described its composite mtDNA genotype. Samples from San Francisco Bay, USA (SFB; *A. franciscana*) and Buenos Aires, Argentina (BAI; *A. persimilis*) were used as reference material (Gajardo et al., 2004).

Haplotype and nucleotide diversity values within populations as well as nucleotide divergence estimates between haplotypes and populations (Nei, 1987; Nei & Tajima, 1981; Nei & Miller, 1990) were computed using REAP 4.0 software (McElroy et al., 1992). The input data were site differences between haplotypes, inference of which was aided by the published sequence of the whole mtDNA of *A. franciscana* (Valverde et al., 1994).

The extent of geographical structuring of genetic variation was assessed by quantifying the inter-group component of total variance by F statistics using the analysis of molecular variance model (AMOVA, Excoffier et al., 1992) implemented in ARLEQUIN 3.01 (Excoffier et al., 2005). Molecular variance components and F statistics were calculated using the pairwise difference method. Significance of each F_{ST} value was evaluated by a permutation test (1000 iterations).

Heterogeneity in haplotype frequency distributions was tested for *A. persimilis* populations with the Monte Carlo permutation

procedure (Roff & Bentzen, 1989) implemented in the REAP 4.0 package.

Correlation of pairwise nucleotide divergence estimates with geographical distances for all *A. persimilis* populations was evaluated with the Mantel permutation procedure (Mantel, 1967) available in ARLEQUIN 3.01 (Excoffier et al., 2005). Trees based on distance methods were constructed using the UPGMA algorithm of the Neighbor module in PHYLIP 3.57c package (Felsenstein, 2004).

Biochemical Analysis (fatty acid composition)

Fatty acid profiles of six selected *A. persimilis* populations available from Ruiz et al. (2007) were included in the present study and were classified as marine (M) or freshwater (F) (Table 1). In order to examine the relationship of genetic divergence with PUFA profiles some tests were performed. Biochemical divergence among the six *A. persimilis* populations was estimated as pairwise Euclidean distances and displayed in a UPGMA dendrogram (SPSS, 12.0). Firstly, Euclidean distances were calculated with ten fatty acids (16:0, 16:1n-9, 16:1n-7, 18:0, 18:1n-9, 18:1n-7, 18:2n-6, 18:3n-3, 20:4n-6, 20:5n-3) and the ratio 16:0/16:1 (Table 2). Secondly, only the best diagnostic fatty acids (i.e. 18:3n-3 and the ratio 16:0/16:1) of the freshwater- and marine- type character were included to estimate the biochemical divergence between populations (Table 3). Additionally, a matrix pairwise F_{ST} values (Table 4) for the six *A. persimilis* populations was calculated. Correlation between biochemical and genetic distances (nucleotide divergence and F_{ST}) was tested by applying a Mantel test.

Results

A total of 236 individuals of both species were scored with the 7 restriction enzymes. The size of the PCR-amplified mtDNA fragment was 535 bp.

Four restriction enzymes (*NotI*, *AluI*, *DdeI* and *HaeIII*) produced species-specific patterns. The restriction enzyme *RsaI* detected polymorphism for *A. franciscana* whereas *DpnII*, *DdeI* and *MspI* detected polymorphism for *A. persimilis*.

In total, seven composite mtDNA genotypes were found (Table 5; Fig. 1). The maximum number of haplotypes (five, Pers1 to Pers5) was observed within *A. persimilis* while only two were detected in *A. franciscana* (Fran1, Fran 2; Fig. 1). The most common haplotype was Pers3, observed in four populations of *A. persimilis*. The PBL population showed the highest number of haplotypes (three), followed by COL and CIS with two haplotypes each. *Artemia franciscana* samples showed a unique haplotype for the Argentinean populations, which differed from the one found in the control population SFB at one restriction site for the enzyme *RsaI*. The remaining populations (HID, ALG, ING, SJU, BAI, TUN, CHI, EST, and SFB) showed no haplotype diversity. Nucleotide diversity was highest in the CIS population (Table 5).

Estimates of nucleotide divergence between the 7 haplotypes are shown in Table 6. The associated standard errors for each comparison are also reported. The highest degree of sequence divergence is between haplotypes Fran1 and Pers1 (0.188 ± 0.076). The Fran1 haplotype is unique to SFB whereas Pers1 is present in

both BAI and SJU populations. Average nucleotide divergence among Pers and between Fran haplotypes were 0.027 ± 0.024 and 0.020 ± 0.021 , respectively, while the average nucleotide divergence obtained between the two groups of haplotypes (Pers/Fran) was 0.160 ± 0.066 .

The divergence values were used to cluster haplotypes using the UPGMA method. The obtained cladogram is shown in Figure 1. Two well-differentiated groups are evident, represented by the *A. persimilis* and *A. franciscana* haplotypes. Pers5 (present in PBL) appears as the basal haplotype of the *A. persimilis* clade.

Pairwise comparisons of mtDNA nucleotide sequence divergence (d_A) for the populations studied, corrected for inter-population diversity (d_{XY}), are shown in Table 7. The average nucleotide diversity and nucleotide divergence among all the populations studied were 0.085 ± 0.0000835 and 0.083 ± 0.000085 , respectively. The nucleotide divergence estimates between *A. franciscana* and *A. persimilis* populations ranged from 13.8 to 18.8% whereas the average divergence among *A. franciscana* and *A. persimilis* populations were 1% and 1.2%, respectively.

The pairwise nucleotide divergence values were used as an input matrix for the generation of a dendrogram for the twelve populations studied (Fig. 2). Again, two groups are evident. The *A. persimilis* populations (first group) are well separated from the *A. franciscana* populations (second group). Within the former, the populations harbouring the haplotype Pers3 in high frequency (PBL, COL, ING and ALG) form a distinct clade that branches off the clade of BAI, SJU, CIS and HID. Within this clade, two other subclades appear, one that clusters populations in which the haplotype Pers 1 is

the most common (BAI, SJU), and the other clustering the populations in which the most frequent haplotype is Pers2 (CIS, HID).

All global F_{ST} tests of population differentiation showed significant differences in haplotype frequencies among all populations ($F_{ST} = 0.97$, $P < 0.05$). Most of the observed variation (91.41%) was due to differences between the two identified species, whereas only 7.23% was due to differences among populations within species. Only 1.36% of the total variation accounted for polymorphism within populations. The F_{ST} value for the *A. persimilis* group was very high ($F_{ST} = 0.81$, $p < 0.05$) with only 19.08% of the variation occurring within populations.

Significant heterogeneity in haplotype frequencies among *A. persimilis* populations was found by the Monte Carlo approach of Roff & Bentzen (1989) ($\chi^2 = 338.23$, $P < 0.01$). The Mantel test for correlation of pairwise nucleotide divergence with geographical distance between all pairs of examined *A. persimilis* populations was not significant ($P = 0.47$).

Mantel tests showed no significant correlations between population divergence in FA profiles (Fig. 3), calculated as fatty acid content matrix (Table 2) or only considering the ratio 16:0/16:1 and 18:3n-3 (Table 3), and mtDNA nucleotide divergence ($P = 0.98$ and $P = 0.77$, respectively). Mantel tests also revealed a lack of association ($P = 0.94$ and $P = 0.70$) between divergence in FA profiles and *A. persimilis* pairwise F_{ST} estimates. Therefore, patterns of genetic diversity found in *A. persimilis* populations and differences between samples grouped by marine/freshwater profile were not linked.

Discussion

The publication of the complete mtDNA sequence of *A. franciscana* (Valverde et al., 1994) has triggered the use of several DNA-based techniques (AFLP, RAPD and RFLP) (Badaracco et al., 1995; Triantaphyllidis et al., 1997; Sun et al., 1999; Gajardo et al., 2004; Baxevanis et al., 2005, 2006) as molecular tools for the characterization of populations and the evaluation of evolutionary relevant problems in the brine shrimp.

The present study provides molecular evidence, based on 16S mtDNA gene, for the presence of the two New World species *A. franciscana* and *A. persimilis* in Argentina and in the southernmost Chile (Los Cisnes, Tierra de Fuego). This finding, together with a number of other investigations (Amat et al., 1994; Gajardo et al., 1995, 1998; Rodriguez-Gil et al., 1998; Cohen et al., 1999; Zuñiga et al., 1999; Papeschi et al., 2000; Gajardo et al., 2004) on genetic variability, morphometric characterization and cross-breeding tests, offers new information into the genetic diversity and evolutionary relationships of *A. franciscana* and *A. persimilis*.

Of the total set of ten populations analyzed here, seven of them were grouped with the BAI *A. persimilis* reference sample (Fig. 2), and three with SFB (*A. franciscana*). The ascription of some Argentinean populations to both species had already been reported on the basis of morphometric (Amat et al., 1994; Cohen et al., 1999; Amat et al., 2004) and cytogenetic evidence (Papeschi et al., 2000), demonstrating the high correlation of these tools in species identification. The CIS population from Chile is the southernmost *Artemia* population ever sampled. It has been identified as *A.*

persimilis, confirming once again the presence of this species in southern Chile (Gajardo et al., 2004).

Haplotype and nucleotide diversity was observed only in *A. persimilis* populations (PBL, COL and CIS). No haplotype diversity within *A. franciscana* populations was found. In part, this is in accordance with the results of Gajardo et al. (2004) on Chilean populations since these authors found higher mean haplotype and nucleotide diversity values for *A. persimilis* than for *A. franciscana* populations by studying RFLP markers. Compared with the results obtained by Gajardo et al. (2004) (mean $h = 0.279 \pm 0.019$; mean $\pi = 0.0025$), the genetic diversity measures for the *A. persimilis* populations studied here are apparently different (mean $h = 0.149 \pm 0.041$; mean $\pi = 0.0023$), presumably as a result of increased taxon sampling for *A. persimilis* in the current study. This is a useful finding considering that *A. persimilis* diverged earlier from the common ancestor of the genus than *A. franciscana* as mentioned by the studies of Gajardo et al., 2001, 2002 and Baxevanis et al., 2006.

Based on the number of samples analyzed in the current work, a rough picture of the distribution patterns of *A. persimilis* and *A. franciscana* in Argentina is obtained. It is likely that *A. franciscana* has dispersed in the different Argentinean ecosystems via inoculation or waterfowl, as demonstrated in the Mediterranean basin by Amat et al. (2005) and Green et al. (2005). However, more studies are needed for a thorough examination of patterns of genetic structure and distribution of *A. franciscana* in Argentinean sites.

The presence of a species boundary at 37° - 38°S between *A. franciscana* (to the north) and *A. persimilis* (to the south), provides

some indications for the particular fitness of each species in relation to the temperature regimes of their respective habitats. Recent results (Medina et al., 2007) demonstrate the superior status of several fitness-related traits measured in *A. franciscana* at higher temperatures. This might shed more light to patterns of expansion of the two New World species in Argentina.

The population from TUN deserves special attention because of the unusual characteristics previously reported by some authors. Papeschi et al. (2000) ascribed this population cytogenetically to *A. persimilis*. Also, Amat et al. (2004) using life-history traits and cross-breeding tests raised the possibility for the presence of hybrids within this population, in accordance with Papeschi et al. (2000). This situation could be the same to that previously reported by Gajardo et al. (2004) with the population from Pichilemu salterns (Chile), indicating the possible presence of sites harbouring hybrid populations. Our molecular analysis has shown that the mtDNA haplotypes found in the TUN sample belong to *A. franciscana*. Previous cytogenetic (Papeschi et al., 2000) and morphometric (Amat et al., 2004) results for CHI and recent ones (unpublished data) for EST have illustrated that both populations belong to *A. franciscana*, which is in complete agreement with the results obtained in this study using genetic markers. However, mtDNA markers alone are not adequate for detecting hybrids because of their maternal inheritance, and therefore nuclear markers would be needed to demonstrate the presence of hybrids in a population.

Tests for population differentiation gave significant differences ($P < 0.05$) between the two species (% of variation within = 1.36). Heterogeneity in haplotype frequencies among *A. persimilis*

populations was confirmed by the Monte Carlo approach. Moreover, an extremely high value of F_{ST} (0.81) was found. The absence of significance in Mantel tests showed that the genetic differences between populations cannot be explained through isolation by distance. In Figure 2, the UPGMA dendrogram shows that the populations CIS and HID cluster together despite being geographically very distant (~ 1850 Km). The same situation occurs with populations BAI and SJU which are similarly apart. This result points to an isolation of *A. persimilis* populations and differentiation due to genetic drift in the presence of limited gene flow, or to the possibility of extreme founder-effects shaping up population structure. In addition, the prospected Argentinean biotopes vary substantially in chemical conditions (Dragó & Quirós, 1996; Amat et al., 2004; Ruiz et al., 2007) and this ecological diversity may have an additional effect on the genetic structure and variability of the respective *Artemia* populations.

Related with the second aim of the present work, although brine shrimp are naturally low in PUFA content (Navarro, 1990; Van Stappen, 1996), different strains have shown variability in the proportions of some fatty acids such as EPA and LNA (Tizol-Correa et al., 2006; Ruiz et al., 2007). Demonstrating a genetic basis for these differences could result in the identification of markers for tagging the marine and freshwater-types in *Artemia*. Two genetic hypotheses could be advanced to explain the divergence in fatty acid profiles. First, biochemical divergence could be the result of genetic drift. Since drift would affect the whole genome, including cytoplasmic genomes, a drift-based scenario could give rise to similar patterns of divergence at genomic regions that are not functionally related with the lipid metabolism, including mtDNA, and biochemical loci.

Alternatively, it can be considered that certain fatty acid profiles provide some adaptive advantage, with genetic divergence being limited to the genes responsible for such profiles. In this scenario, natural selection would cause divergence at PUFA metabolism-related genes, but not necessarily at the mitochondrial genome.

We have examined the correlation between genetic variability at the mtDNA and variability in the fatty acid profile in populations of *A. persimilis*, as this was the only species that showed haplotype and nucleotide diversity in our study, and we found no association between RFLP patterns at mtDNA and fatty acid profiles. This result supports the second model presented above, suggesting that genetic differentiation underlying the biochemical profiles, if present, is limited to the genes responsible for fatty acid metabolism, perhaps on an adaptive basis. However, two other alternatives should be taken into account. First, it is possible that the investigated markers have not been able to detect genetic divergence between freshwater- and-marine type profiles due to the variance among loci in the effect of drift and differences in evolutionary rates among genomic regions. Other mtDNA regions with higher evolutionary rates, or other nuclear markers, could show a parallel pattern of divergence between the genetic and the biochemical levels.

A second possibility is that the pattern of biochemical divergence is caused only or mainly by differences in the environment between the two groups of populations. It has been suggested that the fatty acid profile of *Artemia* and other zooplankton reflects the fatty acid profile of their food (Léger et al. 1986; Torrentera & Tacón, 1989; Navarro & Amat, 1992) and some authors (Vos et al., 1984; Léger et al., 1986; Lavens et al., 1989) have proposed that the

variation in PUFA content among cyst batches might be due to variations in the composition of the food for the parental *Artemia* populations in the natural habitat. Consequently, phenotypic plasticity may explain why striking biochemical differences within *A. persimilis* populations from different habitat types were not correlated with divergence in the assayed genetic markers.

Additional studies with other markers, particularly with those derived from or located near the genes involved in fatty acid metabolism, such as genes coding for desaturases, would be extremely useful to get further insights into the possible genetic basis of PUFA profiles in *Artemia*. These studies will have to wait until the major fatty acid desaturase genes in *Artemia* are isolated. Furthermore, classical genetic experiments designed to partition genetic and environmental components of the variability in PUFA profiles remain to be done. Concluding, our mtDNA analysis of restriction polymorphisms has provided novel and complementary data on the distribution of *A. persimilis* and *A. franciscana* in a region of South America. In particular, the current work has contributed significantly to a more informative description of *A. persimilis*, a primitive species largely under-sampled in previous studies, and *A. franciscana*, a lineage with an extraordinary potential for range expansion. Although a number of unknown populations exist and higher resolution assays are still needed, our results are of great value for further research in a possibly unique region of the world where two bisexual *Artemia* species come into contact. Moreover, with the increasing variety of *Artemia* strains reaching the aquaculture market, it becomes very interesting to further investigate and to map alternative markers and other genomic regions, besides those analyzed here, potentially associated to *Artemia* fatty acid patterns.

Acknowledgments

The current work has been performed through the visits of Olga Ruiz and Dra. Alba Papeschi to the Department of Genetics, Development and Molecular Biology (Aristotle University of Thessaloniki) within the framework of the EU project ICA4-CT-2001-10020 (INCO) on *Artemia* biodiversity.

References

- Abreu-Grobois, F.A., 1987. A review of the genetics of *Artemia*. In Sorgeloos P., D.A. Bengtson, W. Declair & E. Jaspers (eds), *Artemia* Research and its Applications., Universa Press, Belgium: 61-99.
- Amat, F., F. Hontoria, J.C. Navarro, R.G. Cohen & S. Rodríguez, 1994. Aproximación preliminar a la distribución del género *Artemia* (especie *A. persimilis*) en Argentina Provincias de Buenos Aires y La Pampa. Actas VIII Congreso Latinoamericano de Acuicultura, Colciencias, Bogota, Colombia: 73-82.
- Amat, F., R.G. Cohen, F. Hontoria & J.C. Navarro, 2004. Further evidence and characterization of *Artemia franciscana* (Kellogg, 1906) populations in Argentina. *Journal Biogeography* 31: 1735-1749.
- Amat, F., F. Hontoria, O. Ruiz, A.J. Green, M.I. Sánchez, J. Figueroa & F. Hortas, 2005. The American brine shrimp as an exotic

invasive species in the western Mediterranean. *Biological Invasions* 7: 37-47.

Badaracco, G., L. Baratelli, E. Ginelli, R. Meneveri, P. Plevani, P. Valsasnini & C. Barigozzi, 1987. Variations in repetitive DNA and heterochromatin in the genus *Artemia*. *Chromosoma* 95: 71-75.

Badaracco, G., M. Bellorini & N. Landsberger, 1995. Phylogenetic study of bisexual *Artemia* using random amplified polymorphic DNA. *Journal of Molecular Evolution* 41: 150-154.

Baratelli, L. & C. Barigozzi, 1990. Chromosome length: A differentiation parameter in the genus *Artemia*. *Rendiconti Accademia Nazionale dei Lincei, Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali, Serie 9*: 459-464.

Baxevanis, A.D. & T.J. Abatzopoulos, 2004. The phenotypic response of ME₂ (M Embolon, Greece) *Artemia* clone to salinity and temperature. *Journal Biological Research* 1: 107-114.

Baxevanis, A.D., G.V. Triantaphyllidis, I. Kappas, A. Triantafyllidis, C.D. Triantaphyllidis & T.J. Abatzopoulos, 2005. Evolutionary assessment of *Artemia tibetiana* (Crustacea, Anostraca) based on morphometry and 16S rRNA RFLP analysis. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 43: 189-198.

- Baxevanis, A.D., I. Kappas & T.J. Abatzopoulos, 2006. Molecular phylogenetics and asexuality in the brine shrimp *Artemia*. *Molecular Phylogenetic Evolution* 40: 724-738.
- Cohen, R.G., F. Amat, F. Hontoria & J.C. Navarro, 1999. Preliminary characterization of some Argentinean *Artemia* populations from La Pampa and Buenos Aires provinces. *Int. J. Salt Lake Res.* 8: 329-340.
- Colihueque, N. & G. Gajardo, 1996. Chromosomal analysis in *Artemia* populations from South America. *Cytobios* 88: 141-148.
- Dragó, E. & R. Quirós, 1996. The hydrochemistry of the inland waters of Argentina: a review. *International Journal Salt Lake Research* 4: 315-325.
- Estoup, A., C.R. Largiader, E. Perrot & D. Chourrout, 1996. Rapid one-tube DNA extraction for reliable PCR detection of fish polymorphic markers and transgenes. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 5: 295-298.
- Excoffier, L., P.E. Smouse & J.M. Quattro, 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- Excoffier, L., G. Laval & S. Schneider, 2005. Arlequin version 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47-50.

- Felsenstein, J., 2004. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) Version 36c Distributed by the author Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.
- Gajardo, G., M. Da Conceicao, L. Weber & J.A. Beardmore, 1995. Genetic variability and interpopulational differentiation of *Artemia* strains from South America. *Hydrobiologia* 302: 21-29.
- Gajardo, G., N. Colihueque, M. Parraguez & P. Sorgeloos, 1998. International Study on *Artemia* LVIII. Morphologic differentiation and reproductive isolation of *Artemia* populations from South America. *International Journal of Salt Lake Research* 7: 133-151.
- Gajardo, G., C. Mercado, J.A. Beardmore & P. Sorgeloos, 1999. International Study on *Artemia* LX. Allozyme data suggest that a new *Artemia* population in southern Chile (50° 29' S; 73° 45' W) is *A. persimilis*. *Hydrobiologia* 405: 117-123.
- Gajardo, G., J.A. Beardmore & P. Sorgeloos, 2001. International Study on *Artemia* LXII Genomic relationships between *Artemia franciscana* and *A. persimilis*, inferred from chromocentre numbers. *Heredity* 87: 172-177.
- Gajardo, G., T.J. Abatzopoulos, I. Kappas & J.A. Beardmore, 2002. Evolution and speciation. In Abatzopoulos T.J., J.A. Beardmore, J.S. Clegg & P. Sorgeloos (eds.), *Artemia: Basic and Applied Biology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands: 225-250.

- Gajardo, G., J., Crespo, A. Triantaphyllidis, A. Tzika, A.D. Baxevanis, I. Kappas & T.J. Abatzopoulos, 2004. Species identification of Chilean *Artemia* populations based on mitochondrial DNA RFLP analysis. *Journal of Biogeography* 31: 547-555.
- Green, A.J., M.I. Sánchez, F. Amat, J. Figuerola, F. Hontoria, O. Ruiz & F. Hortas, 2005. Dispersal of invasive and native brine shrimps *Artemia* (Anostraca) via waterbirds. *Limnology and Oceanography* 50: 737-742.
- Hontoria, F. & F. Amat, 1992. Morphological characterization of adult *Artemia* (Crustacea, Branchiopoda) from different geographical origin: American populations. *Journal of Plankton Research* 14: 1461-1471.
- Lavens, P., P. Léger & P. Sorgeloos, 1989. Manipulation of the fatty acid profile in *Artemia* offspring produced in intensive culture systems. In De Paw N., E. Jaspers, H. Ackefors & N. Wilkins (eds.), *Aquaculture: Biotechnology in Progress*. European Aquaculture Society, Bredene: 731-739.
- Lavens, P. & P. Sorgeloos, 2000. The history, present status and prospects of the availability of *Artemia* cysts for aquaculture. *Aquaculture* 181: 397-403.
- Léger, P., D.A. Bengtson, P.M. Simpson & P. Sorgeloos, 1986. The use and nutritional value of *Artemia* as a food source. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review* 24: 521-623.

- Mantel, N., 1967. Detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27: 209-220.
- Medina, G.R., J. Goenaga, F. Hontoria, G. Cohen & F. Amat, 2007. Effects of temperature and salinity on prereproductive life span and reproductive traits of two species of *Artemia* (Branchiopoda, Anostraca) from Argentina: *Artemia franciscana* and *Artemia persimilis*. *Hydrobiologia* 579: 41-53.
- McElroy, D., P. Moran, E. Bermingham & I. Kornfield, 1992. REAP - An Integrated environment for the manipulation and phylogenetic analysis of restriction data. *Journal of Heredity* 83: 157-158.
- Navarro, J.C., 1990. Caracterización de las cepas españolas de *Artemia* desde el punto de vista de su valor nutritivo y de sus fenotipos electroforéticos Implicaciones prácticas en Acuicultura. Universidad de Valencia, España, MS Thesis, 350 pp.
- Navarro, J.C. & F. Amat, 1992. Effect of algal diets on the fatty acid composition of brine shrimp, *Artemia* sp cysts. *Aquaculture* 101: 223-227.
- Navarro, J.C., F. Amat & J.R. Sargent, 1993. The lipids of the cysts of freshwater-and marine-type *Artemia*. *Aquaculture* 109: 327-336.
- Nei, M., 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York: 512 pp.

- Nei, M. & F. Tajima, 1981. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics* 97: 145-163.
- Nei, M. & J.C. Miller, 1990. A simple method for estimating average number of nucleotide substitutions within and between populations from restriction data. *Genetics* 125: 873-879.
- Palumbi, S.R., 1996. Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. In Hillis, D.M., C. Moritz & B.K. Mable (eds.), *Molecular Systematics*. Sinauer Associates, Sunderland: 205-247.
- Papeschi, A.G., R.G. Cohen, G. Pastorino & F. Amat, 2000. Cytogenetic proof that the brine shrimp *Artemia franciscana* (Crustacea, Branchiopoda) is found in Argentina. *Hereditas* 133: 159-166.
- Rodríguez-Gil, S., A.G. Papeschi & R.G. Cohen, 1998. Mitotic and meiotic chromosomes of *Artemia* (Branchiopoda) from populations of La Pampa province, Argentina. *Journal of Crustacean Biology* 18: 36-41.
- Roff, D.A. & P. Bentzen, 1989. The statistical analysis of mitochondrial DNA polymorphisms: χ^2 and the problem of small samples. *Molecular Biology and Evolution* 6: 539-545.
- Ruiz, O., G.R. Medina, G. Cohen, F. Amat & J.C. Navarro, 2007. Diversity of the fatty acid composition of *Artemia* sp cysts from Argentinean populations. *Marine Ecology Progress Series* 335: 155-165.

- Sun, Y., W.Q. Song, Y. Zhong, R.S. Zhang, T.J. Abatzopoulos & R.Y. Chen, 1999. Diversity and genetic differentiation in *Artemia* species and populations detected by AFLP markers. *International Journal of Salt Lake Research* 8: 341-350.
- Tizol-Correa, R., L. Carreon-Palau, B.O. Arredondo-Vega, G. Murugan, L. Torrentera, T.D. Maldonado-Montiel & A.M. Maeda-Martinez, 2006. Fatty acid composition of *Artemia* (Branchiopoda: Anostraca) cysts from tropical salterns of southern Mexico and Cuba. *Journal of Crustacean Biology* 26 (4): 503-509.
- Torrentera, B.L. & A.G.J. Tacón, 1989. La producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura. FAO, Brasil.
- Triantaphyllidis, G.V., G.R.J. Criel, T.J. Abatzopoulos, K.M. Thomas, J. Peleman, J.A. Beardmore & P. Sorgeloos, 1997. International Study on *Artemia* LVII. Morphological and molecular characters suggest conspecificity of all bisexual European and North African *Artemia* populations. *Marine Biology* 129: 477-487.
- Triantaphyllidis, G.V., T.J. Abatzopoulos & P. Sorgeloos, 1998. Review of the biogeography of the genus *Artemia* (Crustacea, Anostraca). *Journal of Biogeography* 25:213-226.
- Valverde, J.R., B. Batuecas, C. Moratilla, R. Marco & R. Garesse, 1994. The complete mitochondrial DNA sequence of the crustacean *Artemia franciscana*. *Journal of Molecular Evolution* 39: 400-408.

- Van Stappen, G., 1996. Introduction biology and ecology of *Artemia*.
In Lavens P. & P. Sorgeloos (eds), Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture (FAO). Fisheries Technical Paper N° 361, Rome, Italy:101-121.
- Van Stappen, G., 2002. Zoogeography In: Abatzopoulos T.J., J.A. Beardmore, J.S. Clegg & P. Sorgeloos (eds.), *Artemia: Basic and Applied Biology*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands: 171-224.
- Van Stappen, G., L.Y. Sui, N.H. Xin & P. Sorgeloos, 2003. Characterization of high-altitude *Artemia* populations from the Qinghai-Tibet Plateau, PR China. *Hydrobiologia* 500: 179-192.
- Vos, J., P. Léger, P. Vanhaecke & P. Sorgeloos, 1984. Quality evaluation of brine shrimp *Artemia* cysts produced in Asian Salt ponds. *Hydrobiologia* 108: 17-23.
- Watanabe, T., F. Oowa, C. Kitajima & S. Fujita, 1980. Relationship between dietary value of brine shrimp *Artemia salina* and their content of ω 3 highly unsaturated fatty acids. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 46: 35-41.
- Zuñiga, O., R. Wilson, F. Amat & F. Hontoria, 1999. Distribution and characterization of Chilean populations of the brine shrimp *Artemia* (Crustacea, Branchiopoda, Anostraca). *International Journal of Salt Lake Research* 8: 23-40.

Tables

Table 1 List of the *Artemia* populations studied, with their types of habitats, their respective FA (fatty acid) profiles (from Ruiz et al., 2007) and precise localities in Argentina and Chile.

Locality	Abbreviation	Species	¹ Type of habitat/FA profile	Coordinates	IATS ² / ARC ³ code No
Hidalgo (Argentina)	HID	<i>A. persimilis</i>	I / F	37°08' S, 63°31' W	5 / -
Algarrobo (Argentina)	ALG	<i>A. persimilis</i>	I / M	40°22' S, 63°13' W	4 / -
Palos Blancos (Argentina)	PBL	<i>A. persimilis</i>	I / M	39°28' S, 62°45' W	9 / -
El Ingles (Argentina)	ING	<i>A. persimilis</i>	C / F	40°43' S, 62°27' W	3 / -
Caleta Olivia (Argentina)	COL	<i>A. persimilis</i>	C / F	46°27' S, 67°31' W	7 / -
San Julian (Argentina)	SJU	<i>A. persimilis</i>	C / M	49°17' S, 67°46' W	11 / -
Las Tunas (Argentina)	TUN	<i>A. franciscana</i>	I / M	33°45' S, 62°19' W	14 / -
Mar Chiquita (Argentina)	CHI	<i>A. franciscana</i>	I / M	30°39' S, 62°36' W	16 / -
Santiago del Estero	EST	<i>A. franciscana</i>	I / F	27°21' S, 64°13' W	12 / -
Los Cisnes (Chile)	CIS	<i>A. persimilis</i>	C / ?	53°15' S, 70°10' W	15 / -
⁴ Buenos Aires (Argentina)	BAI	<i>A. persimilis</i>	C / ?	34°30' S, 58°20' W	- / 1321
⁴ San Francisco Bay (USA)	SFB	<i>A. franciscana</i>	C / ?	37°28' N, 122°30' W	- / 1258

¹I: Inland, C: coastal; F: freshwater, M: marine

²Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal, Castellón, Spain

³*Artemia* Reference Center, Ghent, Belgium

⁴Reference samples (Gajardo et al., 2004)

Table 2 Rescaled distance matrix of the fatty acid percentages (16:0, 16:1n-9, 16:1n-7, 18:0, 18:1n-9, 18:1n-7, 18:2n-6, 18:3n-3, 20:4n-6, 20:5n-3) and the ratio 16:0/16:1 from the cysts of Argentinean populations of *Artemia* (Ruiz et al., 2007).

	HID	ALG	PBL	ING	COL	SJU
HID	0.000					
ALG	1.000	0.000				
PBL	0.939	0.235	0.000			
ING	0.000	0.965	0.897	0.000		
COL	0.363	0.718	0.762	0.344	0.000	
SJU	0.862	0.151	0.344	0.838	0.567	0.000

Table 3 Rescaled distance matrix based on the 18:3n-3 fatty acid percentage and the ratio 16:0/16:1 from the cysts of Argentinean populations of *Artemia* (Ruiz et al., 2007).

	HID	ALG	PBL	ING	COL	SJU
HID	0.000					
ALG	0.981	0.000				
PBL	0.764	0.188	0.000			
ING	0.000	1.000	0.783	0.000		
COL	0.275	0.675	0.459	0.295	0.000	
SJU	0.931	0.020	0.140	0.951	0.626	0.000

Table 4 Population pairwise F_{ST} estimates.

	HID	ALG	PBL	ING	COL	SJU
HID	0.000					
ALG	1.000	0.000				
PBL	0.699	0.095	0.000			
ING	1.000	0.000	0.095	0.000		
COL	0.859	0.158	0.111	0.158	0.000	
SJU	1.000	1.000	0.832	1.000	0.903	0.000

Table 5 Composite genotypes, haplotype diversity ($h \pm SE$), % nucleotide diversity (π) and samples sizes (n) across populations. Composite genotypes are denoted with capital letters, each one corresponding to the restriction pattern obtained by a restriction enzyme in the following order: *NotI*, *AluI*, *DpnII*, *DdeI*, *HaeIII*, *RsaI*, *MspI*.

HAPLOTYPE	HID	ALG	PBL	ING	COL	SJU	TUN	CHI	EST	CIS	BAI	SFB
Fran1	AAAAAAA											1.00
Fran2	AAAAABA						1.00	1.00	1.00			
Pers1	BBBBBBB					1.00					1.00	
Pers2	BBBBBBA	1.00	0.10							0.72		
Pers3	BBABBBA		1.00	0.75	1.00	0.80						
Pers4	BBABBBB				0.20					0.28		
Pers5	BBACBBA		0.15									
n		20	20	20	20	20	20	20	18	18	20	20
h		-	-	0.426	-	0.337	-	-	-	0.425	-	-
SE				0.122		0.110				0.099		
π		-	-	0.010	-	0.005	-	-	-	0.012	-	-
Mean h^1	0.149											
SE ¹	0.041											
Mean π^1	0.0023											
SE ¹	0.0000016											

¹*A. persimilis* populations.

Table 6 Estimates of nucleotide divergence between haplotypes (below diagonal). Standard errors are shown above the diagonal.

HAPLOTYPE	Fran 1	Fran 2	Pers 1	Pers 2	Pers 3	Pers 4	Pers 5
Fran 1	AAAAAAA	0.021	0.076	0.072	0.068	0.072	0.055
Fran 2	AAAAABA	0.020	0.072	0.068	0.062	0.068	0.051
Pers 1	BBBBBBB	0.188	0.175	0.016	0.025	0.016	0.036
Pers 2	BBBBBBA	0.175	0.160	0.013	0.018	0.025	0.031
Pers 3	BBABBBA	0.160	0.145	0.028	0.014	0.018	0.025
Pers 4	BBABBBB	0.175	0.160	0.013	0.028	0.014	0.031
Pers 5	BBACBBA	0.137	0.124	0.054	0.041	0.028	0.041

Table 7 Mean nucleotide diversity (d_{XY}) (above diagonal) and nucleotide divergence (d_A) (below diagonal) between the *Artemia* populations studied.

POBLACIÓN	HID	ALG	PBL	ING	COL	SJU	TUN	CHI	EST	CIS	BAI	SFB
HID		0.014	0.017	0.014	0.017	0.013	0.160	0.160	0.160	0.008	0.013	0.175
ALG	0.014		0.006	0.000	0.003	0.028	0.145	0.145	0.145	0.014	0.028	0.160
PBL	0.012	0.001		0.006	0.008	0.030	0.143	0.143	0.143	0.018	0.030	0.158
ING	0.014	0.000	0.001		0.003	0.028	0.145	0.145	0.145	0.014	0.028	0.160
COL	0.015	0.000	0.001	0.000		0.025	0.148	0.148	0.148	0.016	0.025	0.163
SJU	0.013	0.028	0.025	0.028	0.023		0.175	0.175	0.175	0.013	0.000	0.188
TUN	0.160	0.145	0.138	0.145	0.146	0.175		0.000	0.000	0.160	0.175	0.020
CHI	0.160	0.145	0.138	0.145	0.146	0.175	0.000		0.000	0.160	0.175	0.020
EST	0.160	0.145	0.138	0.145	0.146	0.175	0.000	0.000		0.160	0.175	0.20
CIS	0.002	0.008	0.007	0.008	0.007	0.007	0.154	0.154	0.154		0.013	0.175
BAI	0.013	0.028	0.025	0.028	0.023	0.000	0.175	0.175	0.175	0.007		0.188
SFB	0.175	0.160	0.153	0.160	0.161	0.188	0.020	0.020	0.020	0.169	0.188	

Figures

Fig. 1 UPGMA dendrogram of the seven mtDNA composite genotypes identified in the *Artemia* populations studied.

Fig. 2 UPGMA dendrogram clustering all *Artemia* populations according to pairwise sequence divergence (restriction sites data).

Fig. 3 UPGMA phenogram based on biochemical divergence between *A. persimilis* populations (Euclidean distance between 10 fatty acids and the ratio 16:0/16:1). All populations are labelled with their respective mtDNA haplotype.

Figure 1

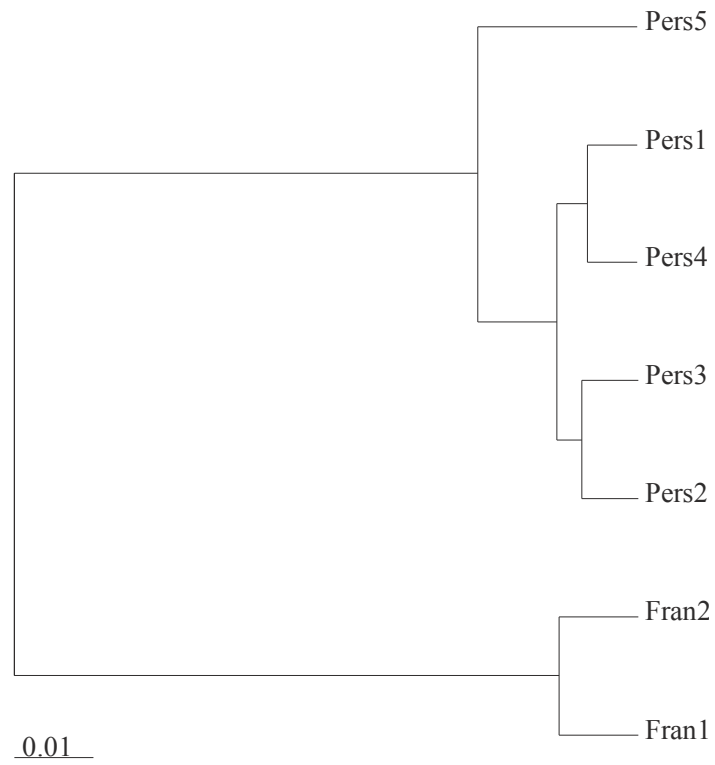


Figure 2

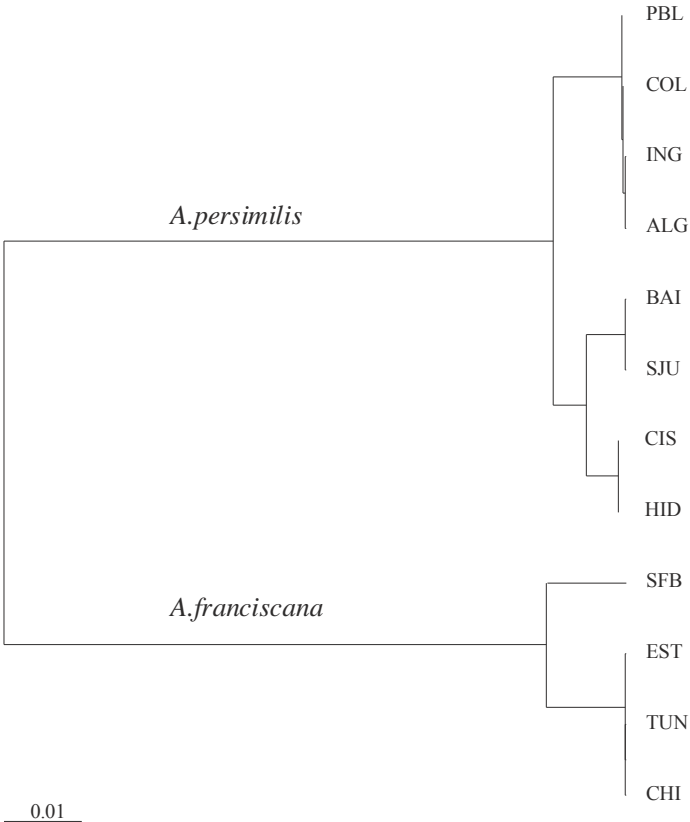


Figure 3