



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR (ADNmt) Y CITOGENÉTICA
DE HÍBRIDOS PROVENIENTES DE TRES POBLACIONES
DE *Artemia franciscana*, Kellogg, 1906.

TESIS

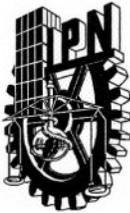
QUE COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

PRESENTA:

LIC. ECOL. MAR. JOSÉ RAÚL MORALES ÁVILA

LA PAZ, BAJA CALIFORNIA SUR

SEPTIEMBRE 2005



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
COORDINACION GENERAL DE POSGRADO E INVESTIGACION
ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 13:00 horas del día 7 del mes de Julio del 2005 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis de grado titulada:

**“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR (ADNmt) Y CITOGENÉTICA DE HÍBRIDOS
PROVENIENTES DE TRES POBLACIONES DE *Artemia franciscana* KELLOGG, 1906”**

Presentada por el alumno:

MORALES
Apellido paterno

AVILA
materno

JOSÉ RAÚL
nombre(s)

Con registro:

A	0	3	0	4	1	3
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante al grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

Director de tesis
PRIMER VOCAL

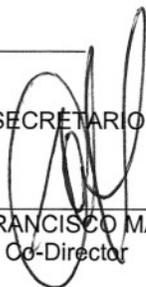

DR. GOPAL MURUGAN

PRESIDENTE

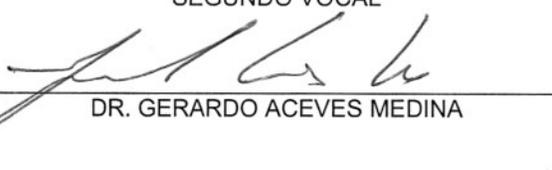


DRA. SILVIE DUMAS

SECRETARIO


MC. SERGIO FRANCISCO MARTÍNEZ DÍAZ
Co-Director

SEGUNDO VOCAL


DR. GERARDO ACEVES MEDINA

TERCER VOCAL


DR. ALEJANDRO MANUEL MAEDA MARTÍNEZ

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO


DR. RAFAEL CERVANTES DUARTE



L. P. N.
CICIMAR
DIRECCION



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
COORDINACION GENERAL DE POSGRADO E INVESTIGACION

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 23 del mes Agosto del año 2005, el (la) que suscribe JOSÉ RAÚL MORALES ÁVILA alumno(a) del Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS con número de registro A030413 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de: DR. GOPAL MURUGAN y cede los derechos del trabajo titulado: "CARACTERIZACIÓN MOLECULAR (ADNmt) Y CITOGENÉTICA DE HÍBRIDOS PROVENIENTES DE TRES POBLACIONES DE *Artemia franciscana* KELLOGG, 1906" al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: jmoralesa@ipn.mx

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


JOSÉ RAÚL MORALES AVILA

nombre y firma

DEDICATORIA

Agradezco infinitamente a Dios.

A mis padres: Félix y Julieta

A mi hermano: Luis Antonio

Para Norma Angélica Flores Lozano.

A mis familiares y amigos de toda la vida

A mi sobrino Carlos Antonio.

Especialmente dedicado para mis familiares y amigos que por alguna u otra razón ya no están físicamente con nosotros:

Marco Antonio Jacinto, M. Eloína Polanco, Evencio Ávila y la tía Rosalía.

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos especiales a los Doctores Gopal Murugan y Alejandro Maeda por la dirección y asesoría durante el desarrollo del presente proyecto de tesis. Gracias por la disponibilidad y el apoyo brindado en todos los sentidos.

Al M. en C. Sergio F. Martínez D., gracias por todo.

A la M. en C. Hortensia Obregón B., por la asesoría brindada acerca del manejo de *Artemia* en laboratorio.

A la M. en C. Delia Irene Rojas Posadas por el apoyo y asesoría brindada en el laboratorio de Genética Molecular.

Al M. en C. Jesús N. Gutiérrez por toda la ayuda brindada.

A la Dra. Norma Y. Hernández S., gracias por todo.

A la M. en C. Bárbara González A., por los consejos, asesoría y apoyo.

A mis compañeros de laboratorio de genética molecular.

Agradezco infinitamente a los miembros del comité revisor por cada uno de los comentarios para el mejoramiento de este trabajo.

Agradezco al Dr. Gerardo Aceves Medina y la Dra. Cristina Band, por el invaluable apoyo brindado.

Agradezco a la Dra. Silvie Dumas por la asesoría y comentarios.

Norma Angélica Flores L., gracias por tu apoyo, ayuda, paciencia y consejos brindados.

Gracias al IPN y al CICIMAR por todo el apoyo mediante la disposición de laboratorios e instalaciones durante mi formación académica.

Gracias al PIFI por el apoyo económico brindado.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) por permitir la realización de esta tesis en sus instalaciones.

Al CONACyT por el apoyo económico brindado a través de una beca y por el financiamiento del proyecto “characterization of mexican *Artemia* (Crustacea: Branchiopoda: Anostraca) using nuclear and mitochondrial genetics markers” clave: CONACyT-2002-CO1- 42335, del cual esta tesis forma parte.

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE TABLAS	V
GLOSARIO.....	VI
RESUMEN	IX
ABSTRACT	X
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
3. JUSTIFICACIÓN	6
4. OBJETIVO GENERAL.....	7
4.1. Objetivos particulares	7
5. HIPÓTESIS	7
6. MATERIAL Y MÉTODOS	8
6.1. Cultivo de <i>Artemia</i>	8
6.1.1. Hidratación y eclosión de quistes de <i>Artemia</i>	8
6.1.2. Desarrollo del cultivo de las poblaciones de <i>Artemia</i> de Yavaros (YAV), Pichilingue (PCH) y San Francisco (SFB)	9
6.2. Cruzas recíprocas.....	9
6.2.1. Separación de organismos de cada población por sexo	9
6.2.2. Cruzas recíprocas entre poblaciones	9
6.2.3. Obtención de híbridos	10
6.3. Citogenética.....	10
6.3.1. Obtención de nauplios para análisis citogenéticos (para observar cromocentros).....	10
6.3.2. Tinción de laminillas	11
6.4. Genética	12
6.4.1. Disección de <i>Artemia</i>	12

6.4.2. Extracción de ADN total (ADNt) a partir de adultos de <i>Artemia</i>	12
6.4.3. Extracción de ADN total a partir de quistes de <i>Artemia</i>	13
6.4.4. Amplificación del fragmento del gen 16S de ADNmt mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	14
6.4.5. Electroforesis en gel de agarosa	14
6.4.6. Purificación del producto de PCR (de solución)	15
6.4.7. Purificación del producto del PCR (a partir de bandas del gel)	15
6.4.8. Preparación de muestras para secuenciación.....	16
6.4.9. Procesamiento de datos.....	16
7. RESULTADOS	18
7.1. Análisis estadísticos de cromocentros en poblaciones de <i>Artemia</i>	18
7.1.1. Estadística descriptiva y prueba de normalidad (K - S)	18
7.1.2. Prueba de comparaciones múltiples entre el número de cromocentros de poblaciones de <i>Artemia</i> (Tukey).....	20
7.1.3. Diagrama de cajas.....	20
7.1.4. Diagrama de árbol	21
7.2. Análisis estadísticos de cromocentros en híbridos	22
7.2.1. Estadística descriptiva, prueba de normalidad y ANOVA	22
7.2.3. Diagrama de cajas.....	24
7.2.4. Diagrama de árbol	25
7.2.5. Comparación de poblaciones de <i>Artemia</i> vs. híbridos	26
7.2.6. Diagrama de árbol	28
7.3. Análisis de ADN.....	29
7.3.1. Comparación de secuencias entre poblaciones	29
7.3.2. Comparación de secuencias entre híbridos	30
7.3.3. Comparación de secuencias entre poblaciones e híbridos	31
7.3.4. Distancia genética parámetro de Kimura - 2.....	32
7.3.5. Distancia genética entre poblaciones	32
7.3.6. Distancia genética entre híbridos	33
7.3.7. Distancia genética de poblaciones e híbridos	33

7.3.8. Diagrama de árbol basado en el parámetro de distancia de Kimura - 2	34
8. DISCUSIÓN	35
8.1. Poblaciones de <i>Artemia</i>	35
8.2. Obtención de híbridos en laboratorio.....	36
8.3. Citogenética.....	38
8.4. Análisis molecular.....	44
9. CONCLUSIONES.....	49
10. RECOMENDACIONES	51
BIBLIOGRAFÍA	52
ANEXOS	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estadística descriptiva de cromocentros en tres poblaciones de <i>Artemia</i>	21
Figura 2. Agrupaciones de tres poblaciones de <i>Artemia</i> basadas en el número de cromocentros.....	22
Figura 3. Variación en el número de cromocentros en híbridos de <i>Artemia</i>	25
Figura 4. Agrupaciones en híbridos de <i>Artemia</i> basadas en el número de cromocentros.	26
Figura 5. Análisis de agrupamiento de tres poblaciones de <i>Artemia</i> y sus híbridos.	28
Figura 6. Árbol UPGMA basado en el parámetro de distancia de Kimura - 2.	34

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores promedio de cromocentros por nauplio.....	18
Tabla 2. Medidas de tendencia central de cromocentros por población.....	19
Tabla 3. Análisis de cromocentros en poblaciones de <i>Artemia</i> con ANOVA de una vía.....	19
Tabla 4. Prueba de comparaciones múltiples de Tukey entre el número de cromocentros de poblaciones de <i>Artemia</i>	20
Tabla 5. Valores promedio de cromocentros por híbridos producidos en laboratorio.....	23
Tabla 6. Estadística descriptiva de cromocentros en híbridos de <i>Artemia</i> producidos en laboratorio.....	23
Tabla 7. Análisis de variancia de una vía en híbridos de <i>Artemia</i> con base al número de cromocentros.....	24
Tabla 8. Análisis de variancia (ANOVA) entre poblaciones de <i>Artemia</i> e híbridos producidos en laboratorio.....	26
Tabla 9. Prueba de comparaciones múltiples de Tukey entre poblaciones de <i>Artemia</i> e híbridos producidos en laboratorio.....	27
Tabla 10. Número de individuos por sexo utilizados para el análisis del gen 16S ARNr.....	29
Tabla 11. Sitios de variación en la secuencia del gen 16S ARNr entre poblaciones de <i>Artemia</i>	30
Tabla 12. Sitios de variación del fragmento del gen 16S ARNr entre híbridos (C4 - C6).....	31
Tabla 13. Sitios de variación en la secuencia del gen 16S ARNr entre poblaciones e híbridos de <i>Artemia</i>	32
Tabla 14. Distancia genética entre poblaciones e híbridos (parámetro de Kimura – 2).....	33

GLOSARIO

ADN (Ácido desoxiribonucleico): Molécula compuesta por dos cadenas lineales de nucleótidos unidas entre sí, por enlaces entre el azúcar de una cadena al ácido fosfórico de la otra. El orden específico de los nucleótidos constituyentes, codifican la información genética.

ADN mitocondrial (ADNmt): Molécula circular de doble cadena contenido en las mitocondrias, oscila en un rango de 14 a 40 kilobases de longitud.

ADN total (ADNt): Referido al ADN en general, en animales el cual incluye ADN nuclear y mitocondrial.

ARN (Ácido ribonucleico): Molécula de ácido nucleico compuesto de una simple hebra y distinguido del ADN por que contiene Ribosa y Uracilo.

Corion: Cubierta lipoprotéica rígida que envuelve a los embriones de *Artemia* en estado de latencia, denominados quistes.

Cromatina: Material compuesto por ADN y proteínas histónicas, en el núcleo de las células interfásicas forma de una red de fibrillas.

Cromocentro: Bloques de heterocromatina en los cromosomas, contienen alto contenido de ADN repetitivo de la familia *Alu I*.

Distancia genética: Estimación cuantitativa del grado de divergencia genética entre secuencias individuales o taxa, cuyas unidades dependen de la naturaleza de la información molecular resumida.

Especies crípticas: Entidades taxonómicas o biológicas de nivel especie que no pueden ser distinguidas por análisis morfológicos.

F1: Se refiere a la primera generación de descendientes.

F2: Se refiere a la segunda generación de descendientes.

Gen: Unidad fundamental de la herencia, hechos de ácido desoxiribonucleico y se encuentran localizados a lo largo de los cromosomas en una posición definida denominada *locus* que lleva la información genética de una generación a la otra.

Genoma: Material genético completo contenido en un individuo.

Haplotipo: Secuencia específica de ADN mitocondrial.

Hibridación: Cruzamiento de individuos de diferente constitución genética para: 1) propiciar recombinaciones genéticas y 2) aprovechar el fenómeno de la heterosis.

Kilobase (Kb): Unidad de medición para los nucleótidos, 1 Kb equivale a 1000 bases.

Mutación: Es un cambio heredable en la secuencia de los ácidos nucleicos contenidos en el genoma de un organismo.

Nauplio: Primer estado larval de vida libre de la mayoría de los crustáceos (posterior a la eclosión).

Nucleótido: Unidad básica del ADN y el ARN; molécula compuesta por azúcar (desoxiribosa o ribosa), un grupo fosfato y bases nitrogenadas que se reconocen como el "alfabeto" del código genético: Adenina (A), Guanina (G), Citosina (C), o Timidina (T) (Uracilo reemplaza a la Timidina en el ARN) (ver también ADN o ARN).

PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa): Técnica usada para amplificar un fragmento de ADN flanqueado por dos regiones de secuencia conocida. Esta técnica es una simulación de la síntesis de ADN en las células.

Quiste: En el género *Artemia*, es un embrión en latencia (en estado de gástrula), el cual está cubierto por una capa protectora externa llamada córion.

Secuenciación: Método para determinar el orden lineal de los nucleótidos en un ácido nucléico o de los aminoácidos en una proteína.

Sinónimo júnior: En nomenclatura, uno de dos o más nombres para la misma entidad taxonómica.

16S ARNr: Gen estructural no codificante; es una transcripción de la subunidad ribosomal grande ARN (16S ARNr) el cual asociado a proteínas dentro de una estructura secundaria, forma la subunidad mitocondrial de los ribosomas.

Transición: Mutación por sustitución en un par de bases que resulta de la sustitución purina-purina o pirimidina-pirimidina.

RESUMEN

En el presente trabajo fueron estudiadas citogenética y molecularmente poblaciones gonocóricas de *Artemia* de San Francisco Bay E.U.A. (SFB), San Juan Nepomuceno (Pichilingue B.C.S. México) (PCH) y Yavaros, Sonora, México (YAV), así como la generación F1 de híbridos producidos en laboratorio mediante cruza recíprocas de estas poblaciones. El objetivo del presente estudio fue caracterizar y aportar información de las poblaciones nativas mexicanas respecto a *Artemia franciscana*. El número promedio de cromocentros por población fue SFB = 13.5 ± 2.8 , PCH = 12 ± 3.0 y YAV = 3 ± 1.1 . Los híbridos F1 de las cruza recíprocas mostraron valores promedio de cromocentros de 12.1 – 13.3. El análisis estadístico indicó diferencias significativas entre poblaciones. En cambio, YAV fue significativamente diferente respecto a los híbridos. Poblaciones e híbridos fueron genéticamente analizados basados en un fragmento de 477 pares de bases del gen 16S de ADNmt. Se identificó un haplotipo por población, el cual puede ser observado en machos y hembras. Se observaron cinco sitios de variación con cambios principalmente transicionales C↔T en el fragmento del gen analizado. Los valores máximos de distancia genética obtenidos mediante el parámetro de Kimura - 2 oscilaron en un rango de 0.006 a 0.008 indicando una baja diferenciación genética entre las poblaciones estudiadas.

ABSTRACT

Cytogenetic and molecular studies were carried out in *Artemia* populations from San Francisco Bay (SFB) U.S.A., San Juan Nepomuceno (Pichilingue B. C. S. México) (PCH), and Yavaros Sonora (YAV) México, as well as in F1 hybrids produced in the laboratory through cross-breeding of these populations. The purpose of the present study was to characterize and provide information about the Mexican native populations with regard *Artemia franciscana*. The mean chromocenters number in each population was SFB = 13.5 ± 2.8 , PCH = 12 ± 3.0 and YAV = 3 ± 1.1 . F1 hybrids from interpopulation crossings showed 12.1 – 13.3 chromocenters. The statistical analyses indicated significant differences among populations. However, YAV showed significant differences in F1 hybrids. Populations and hybrids were genetically analyzed based on a 477 bp fragment of 16S mitochondrial rRNA gene. One haplotype was identified for each population, which can be observed in males and females. In total five substitutions mostly transitional C↔T were observed from the 16S gene fragment analyzed. The Kimura 2-parameter distances ranged from 0.006 to 0.008 indicating a low genetic differentiation among the studied populations.

1. INTRODUCCIÓN

El camarón del género *Artemia* (Crustacea: Branchiopoda: Anostraca) habita cuerpos de agua salinos e hipersalinos en todos los continentes excepto en el Antártico (Belk, 1982). El comportamiento reproductivo dentro de este género puede presentar variaciones con alternancias de eclosión ovípara y ovovivípara que pueden deberse a las adaptaciones de las condiciones ambientales o variaciones genéticas inclusive dentro de especies (Lenz y Browne, 1991; Castro *et al.*, 1999). La distribución geográfica que presenta este género, puede deberse a estrategias ecológicas (*i.e.*, transporte de quistes por medio de aves) y/o por la introducción a diferentes lugares para la alimentación de cultivos de peces y crustáceos. De acuerdo con Brown y Bowen (1991), este género está conformado por un complejo de especies gonocóricas (de reproducción sexual) así como poblaciones partenogénicas con varios niveles de ploidía. Para el continente americano se conocen tres especies gonocóricas dentro del género, *Artemia persimilis*, *A. monica* y *A. franciscana*, siendo ésta última la que presenta mayor distribución en el continente. De acuerdo con Maeda-Martínez *et al.*, (2002), en al menos 11 estados del país se han reportado poblaciones de *Artemia* de las cuales sólo seis han sido caracterizadas como *A. franciscana*, lo cual hace necesario llevar a cabo estudios que contribuyan a la caracterización de poblaciones nativas y así contribuir a definir el estado sistemático de este género en México. Algunos trabajos como los de Clark y Bowen (1976) y Bowen *et al.*, (1978), han estudiado el grado de aislamiento reproductivo en algunas poblaciones de *Artemia* empleando cruza fértiles con *Artemia franciscana*. Recientemente, se han empleado herramientas moleculares y citogenéticas, así como experimentos de reproducción para caracterizar poblaciones de diferentes orígenes geográficos comparándolas también respecto a *Artemia franciscana* (Castro *et al.*, 1999; Papeschi *et al.*, 2000; Kappas *et al.*, 2004). Actualmente se estudian las poblaciones de este género en México, por lo que en el presente trabajo se pretende contribuir a la caracterización molecular y citogenética de las poblaciones de *Artemia* de Yavaros, Sonora y Pichilingue, B. C. S. (ambas de México)

experimentando con cruzas recíprocas entre las poblaciones de *Artemia* de Yavaros, Pichilingue y San Francisco, E.U.A., analizando secuencias individuales de ADNmt y análisis citogenéticos (número de cromocentros) para comparar los resultados de tales poblaciones y de los híbridos con *Artemia franciscana*.

2. ANTECEDENTES

A partir de los trabajos de Seale en 1933 y Rollefson en 1939 quienes reportaron el alto valor nutricional de los nauplios de *Artemia* como alimento para peces, se ha incrementado el uso de este branquiópodo, de tal manera que hoy constituyen la base de alimento vivo para muchos estadios tempranos de otras especies como peces y crustáceos (Sorgeloos *et al.*, 1986). Hasta 1960 se aceptaba que todas las poblaciones de este género pertenecían a la especie cosmopolita *Artemia salina* descrita por Linnaeus, 1758. Sin embargo, trabajos posteriores de genética y sistemática realizados por Bowen (1962, 1964), demostraron la existencia de especies hermanas. Belk y Brtek (1995), reportaron nueve especies dentro del género *Artemia* las cuales actualmente son aceptadas como válidas: *Artemia franciscana* Kellogg, 1906 (Canadá, E.U.A, México, e Indias Occidentales), *A. gracilis* Verrill, 1869 (Connecticut, E.U.A.), *A. monica* Verrill, 1869 (Mono Lake, California, E.U.A.), *A. parthenogénica* Bowen y Sterling, 1978 (África, Europa, Asia, y Australia), *A. persimilis* Piccinelli y Prosdocimi, 1968 (Argentina, e Italia), *A. salina* (África, Europa, y Medio Oriente), *A. sinica* Cai, 1989 (China), *A. tunisiana* Bowen y Sterling, 1978 (África, Europa, y Medio Oriente) (probablemente es un sinónimo júnior de *A. salina*), y *A. urmiana* Gunther, 1899 (Lake Urmia, Iran). Estudios citogenéticos y morfológicos indican que *A. franciscana* y *A. persimilis* pueden estar compuestas por especies crípticas (Rodríguez *et al.*, 1998; Cohen *et al.*, 1999; De Los Ríos y Zuñiga, 2000; Mayer, 2002; Torrentera y Abreu, 2002).

Hasta la fecha se han realizado investigaciones empleado análisis de datos genéticos (isoenzimas), citogenéticos (cromosomas y cromocentros), morfológicos y reproductivos (pruebas de fertilidad cruzada), con el fin de aportar información acerca del fenómeno de especiación en poblaciones de *Artemia* (Gajardo y Beardmore, 2001).

Es ampliamente sabido que México debería ser un importante productor de *Artemia* ya que presenta las condiciones biológicas y ecológicas favorables

(Castro *et al.*, 2000). De hecho en México, ha sido registrada la presencia de este branquiópodo, en al menos 29 localidades distribuidas en 11 estados de la Republica (Maeda-Martínez *et al.*, 2002). Sin embargo, como resultado de estudios basados en morfología, isoenzimas y cruza, se ha determinado que sólo seis poblaciones pertenecen a *Artemia franciscana*. Estas poblaciones ocurren en Baja California: (1) San José (Correa-Sandoval y De la Rosa-Vélez, 1996) y (2) San Quintín (Clark y Bowen, 1976; Bowen *et al.*, 1978; Correa y Tapia, 1998); Baja California Sur: (3) Pichilingue (Clark y Bowen, 1976; Bowen *et al.*, 1978); Estado de México: (4) Ecatepec, Texcoco (Castro *et al.*, 2000); Sinaloa: (5) Bahía de Ceuta (Castro *et al.*, 1999) y Sonora: (6) Yavaros (Abreu-Grobois y Beardmore, 1980 y 1989). El resto de las poblaciones (23 localidades) no están apropiadamente caracterizadas y deberían citarse como *Artemia* sp. La diversidad de las formas mexicanas es alta, tal y como lo indican estudios sobre diferenciación citogenética (cromosomas y cromocentros) (Abreu-Grobois y Beardmore, 1989; Torrentera y Abreu-Grobois, 2002), variación de isoenzimas (Abreu-Grobois y Beardmore, 1980; Correa-Sandoval y De la Rosa-Vélez, 1996), morfología (Hontoria y Amat, 1992; Correa y Bückle, 1993; Torrentera y Dodson, 1995), y reproducción (bisexual y partenogenética) (Torrentera y Dodson, 1995). A pesar de que ya ha sido y realizado el mapeo completo del genoma mitocondrial en *Artemia* (Batuecas *et al.*, 1988; Valverde *et al.*, 1994), pocos trabajos han utilizado el ADNmt para entender su diversidad genética (comparación de sitios de variación de genes mitocondriales) y sistemática que permitan conocer el grado de diferenciación intra e inter-específica para alcanzar un entendimiento satisfactorio sobre la sistemática del género.

Una de las poblaciones de *Artemia* más estudiadas en México es la de las salinas de Yavaros. Con base a electroforesis de isoenzimas, Abreu-Grobois y Beardmore (1980) sugirieron que la forma de Yavaros es conespecífica con la de la Bahía de San Francisco (i.e., *A. franciscana*). Más tarde, los mismos autores describieron el cariotipo de la población de Yavaros (citada como *A. franciscana*) con 42 cromosomas (2n), pero con un promedio de 3.90 cromocentros, siendo el número más bajo encontrado dentro de la especie (Abreu-Grobois y Beardmore,

1989). Trabajos posteriores, confirmaron, sobre la base de análisis morfológicos (Longitud: total, abdominal, de la primera antena y de la furca; ancho: de los ovisacos, abdomen y cabeza; diámetro: de ojos; distancia entre ojos y número de setas en las branquias) que la población de Yavaros (junto con poblaciones de Bahía de Ceuta, Pichilingue, San Luis Potosí y Yucatán) pertenece a la especie *Artemia franciscana* (Hontoria y Amat, 1992). Más recientemente, Correa-Sandoval y De la Rosa-Vélez (1996) encontraron una alta variación de isoenzimas en *Artemia* de San José y Yavaros. Castro *et al.*, (1999) estudiaron el patrón reproductivo de poblaciones de *Artemia* de Bahía de Ceuta y Yavaros, y mostraron que todas produjeron híbridos fértiles en cruas recíprocas con *Artemia* de Bahía de San Francisco. Recientemente, se han realizado estudios de diferenciación poblacional mediante técnicas citogenéticas, mostrando que los cromocentros son un rasgo característico confiable y un buen marcador de especiación en *Artemia* (Gajardo *et al.*, 2001).

3. JUSTIFICACIÓN

Ha sido demostrado que los factores físicos y químicos principalmente temperatura y salinidad, son capaces de producir cambios en las características morfométricas entre especies y dentro de especies. Por lo tanto, debido a la similitud de caracteres morfométricos, es claro que el reconocimiento de especies o poblaciones dentro del género *Artemia* no es una labor fácil y como consecuencia, cualquier población dentro de una especie podría mostrar caracteres diferentes. Con base en lo anteriormente señalado, es claro que las poblaciones de *Artemia* de Yavaros y Pichilingue presentan diferencias morfométricas dentro del grupo de Norteamérica, por lo que se requieren de estudios que precisen la información al respecto. Asimismo, es necesario realizar estudios para contribuir a la caracterización de cada una de las poblaciones mexicanas de *Artemia*. Actualmente existe un alto riesgo de recibir un impacto negativo por la introducción y libre circulación (sin medidas de restricción) en el país de una forma exótica comercial así como por la amenaza de modificaciones o destrucciones de los hábitats naturales. Mediante un estudio citogenético y molecular es posible determinar el grado de diferenciación, así como la diversidad de las poblaciones nativas respecto a la especie dominante en América *Artemia franciscana*. Actualmente se conoce que las poblaciones de Yavaros, Pichilingue y Bahía de San Francisco producen híbridos fértiles, sin embargo, el estudio de estas mediante este tipo de aproximaciones aportará información para un mejor entendimiento de dichas poblaciones.

4. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar molecular y citogenéticamente las poblaciones de *Artemia* de Pichilingue, Baja California Sur; Yavaros, Sonora, San Francisco, California E.U.A. e híbridos de sus cruzas recíprocas.

4.1. Objetivos particulares

1. Determinar el número de cromocentros en las tres poblaciones de estudio e híbridos F1 de sus cruzas recíprocas.
2. Identificar sitios de variación en las secuencias del gen 16S ARN ribosomal (ARNr) de las tres poblaciones de estudio e híbridos F1 de sus cruzas recíprocas.
3. Determinar el grado de divergencia genética de las tres poblaciones de estudio e híbridos F1 de sus cruzas recíprocas con base al fragmento del gen 16S ARNr.

5. HIPÓTESIS

Las poblaciones de *Artemia franciscana* de las salinas de Pichilingue, Yavaros y de la bahía de San Francisco son formas citogenética (cromocentros) y genéticamente (haplotipos) diferentes y las secuencias del gen 16S ARNr ADNmt de los híbridos (F1) de cruzas recíprocas entre las tres poblaciones corresponderán a las secuencias del haplotipo de la hembra madre.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Cultivo de *Artemia*

6.1.1. Hidratación y eclosión de quistes de *Artemia*

Se usaron quistes de *Artemia* de las salinas de Yavaros Sonora (YAV) y Pichilingue, B. C. S. (PCH) y de la costa del Pacífico de Bahía de San Francisco, E. U. A. (SFB) (Anexo 1).

Los quistes de *Artemia* de la población de Yavaros y San Francisco fueron tomados de la colección de quistes del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), mientras que la población de *Artemia* de Pichilingue fue obtenida mediante una colecta en la salina ubicada en San Juan Nepomuceno en el puerto de Pichilingue B. C. S. (24° 15'N y 110° 20'W).

El cultivo se llevó a cabo en el periodo de Julio–Septiembre de 2003, utilizando 0.02 g de quistes para cada población. Estos fueron hidratados durante una hora. Posterior a la hidratación se depositaron en un frasco cilíndrico de plástico transparente (8 cm de longitud, 4 cm de diámetro) con los extremos cubiertos por una malla de 100 µm. Cada contenedor fue puesto dentro de un vaso con capacidad de 500 mL con agua de mar filtrada con una salinidad de 35 ‰ con aireación continua. Los vasos se pusieron a baño María dentro de un acuario con capacidad de 80 L y la temperatura del agua a 28 °C. Se colocaron dos lámparas fluorescentes de 40 watts justo arriba del baño de agua con la finalidad de proporcionar luz artificial de una manera continua a los quistes.

6.1.2. Desarrollo del cultivo de las poblaciones de *Artemia* de Yavaros (YAV), Pichilingue (PCH) y San Francisco (SFB)

Los nauplios que eclosionaron, fueron separados de los residuos de los quistes y cada población se cultivó en un tanque cilíndrico con capacidad para 20 L., alimentándolos con una mezcla de microalgas compuesta por *Chaetoceros* sp. e *Isochrysis* sp. Durante el cultivo se realizaron recambios de agua de aproximadamente 1/4 del volumen total cada 48 h, el agua fue tamizada cuidadosamente con mallas individuales de 150 µm para retener a los organismos.

6.2. Cruzas recíprocas

6.2.1. Separación de organismos de cada población por sexo

Aproximadamente a los doce días después de la eclosión de los nauplios, 60 machos y 60 hembras fueron seleccionados azarosamente para cada población con base a las características de dimorfismo sexual fenotípico (penes, ovisacos y segundo par de antenas). Así se mantuvieron bajo observación por 24 h machos y hembras de cada población por separado, evitando copulación entre organismos pertenecientes a la misma población.

6.2.2. Cruzas recíprocas entre poblaciones

Se hicieron cruas recíprocas con los organismos de cada una de las poblaciones de *Artemia* que fueron sexados y fueron cultivados hasta la obtención de los híbridos F1 y F2. Las cruas realizadas con organismos pertenecientes a las poblaciones de Pichilingue B. C. S., Yavaros Son., Méx. y San Francisco E.U.A. fueron de la siguiente manera:

1. ♂ de San Francisco Bay (S. F. B) X ♀ de Pichilingue (PCH)
2. ♀ de San Francisco Bay (S. F. B) X ♂ de Pichilingue (PCH)

3. ♂ de Pichilingue (PCH) X ♀ de Yavaros (YAV)
4. ♀ de Pichilingue (PCH) X ♂ de Yavaros (YAV)

5. ♂ de Yavaros (YAV) X ♀ de San Francisco Bay (SFB)
6. ♀ de Yavaros (YAV) X ♂ de San Francisco Bay (SFB)

6.2.3. Obtención de híbridos

Después del apareamiento recíproco entre poblaciones, se observó descendencia en todas las cruzas (hasta dos generaciones). Por lo que para referirnos a los híbridos F1 será del siguiente modo:

- C1 ♂ de San Francisco Bay (S. F. B) X ♀ de Pichilingue (PCH)
- C2 ♀ de San Francisco Bay (S. F. B) X ♂ de Pichilingue (PCH)
- C3 ♂ de Pichilingue (PCH) X ♀ de Yavaros (YAV)
- C4 ♀ de Pichilingue (PCH) X ♂ de Yavaros (YAV)
- C5 ♂ de Yavaros (YAV) X ♀ de San Francisco Bay (SFB)
- C6 ♀ de Yavaros (YAV) X ♂ de San Francisco Bay (SFB)

Los organismos fueron fijados en alcohol Etílico al 100 %, para análisis de ADN y posteriormente se conservaron a 4 °C.

6.3. Citogenética

6.3.1. Obtención de nauplios para análisis citogenéticos (para observar cromocentros)

Para el estudio citogenético se cultivó *Artemia* de las tres poblaciones ya mencionadas, siguiendo el protocolo de cultivo y las mismas condiciones que se detallan en el cultivo anterior. Cabe mencionar que los quistes fueron

descapsulados aplicando la técnica descrita en Bengtson *et al.*, (1991) y puestos a eclosionar con la finalidad de obtener nauplios (12 - 24 h) a los cuales se les aplicó el método para el estudio de cromocentros descrito por Barigozzi *et al.*, (1984), Abreu-Grobois *et al.*, (1989) y Gajardo *et al.*, (2001), con algunas modificaciones menores. Los organismos colocaron en solución hipotónica por 1 h aproximadamente a 28 – 30 °C. Una vez transcurrido el tiempo se fijaron en una solución compuesta de metanol y ácido acético glacial 1:1. Posterior a esto, los organismos se preservaron dentro de un tubo Eppendorf® de 1.7 mL en un cuarto frío a 4 °C para conservarlos en buen estado hasta que las muestras fueron procesadas. Los nauplios fueron transferidos individualmente en un tubo eppendorf® y se agregó ácido acético al 60 %. Se dejaron reposar en baño María con agua a 45-60 °C durante 3 - 5 min hasta observar la disociación de los organismos. Después la solución (células del nauplio disociadas) se vertió en un porta objetos dejándola secar al aire.

6.3.2. Tinción de laminillas

Posteriormente al secado, la preparación se tiñó con el colorante orceína al 0.5 % y ácido acético al 45 %, el tiempo de tinción fue de aproximadamente de 3 - 4 min lavando el exceso del colorante con agua corriente y por último las muestras se enjuagaron con agua destilada, dejándolas secar al aire. Los núcleos fueron observados con un microscopio Olympus Bx41 a 40 X, adaptándole un intercambiador de aumento y una cámara digital a color Hitachi KP - D50. La documentación de imágenes se realizó con el programa Photo editor.

6.4. Genética

6.4.1. Disección de *Artemia*

Los ejemplares que se fijaron durante el cultivo, fueron disectados, retirando gran parte del exoesqueleto, se removió la cutícula dorsal y el tracto digestivo evitando romperlo, con la finalidad de no provocar problemas de contaminación del músculo. Posterior a esto, se retiraron exopoditos, endopoditos y parte de los 11 pares de toracópodos (órganos respiratorios), tratando de conservar la mayor parte del músculo limpio. La disección de cada uno de los organismos se llevó a cabo en una caja Petri pequeña, en donde el ejemplar a disectar siempre estuvo cubierto con alcohol al 90 % para evitar la desecación. Los organismos disectados, fueron preservados en alcohol al 100 % dentro de un tubo Eppendorf® y conservados en 4°C.

6.4.2. Extracción de ADN total (ADNt) a partir de adultos de *Artemia*

Posterior a la disección de organismos, el ADN se extrajo desde el músculo mediante el Kit comercial Puregene de Gentra systems. El alcohol fue retirado del músculo disectado y se lavó con TE pH 7.5 (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0), posteriormente la muestra fue transferida a un tubo Eppendorf® esterilizado, adicionando 200 µL de solución para lisis celular y 1µL de proteinasa K (20 mg/mL) para degradar las proteínas, la muestra se incubó en baño María (Precision, modelo 180) a 65 °C por dos intervalos de 15 min. Entre cada intervalo se empleó una lisis celular de tipo mecánica con la ayuda de un pistilo de vidrio estéril. La muestra fue enfriada a temperatura ambiente y posteriormente se adicionó 0.5 µL de ARNasa y se incubó en baño María (Precision, modelo 182) a 37 °C durante dos lapsos de tiempo de 15 min agitando la muestra entre cada intervalo. Se agregaron 65 µL de solución precipitadora de proteínas se incubó a -20 °C hasta que se mostrara turbia (5 - 10 min). Transcurrido este tiempo, se

centrifugó a 20 °C a de 15 000 rpm durante 3 min (microcentrífuga RF therma IEC) y se recuperó el sobrenadante en un tubo Eppendorf®. Se agregaron 300 µL de isopropanol al 100 % y 0.5 µL de glicógeno (20 mg/mL) y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 45 min. Posteriormente se centrifugó a 15 000 rpm durante 5 min a 20 °C. Se vació el sobrenadante cuidadosamente observando la pastilla con ADN en el fondo del tubo. Se lavó el ADN adicionando 500 µL de etanol frío al 70 % (conservado a - 20 °C). Se centrifugó a 15 000 rpm durante 5 min a una temperatura de 20 °C, finalmente se retiró el sobrenadante y se dejó secar la pastilla de ADN a temperatura ambiente para posteriormente hidratarlo en TE (pH 7.5) y conservarlo en refrigeración a - 20 °C.

6.4.3. Extracción de ADN total (ADNt) a partir de quistes de *Artemia*

A partir de quistes, se extrajo ADNt mediante la técnica de Chelex® 100 (Molecular Biology). Para ello fue necesario hidratar los quistes de una a dos horas, posteriormente se aplicó la técnica de descapsulación descrita en Bengston *et al.*, (1991). Este proceso incluye hidratación en lapsos de una a dos horas, seguido por un tratamiento con hipoclorito al 6 % para remover el corion. Posteriormente se lavaron los quistes con agua destilada cuatro veces para eliminar el hipoclorito. Posterior a la descapsulación, el quiste fue macerado y se adicionó 60 – 65 µL de Chelex® al 5 % y 0.5 µL de proteinasa k (20 mg/mL). La muestra fue incubada a baño María (65 °C) por dos lapsos de tiempo de 15 min (agitando entre cada lapso). Posteriormente, se incubó en baño María a temperatura de ebullición (9 min aprox.) y fue centrifugada a 10 000 rpm durante 3 min a 20 - 25 °C. Finalmente, el sobrenadante fue recuperado y conservado a -20 °C.

6.4.4. Amplificación del fragmento del gen 16S de ADNmt mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Una vez que se realizó la extracción del ADN total (ADNt), se preparó la mezcla maestra “mezcla de PCR” agregando 5 μ L de Buffer 10X (Tris - HCl, pH 8.3, MgCl₂, KCl, NP - 40 Tritón X 100, 15 mM MgCl₂), 100 μ M de desoxinucleotidos trifosfatos (dNTPs: dATP, dGTP, dTTP y dCTP), 100 pMol de iniciadores “primers” Forward 16Sar: 5' - CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT y Reverse 16Sbr 5' - CCG GCT TGA ACT CAG ACT ACG (Palumbi *et al.*, 1991), Taq polimerasa (1 Unidad) (life technology) y agua destilada esteril (H₂O bd) y se mezcló con ADNt como templado. Para amplificar la región del gen 16S, el volumen final de la mezcla de reacción fue de 50 μ L. Las muestras se amplificaron por PCR en un termociclador Techne Genius con bloque de tubos intercambiables. El programa utilizado fue: desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min y 40 ciclos de: desnaturalización 94 °C por 30 s alineación 50 °C por 30 s extensión 72 °C durante 1 min y una extensión final por 5 min a 72 °C.

6.4.5. Electroforesis en gel de agarosa

Se preparó un gel con agarosa a una concentración de 0.8 % en solución Buffer TBE 1X (Tris, ácido bórico y EDTA pH 8.0) dentro de un horno de microondas adicionando 1.2 μ L de bromuro de etidio (EtBr). Posterior a la solidificación, el gel fue sumergido dentro de una cámara (Bio - Rad) con solución buffer TBE 1X. Por otro lado se tomaron 4 μ L del ADN amplificado y se mezcló con 1.5 μ L de Buffer de carga “loading buffer” (azul de bromofenol 0.25%, sacarosa 40% o glicerol 30%). La solución se vertió dentro de los pozos del gel (dentro de la cámara con buffer) y la electroforesis se realizó a 70 Voltios durante aproximadamente 45 min y posteriormente el ADN fue observado mediante un foto

- documentador (cámara polaroid para la foto documentación del ADN, fuente de luz UV), en el cual fue posible documentar el producto final de la electroforesis.

6.4.6. Purificación del producto de PCR (de solución)

Se realizó el método de purificación (GFX PCR ADN, Amersham Pharmacia Biotec inc.). Se ensambló un tubo colector con una columna y posteriormente se adicionó un buffer de captura "Capture Buffer" (buffer con acetato de amonio y caotrope). Inmediatamente se transfirió el producto amplificado (50 μ L) dentro de la columna mezclando cinco veces y fue centrifugado la muestra a 15 000 rpm durante 30 s a 20 °C. Se procedió a lavar al ADN con Buffer de lavado "Wash buffer" (tris – HCL 10 mM y pH 8.0, 1 Mm EDTA y etanol 100%) y se centrifugó a 15 000 rpm durante 30 s a 20 °C. La columna se separó del colector y fue ensamblada a un tubo Eppendorf®, por último, se agregó 60 μ L de agua destilada esterilizada (deionizada), se incubó la muestra (1 min) a temperatura ambiente, para centrifugar a 15 000 rpm durante 1 min a 25 °C. De esta manera el ADN purificado fue recuperado y conservado a - 20 °C hasta su cuantificación.

6.4.7. Purificación del producto del PCR (a partir de bandas del gel)

Alternativamente al método de purificación por columnas, se empleó el método de purificación cortando bandas de gel de agarosa. Para ello, se aplicó una electroforesis con gel de agarosa preparado con buffer TAE IX (Tris, ácido acético glacial y EDTA pH 8.0) al producto de PCR (gen amplificado). Para realizar el corte de las bandas (producto de PCR ó gen amplificado), el gel se colocó sobre la base de un transiluminador con luz UV (UVP inc). Cada banda se depositó en un tubo eppendorf® de 1.5 mL (previamente pesado y etiquetado). Posteriormente, se pesaron los tubos con las bandas de gel y fue calculado el peso de la banda. Se agregó 10 μ L de buffer de captura por cada 10 mg de gel, la muestra fue agitada e incubada a baño María a 60 °C hasta disolver la agarosa (10 - 15 min).

Se centrifugó la muestra a 15 000 rpm de 3 - 6 s (pulso). La agarosa líquida se vertió en el tubo columna y fue centrifugada a 15 000 rpm durante 30 s. Fue descartado el líquido contenido en el tubo colector (producto de la centrifugación) y se ensamblaron nuevamente el tubo columna y colector. Se adicionó 300 - 450 µL de buffer de lavado y la muestra fue centrifugada a 15 000 rpm durante 30 s. El tubo columna fue depositado en un tubo Eppendorf® de 1.5 mL y se adicionaron 40 - 60 µL de agua directamente en la membrana del tubo columna. Se incubó durante 1 min a temperatura ambiente y fue centrifugado a 15 000 rpm. Finalmente se retiró la columna del tubo eppendorf® y de esta manera, el ADN purificado se conservó en congelación a temperatura de - 20 °C.

6.4.8. Preparación de muestras para secuenciación

Fueron etiquetados con Bigdye 50 - 100 ng del producto purificado de PCR y de este modo secuenciados con un analizador genético ABI prism® 310.

6.4.9. Procesamiento de datos

Los cromocentros fueron analizados en cinco nauplios por población e híbridos y se observaron 100 células por nauplio. La estadística descriptiva, ANOVAS, MANOVAS así como el grado de agrupamiento se realizó con el paquete Statistica 6.0. El análisis de agrupamiento está basado en la distancia euclidiana (*i.e.* distancia geométrica actual o disimilitud entre el número de cromocentros en un espacio multidimensional).

Para el gen 16S ARNr se obtuvieron las secuencias del gen usando el iniciador Forward 16Sar: 5' - CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT (en un sólo sentido). La edición y alineamiento de secuencias se realizó con los paquetes

Chromas 1.45, 32 - bit, McCarthy (1996 - 1998), ESEE 3.2 (Eyeball SEquence Editor) (Cabot, 1998) y MEGA 2.1 (Kumar *et al.*, 2001) versión para Windows. Se utilizó como referencia el genoma mitocondrial de *Artemia franciscana* con clave de acceso X69067, así como dos fragmentos homólogos del gen 16S con número de acceso AY327247 y X12965 depositados en el Gen Bank.

Los fragmentos editados del gen 16S ARNr se usaron para realizar un diagrama de árbol basado en el método de agrupamiento de la media aritmética no ponderada, UPGMA (por sus siglas en Inglés: Unweighted pair group method with arithmetic mean), considerando la diferencia de pares de bases (mutación) dentro de la distancia del parámetro de Kimura – 2.

7. RESULTADOS

7.1. Análisis estadísticos de cromocentros en poblaciones de *Artemia*

7.1.1. Estadística descriptiva y prueba de normalidad (K - S)

Después de aplicar el método de Barigozzi *et al.*, (1984) para observar cromocentros, se obtuvieron datos citogenéticos mediante la disociación y tinción de células (Anexo 2).

Se determinó el número promedio de cromocentros por nauplio para cada población. El rango de valores promedio observado para la población SFB es 12.7 – 13.9. En cambio, la población PCH presenta el rango 11.1 – 13.5. El valor máximo de desviación estándar (SD) fue de 3.4 en ambas poblaciones. Sin embargo, la población YAV presenta el rango promedio más bajo 3 - 3.2 con un valor máximo de SD de 1.4. Los resultados de la prueba de bondad de ajuste de Kolmogorov – Smirnov (K - S), indican que los datos presentan una distribución normal $P > 0.05$ para las tres poblaciones (Tabla 1).

Tabla 1. Valores promedio de cromocentros por nauplio.

Nauplio	SFB		PCH		YAV		(K - S)
	Media	SD	Media	SD	Media	SD	
1	13.96	± 2.30	11.17	± 2.51	3.08	± 0.96	P = 0.2*
2	13.99	± 2.26	12.45	± 3.46	3.18	± 1.13	
3	13.36	± 3.24	13.57	± 2.93	3.10	± 1.09	
4	12.78	± 3.48	12.47	± 3.28	3.26	± 1.42	
5	13.81	± 2.73	11.23	± 2.42	2.83	± 1.03	

SFB (San Francisco), PCH (Pichilingue) y YAV (Yavaros).

* el valor de P es el mismo para todos los nauplios

En la Tabla 2, se muestran valores de estadística descriptiva obtenidos a partir de los datos observados por población.

Los valores de cromocentros más altos se presentan en las poblaciones SFB y PCH. Asimismo, estas poblaciones presentan valores de tendencia central parecidos y la variación es mínima cuando se compara citogenéticamente. Sin embargo, los valores mínimos de cromocentros se presentan en la población YAV y la diferencia más alta resulta de la comparación de YAV respecto a SFB y/o PCH.

La población YAV presenta valores de tendencia central más estables y los valores de desviación estándar indican que existe más variación dentro de las poblaciones SFB y PCH respecto a la población YAV (Tabla 2).

Tabla 2. Medidas de tendencia central de cromocentros por población.

Poblaciones	Media	Mediana	Moda	SD
SFB	13.5	14	14	± 2.8
PCH	12.1	13	14	± 3.0
YAV	3.0	3	3	± 1.1

SFB (San Francisco), PCH (Pichilingue) y YAV (Yavaros).

Debido a los valores de probabilidad obtenidos de la prueba K-S mostrados en la Tabla 1, se realizó el análisis de variancia de una vía (ANOVA) entre poblaciones (Tabla 3).

Tabla 3. Análisis de cromocentros en poblaciones de *Artemia* con ANOVA de una vía

	MS EFECTO	MS ERROR	G. L.	F	P
Variable:					
Cromocentros	162.1936	0.430685	2	376.5949	0.000000

Los resultados de la prueba de ANOVA mostrados en la Tabla 3, indican que existen diferencias significativas entre poblaciones con base al número de cromocentros, puesto que el valor de probabilidad es altamente significativo ($P < 0.000000$). Posterior a este análisis, se realizó la prueba de comparaciones

múltiples de Tukey (Zar, 1999) con la finalidad de evaluar estadísticamente cuáles poblaciones difieren entre sí.

7.1.2. Prueba de comparaciones múltiples entre el número de cromocentros de poblaciones de *Artemia* (Tukey)

Los resultados obtenidos mediante la prueba a *posteriori* a un nivel de significancia de 0.05, corroboran que existen diferencias significativas entre las tres poblaciones de *Artemia* en cuanto al número de cromocentros.

Se presentan diferencias significativas ($P = 0.000190$) entre la población YAV respecto a SFB y/o PCH. Asimismo, la comparación de SFB y PCH presentó diferencias significativas ($p = 0.014197$) (Tabla 4).

Tabla 4. Prueba de comparaciones múltiples de Tukey entre el número de cromocentros de poblaciones de *Artemia*.

Poblaciones	SFB	PCH	YAV
Media	13.58	12.17	3.08

SFB		
PCH	0.014197	
YAV	0.000190	0.000190

SFB (San Francisco), PCH (Pichilingue) y YAV (Yavaros).

7.1.3. Diagrama de cajas

Los datos de cromocentros de las poblaciones SFB, PCH y YAV, fueron analizados mediante un diagrama de cajas con base a la mediana, considerando que ésta es menos susceptible a cambiar por los valores máximos y mínimos (Figura 1).

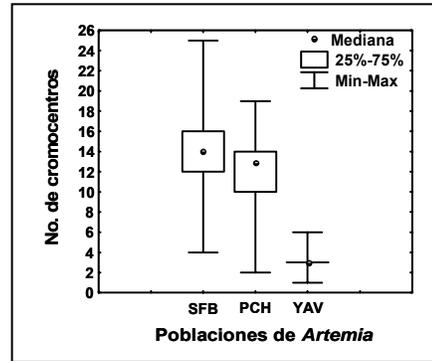


Figura 1. Estadística descriptiva de cromocentros en tres poblaciones de *Artemia*.

Los valores de mediana son similares entre SFB y PCH (14 y 13 respectivamente), sin embargo, la distribución del 50% de los valores (indicada por el rango intercuartilar) se desfasa entre estas poblaciones. En cambio, la población YAV es la que presenta mayor diferencia de mediana y no presenta rango intercuartilar).

7.1.4. Diagrama de árbol

Con los valores observados de cromocentros, se realizó un diagrama de árbol basado en la distancia euclidiana que muestra dos grupos (línea de corte) (Figura 2):

El grupo A, formado por la población SFB y PCH (valores de tendencia central similares) y el grupo B, formado por la población YAV que se caracteriza como una población diferente de SFB y PCH.

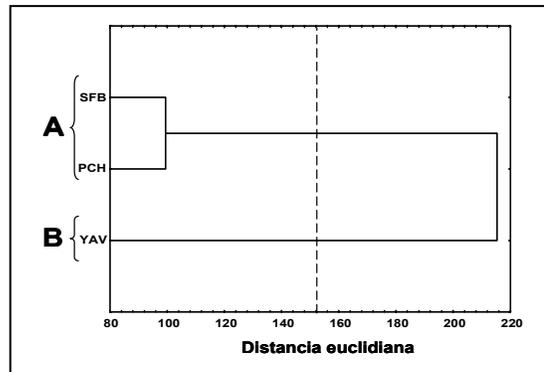


Figura 2. Agrupaciones de tres poblaciones de *Artemia* basadas en el número de cromocentros.

7.2. Análisis estadísticos de cromocentros en híbridos

7.2.1. Estadística descriptiva, prueba de normalidad y ANOVA

Los datos de cromocentros en híbridos (producto de las cruzas entre las tres poblaciones de *Artemia*), fueron estadísticamente explorados del mismo modo en que se analizó a las poblaciones de *Artemia*.

El rango promedio de cromocentros observado para los híbridos C1 (♂ SFB x ♀ PCH) es $13.2 - 13.8 \pm 2.92$ y los híbridos C2 (♀ SFB x ♂ PCH) presentan un rango promedio de cromocentros $11.6 - 12.8 \pm 3.08$.

El rango promedio de cromocentros observado en los híbridos C3 (♂ PCH x ♀ YAV) es $11.5 - 15.6 \pm 4.44$ y en los híbridos C4 (♀ PCH x ♂ YAV) se observa $11.5 - 13.1 \pm 3.78$.

Los híbridos C5 (♂ YAV x ♀ SFB) presentan un rango $11.7 - 13.2 \pm 3.84$ y en los híbridos C6 (♀ YAV x ♂ SFB) es $10.8 - 13.1 \pm 4.85$.

Los resultados de la prueba de bondad de ajuste indican que los datos obtenidos, presentan una distribución normal en todos los casos ($P > 0.05$) prueba K - S de normalidad (Tabla 5).

Tabla 5. Valores promedio de cromocentros por híbridos producidos en laboratorio.

C1	C2	C3	C4	C5	C6	K - S
♂SFB x ♀PCH	♀SFB x ♂PCH	♂PCH x ♀YAV	♀PCH x ♂YAV	♂YAV x ♀SFB	♀YAV x ♂SFB	
13.2 ± 2.59	12.8 ± 2.87	12.6 ± 2.73	12.7 ± 3.78	13.2 ± 3.84	13.2 ± 3.33	
13.6 ± 2.92	11.6 ± 2.70	11.5 ± 2.77	12.7 ± 2.72	12.3 ± 3.00	12.8 ± 3.23	
13.8 ± 2.60	12.3 ± 2.69	12.9 ± 3.22	11.5 ± 2.80	12.2 ± 3.11	11.9 ± 2.92	p = 0.2
13.1 ± 2.47	12.7 ± 3.08	15.6 ± 4.44	13.1 ± 3.33	11.8 ± 3.44	10.9 ± 2.63	
13.2 ± 2.46	12.2 ± 2.75	11.9 ± 2.79	12.1 ± 2.77	12.0 ± 3.00	12.2 ± 4.85	

SFB (San Francisco), PCH (Pichilingue) y YAV (Yavaros).

La Tabla 6 muestra valores de estadística descriptiva obtenidos a partir de los datos observados con los cuales se obtuvo el promedio general de cromocentros para representar a los híbridos.

Tabla 6. Estadística descriptiva de cromocentros en híbridos de *Artemia* producidos en laboratorio.

Cruza (F1).	Media	Mediana	Moda	SD.	Min.	Max.
C1. ♂ SFB x ♀ PCH	13.3	13	13	2.61	8	23
C2. ♀ SFB x ♂ PCH	12.3	12	12	2.84	8	25
C3. ♂ PCH x ♀ YAV	12.8	12	11, 12	3.53	7	27
C4. ♀ PCH x ♂ YAV	12.3	12	12	3.14	7	27
C5. ♂ YAV x ♀ SFB	12.3	12	10	3.31	7	25
C6. ♀ YAV x ♂ SFB	12.1	12	11	3.16	7	26

SFB (San Francisco), PCH (Pichilingue) y YAV (Yavaros).

Los híbridos C1 (♂SFB x ♀ PCH), presentan los valores máximos de cromocentros promedio 13.3 ± 2.61 y muestra valores de mediana y moda = 13. Los híbridos C2 - C6 son más parecidos con base a los valores de media y mediana. Sin embargo, se observa mayor heterogeneidad en los valores modales, característica distintiva de los híbridos C3 (♂ PCH x ♀ YAV) con dos modas (11 y 12), asimismo, esta cruce presenta el valor máximo de desviación estándar. La cruce C5 (♂ YAV x ♀ SFB) presenta el valor modal más bajo.

El análisis de variancia de una vía (ANOVA) se llevó a cabo con un nivel de significancia de 0.05 para comparar las medias de los híbridos. Sin embargo, los resultados obtenidos indican que no existen diferencias significativas entre los promedios de cromocentros de híbridos ($P > 0.05$).

Tabla 7. Análisis de variancia de una vía en híbridos de *Artemia* con base al número de cromocentros.

	MS	MS	G. L.	F	P
	EFFECTO	ERROR			
Variable:					
Cromocentros	1.069595	0.71584	5	1.494182	0.228776

7.2.3. Diagrama de cajas

Mediante el diagrama de cajas es posible mostrar la heterogeneidad en los valores observados (máximos y mínimos) entre híbridos. Sin embargo de las seis cruzas realizadas, sólo se presentan tres valores diferentes de mediana en donde se distingue la cruza C1 con el valor de mediana = 13 (valor máximo), mientras que las cruzas C2 y C3 presentan valores de mediana = 12 y las cruzas C4, C5 y C6 muestran los valores de mediana = 11 (valores mínimos) (Tabla 4, Figura 3).

De acuerdo a los cuartiles, los híbridos C1 (♂ SFB x ♀ PCH) se distinguen por que presenta el rango intercuartilar mas bajo (50% de los valores observados está representado por el rango de 12 – 15 cromocentros). De modo contrario, el rango intercuartilar mas alto se presenta en los híbridos C3 (♂ PCH x ♀ YAV) (Figura 3).

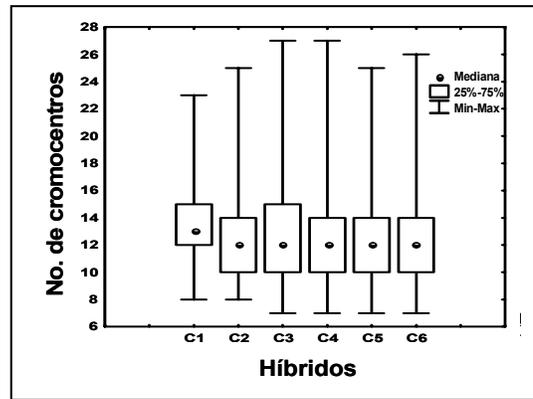


Figura 3. Variación en el número de cromocentros en híbridos de *Artemia*. C1 (♂ SFB x ♀ PCH) C2 (♀ SFB x ♂ PCH) C3 (♂ PCH x ♀ YAV) C4 (♀ PCH x ♂ YAV) C5 (♂ YAV x ♀ SFB) C6 (♀ YAV x ♂ SFB).

7.2.4. Diagrama de árbol

Del mismo modo en que fueron analizados los datos de cromocentros en las tres poblaciones de *Artemia*, se ha realizado un diagrama de árbol para los híbridos C1 - C6 y se observan cuatro grupos bien definidos (ver línea de corte) (Figura 4).

1) Este grupo es el más externo y diferenciado, esta separación de los híbridos C3 (♂ PCH x ♀ YAV) concuerda con la diferenciación a partir de los cuartiles (50% de los valores representados por el rango 10 – 15 cromocentros) y a partir de los valores modales (11 y 12).

2) Los híbridos C5 (♂ YAV x ♀ SFB) que presentaron el valor modal más bajo (moda = 10).

3) La cruce C6 que forma un grupo con un valor modal “intermedio” moda = 11.

4) La agrupación más grande, formada por los híbridos C1, C2 y C4, ya que éstos son muy similares en cuanto a los valores modales más altos (13, 12).

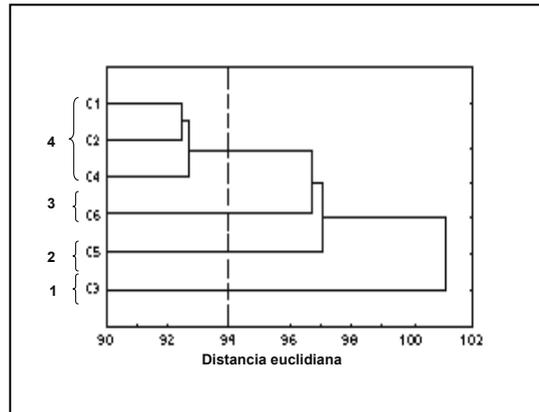


Figura 4. Agrupaciones en híbridos de *Artemia* basadas en el número de cromocentros. C1 (♂ SFB x ♀PCH), C2 (♀ SFB x ♂ PCH), C3 (♂ PCH x ♀ YAV), C4 (♀ PCH x ♂ YAV), C5 (♂ YAV x ♀ SFB) y C6 (♀ YAV x ♂ SFB).

7.2.5. Comparación de poblaciones de *Artemia* vs. híbridos

Para comparar las observaciones de cromocentros de cada población (SFB, PCH y YAV) respecto a los híbridos obtenidos en el laboratorio (híbridos C1: ♂ SFB x ♀ PCH, C2: ♀ SFB x ♂ PCH, C3: ♂ PCH x ♀ YAV, C4: ♀ PCH x ♂ YAV, C5: ♂ YAV x ♀ SFB, C6: ♀ YAV x ♂ SFB) fue necesario realizar el análisis de variancia de una vía a un nivel de significancia de 0.05, los resultados muestran que existe diferencia significativa $P < 0.05$ (Tabla 8).

Tabla 8. Análisis de variancia (ANOVA) entre poblaciones de *Artemia* e híbridos producidos en laboratorio.

	MS EFECTO	MS ERROR	G. L.	F	P
Variable:					
Cromocentros	52.14398	0.620788	8	83.99641	0.000000

De acuerdo a los resultados del ANOVA, las poblaciones fueron comparadas respecto a cada híbrido mediante la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

La comparación de SFB respecto PCH no muestra diferencias significativas. Asimismo, estas poblaciones no presentaron diferencias significativas respecto a los híbridos. Sin embargo la población YAV si presentó diferencias significativas de las poblaciones (SFB y PCH) y de los híbridos (C1 – C6) $P < 0.05$ (Tabla 9).

Tabla 9. Prueba de comparaciones múltiples de Tukey entre poblaciones de *Artemia* e híbridos producidos en laboratorio.

	SFB	PCH	YAV	C1	C2	C3	C4	C5	C6
MEDIA	13.58	12.17	3.08	13.37	12.31	12.88	12.39	12.3	12.16
SFB									
PCH	0.146689								
YAV	0.000140	0.000140							
C1	0.999969	0.316673	0.000140						
C2	0.247363	0.999999	0.000140	0.474519					
C3	0.890251	0.885568	0.000140	0.985160	0.963720				
C4	0.322940	0.999961	0.000140	0.574916	1.000000	0.985160			
C5	0.242093	0.999999	0.000140	0.466987	1.000000	0.961452	1.000000		
C6	0.139641	1.000000	0.000140	0.304362	0.999998	0.875857	0.999941	0.999998	

C1 (♂ SFB x ♀ PCH), C2 (♀ SFB x ♂ PCH), C3 (♂ PCH x ♀ YAV), C4 (♀ PCH x ♂ YAV)
 C5 (♂ YAV x SFB), C6 (♀ YAV x ♂ SFB).

7.2.6. Diagrama de árbol

Después de organizar la matriz de datos, la cual incluye tanto a las tres poblaciones de *Artemia* (YAV, SFB y PCH) como los seis híbridos (C1, C2, C3, C4, C5 y C6), se realizó un diagrama de árbol en el cual se observan sólo dos grupos (Figura 5).

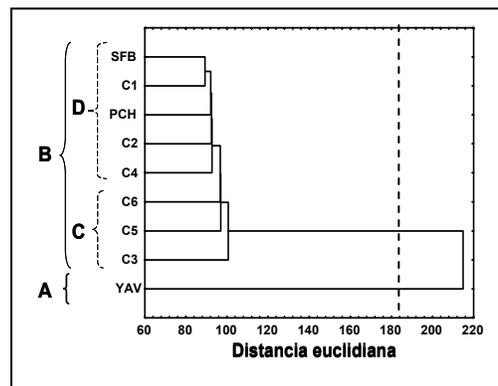


Figura 5. Análisis de agrupamiento de tres poblaciones de *Artemia* y sus híbridos. A, B = Grupos; C y D = Subgrupos.

Las poblaciones SFB y YAV se encuentran en grupos opuestos, de modo que la *Artemia* de la población de YAV forma el grupo A, debido a que presenta valores de cromocentros muy bajos. El grupo más grande es el B, está conformado por las poblaciones SFB y PCH así como de los seis híbridos realizados (C1 - C6). Estas agrupaciones concuerdan con los resultados de la prueba de Tukey que no mostró diferencias significativas. Sin embargo, es importante señalar que dentro del grupo B, pueden distinguirse fácilmente dos subgrupos:

El subgrupo C está formado sólo con los híbridos C3, C5 y C6 que presentan valores mínimos de moda mientras que el subgrupo D, se forma por las poblaciones PCH, SFB y las cruzas C1, C2 y C4 quienes presentan valores máximos de mediana.

7.3. Análisis de ADN

El fragmento del gen (editado) que se obtuvo fue de 477 pares de bases de longitud (Anexos 3 - 5).

En la Tabla 10 se proporciona información sobre el número de machos y hembras pertenecientes a cada población de *Artemia* así como de los híbridos analizados.

Tabla 10. Número de individuos por sexo utilizados para el análisis del gen 16S ADNmt.

Población de <i>Artemia</i> .	Sexo	
	♂	♀
San. Francisco (SFB)	1	
Pichilingue (PCH)	3	4
Yavaros (YAV)	3	4
F1 ♂ YAV ♀ PCH (C3)	3	3
F1 ♀ YAV ♂ PCH (C4)	1	1
F1 ♂ YAV ♀ SFB (C5)	1	1
F1 ♀ YAV ♂ SFB (C6)	1	1

7.3.1. Comparación de secuencias entre poblaciones

Comparaciones de secuencias dentro de poblaciones, mostraron que hembras y machos presentan un mismo haplotipo. Sin embargo, el resultado de la comparación de secuencias entre poblaciones mostró cinco sitios de variables dentro del fragmento del gen analizado. Al respecto, se observó que la población SFB (analizada en este estudio) es idéntica a los fragmentos de referencia AY327247 y X12965.

Posteriormente se realizó la comparación de la secuencia de SFB vs. PCH y el resultado mostró tres bases diferentes en los sitios: 248 (G → T), 261 (C → T) y 332 (T → C). Asimismo, cuando se compararon las secuencias de la

población SFB vs. YAV, se observaron cuatro sitios de variación en las posiciones 218 (C → T), 248 (G → T), 304 (A → G) y 332 (T → C).

La comparación de secuencias entre poblaciones mexicanas (PCH vs. YAV), mostró tres sitios variables dentro del fragmento analizado, en los sitios 218 (C → T), 261 (T → C) y 304 (A → G). Asimismo ambas poblaciones presentan dos bases comunes entre sí (248, T y 332, C), pero diferente de los genes de referencia (Tabla 11).

Tabla 11. Sitios de variación en la secuencia del gen 16S ARNr entre poblaciones de *Artemia*.

Población	Posición				
	218	248	261	304	332
SFB (referencia)	C	G	C	A	T
♂ SFB
♂-♀ YAV	T	T	.	G	C
♂-♀ PCH	.	T	T	.	C

7.3.2. Comparación de secuencias entre híbridos

El primer análisis consistió de la comparación de secuencias de machos y hembras (dentro de cruza), los resultados al respecto, mostraron que existe un sólo haplotipo; es decir, con base al fragmento del gen 16S analizado, machos y hembras son idénticos. Posteriormente, se realizaron comparaciones entre híbridos (C3 - C6) y de manera análoga a las poblaciones, los resultados mostraron cinco sitios variables dentro del fragmento del gen analizado.

No se observaron sitios de variación de los híbridos C3 (♂ PCH x ♀ YAV) vs. C6 (♀ YAV x ♂ SFB), sin embargo éstas, difieren de C5 (♂ YAV x ♀ SFB) en las posiciones 218, 248, 304 y 332.

De manera similar, fueron comparadas las secuencias de los híbridos C4 (♀ PCH x ♂ YAV) vs. C3 y C6, los resultados indicaron que existen tres sitios de

variación en las posiciones 218, 261 y 304 dentro del fragmento analizado. La comparación de la cruce C4 (♀ PCH x ♂ YAV) vs. C5 (♂ YAV x ♀ SFB), mostraron que existen tres sitios de variación en las posiciones 248, 261 y 332 (Tabla 12).

Tabla 12. Sitios de variación del fragmento del gen 16S ARNr entre híbridos (C4 - C6).

Población y cruces	Posición				
	218	248	261	304	332
SFB (fragmento de referencia)	C	G	C	A	T
♂-♀ F1, ♂ YAV x ♀ SFB (C5)
♂-♀ F1, ♀ PCH x ♂ YAV (C4)	.	T	T	.	C
♂-♀ F1, ♂ PCH x ♀ YAV (C3)	T	T	.	G	C
♂-♀ F1, ♀ YAV x ♂ SFB (C6)	T	T	.	G	C

7.3.3. Comparación de secuencias entre poblaciones e híbridos

La secuencia de la población SFB y los híbridos C5 (♂ YAV x ♀ SFB), son genéticamente iguales a los fragmentos del gen 16 S AY327247 y X12965 usados como referencia (no se observan sitios de variación). De modo similar, se observó que las secuencias de PCH vs. C4 (♀ PCH x ♂ YAV) son iguales. Asimismo, las secuencias de la población YAV y los híbridos C3 (♂ PCH x ♀ YAV) y C6 (♀ YAV x ♂ SFB), son iguales (Tabla 13).

Tabla 13. Sitios de variación en la secuencia del gen 16S ARNr entre poblaciones e híbridos de *Artemia*.

Población y cruza SFB (fragmento de referencia)	Posición				
	218 C	248 G	261 C	304 A	332 T
♂ SFB
♂-♀ F1, ♂ YAV x ♀ SFB (C5)
♂-♀ YAV	T	T	.	G	C
♂-♀ F1, ♂ PCH x ♀ YAV (C3)	T	T	.	G	C
♂-♀ F1, ♀ YAV x ♂ SFB (C6)	T	T	.	G	C
♂-♀ PCH	.	T	T	.	C
♂-♀ F1 ♀ PCH x ♂ YAV (C4)	.	T	T	.	C

San Francisco Bay (SFB), Yavaros (YAV), Pichilingue (PCH) y F1 (híbridos).

De modo general, después del alineamiento de las secuencias de los 27 organismos, se observó que las secuencias analizadas, se encuentran entre las posiciones 12177 a 12652 dentro del genoma mitocondrial del crustáceo *Artemia franciscana* (X69067).

7.3.4. Distancia genética parámetro de Kimura - 2

7.3.5. Distancia genética entre poblaciones

Las secuencias del gen 16S ARNr fueron usadas para obtener la distancia genética usando el programa MEGA versión 2.1 (Kumar *et al.*, 2001). Los resultados indican que los valores de distancia oscilan en un rango de 0 a 0.008 (Tabla 14). El valor de distancia entre la población SFB respecto a los genes de referencia es 0 (secuencias 100 % iguales). La distancia genética de la población PCH respecto a SFB fue de 0.006. Sin embargo, la comparación de la población YAV respecto a SFB presentó el máximo valor de distancia 0.008.

7.3.6. Distancia genética entre híbridos

Los valores de distancia observados entre híbridos oscilan en el rango de 0 a 0.008 (Tabla 14). La distancia mínima se observó entre los híbridos C6 (♀ YAV x ♂ SFB) y C3 (♂ PCH x ♀ YAV). Mientras, la comparación de C4 (♀ PCH x ♂ YAV) mostró valores de 0.006 respecto a C3 (♂ PCH x ♀ YAV), C5 (♂ YAV x ♀ SFB) y C6 (♀ YAV x ♂ SFB). Los valores máximos de distancia (0.008), fueron observados al comparar la cruce C5 (♂ YAV x ♀ SFB) respecto a las cruces C3 (♂ PCH x ♀ YAV) y C6 (♀ YAV x ♂ SFB).

7.3.7. Distancia genética de poblaciones e híbridos

Los fragmentos usados como referencia, la población SFB y los híbridos C5 (♂ YAV x ♀ SFB) son 100 % iguales (distancia genética 0). De modo similar, se observaron valores de 0 en la comparación de la población PCH vs. C4 (♀ PCH x ♂ YAV). Asimismo, los resultados de distancia entre las secuencias de YAV, C3 (♂ PCH x ♀ YAV) y C6 (♀ YAV x ♂ SFB) son 100 % iguales.

La distancia genética entre las poblaciones, PCH vs. SFB; PCH vs. YAV, así como de los híbridos C3, C5 y C6 vs. PCH, mostró valores de 0.006 (Tabla 14).

Tabla 14. Distancia genética entre poblaciones e híbridos (parámetro de Kimura – 2).

Población e híbridos	Población e híbridos						
	1	2	3	4	5	6	7
1. <i>A. franciscana</i>							
2. SFB	0.000						
3. PCH	0.006	0.006					
4. YAV	0.008	0.008	0.006				
5. (C4) ♀ PCH x ♂ YAV	0.006	0.006	0.000	0.006			
6. (C3) ♂ PCH x ♀ YAV	0.008	0.008	0.006	0.000	0.006		
7. (C6) ♀ YAV x ♂ SFB	0.008	0.008	0.006	0.000	0.006	0.000	
8. (C5) ♂ YAV x ♀ SFB	0.000	0.000	0.006	0.008	0.006	0.008	0.008

7.3.8. Diagrama de árbol basado en el parámetro de distancia de Kimura - 2

La matriz de valores de distancia genética de poblaciones e híbridos fueron usados para realizar el árbol filogenético con el método UPGMA. Se presentaron tres grupos generales, cada grupo es representado por un haplotipo distinto. De esta manera, cada agrupamiento se forma de una población (SFB, PCH y YAV) y los híbridos con secuencias heredadas por linaje materno (haplotipos 100% iguales). Asimismo, la ubicación de los grupos en el árbol, está en función del número de mutaciones por haplotipo. El grupo ubicado en la parte superior, incluye el gen 16S de *Artemia franciscana* usado como referencia, la población SFB y los híbridos C5 (♂ YAV x ♀ SFB). Mientras el grupo intermedio sólo se formó por la población PCH y la cruce C4 (♀ PCH x ♂ YAV). De modo semejante, el grupo formado de YAV y los híbridos C3 (♂ PCH x ♀ YAV) y C6 (♀ YAV x ♂ SFB) es el que presentó la secuencia más diferente respecto a la especie *Artemia franciscana* (Figura 6).

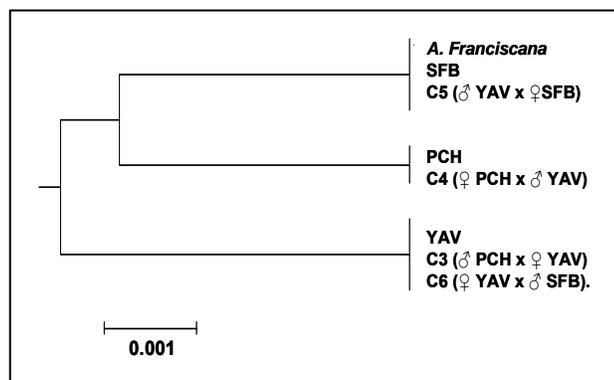


Figura 6. Árbol UPGMA basado en el parámetro de distancia de Kimura - 2. *Artemia franciscana* (referencia), SFB (San Francisco Bay, E.U.A.), YAV (Yavaros, Méx.) y PCH (Pichilingue, Méx.).

8. DISCUSIÓN

8.1. Poblaciones de *Artemia*

Diversos trabajos sobre caracterización de poblaciones de *Artemia*, han aportado información con la finalidad de establecer la biogeografía de este género. En la actualidad, se conoce que *Artemia* habita en todos los continentes excepto en el Antártico (Belk, 1982; Triantaphyllidis *et al.*, 1998) y los principales procesos naturales (ecológicos) en la colonización de este género hacia nuevos hábitats geográficos, han sido investigados por Figuerola y Green (2002). Sin embargo se ha reportado que el hombre ha contribuido a la introducción de cepas exóticas de *Artemia* con fines comerciales (Browne y Bowen, 1991; Castro *et al.*, 2000; Sorgeloos *et al.*, 2001). De acuerdo con Maeda-Martínez (2002), se ha reportado en al menos 11 estados de la república Mexicana. Por lo que, recientemente se han realizado estudios para caracterizar poblaciones de *Artemia* (de diferentes orígenes geográficos) basados en aspectos morfológicos (biometrías), citogenéticos (cromosomas y cromocentros), genéticos (genes e isoenzimas), bioquímicos y pruebas de fertilidad mediante cruces, reportando variaciones intra e interespecíficas (Abreu-Grobois y Beardmore, 1984; Triantaphyllidis 1997; Correa y Tapia 1998; Gajardo *et al.*, 2001; Mayer, 2002). De acuerdo con Hontoria y Amat (1992), la sistemática y taxonomía del género aún no queda completamente establecida debido a la escasa información existente. Lo anterior, hace de este grupo tema de estudio a nivel poblacional, pues aún se desconoce el estado sistemático y el nivel de diferenciación genética de localidades en donde habita *Artemia*, por lo que surge la necesidad de realizar estudios referentes al tema. Al respecto, en este trabajo se estudiaron tres poblaciones de *Artemia*, de las cuales la población de Yavaros Son. Méx. (YAV), fue caracterizada citogenéticamente por Abreu-Grobois y Beardmore (1984); mediante morfometría por Correa y Bückle (1993) y con base a aspectos reproductivos por Castro *et al.*, (1999). Por otro lado, la *Artemia* de la población de Pichilingue B. C. S. (San Juan Nepomuceno) (PCH), ha sido menos estudiada, pues existen pocos trabajos de

investigación respecto a esta localidad (Bowen, 1962; Bowen, 1965; Clark y Bowen, 1976; Naegel y Rodríguez, 2002). La tercera población de estudio, fue *Artemia* de la Bahía de San Francisco E.U.A. (lote comercial). Las poblaciones de México fueron comparadas molecular y citogenéticamente con respecto a la especie dominante en América, *Artemia franciscana*. Por lo tanto con los reportes previos, en este trabajo, conjuntamente fue posible realizar cruzas recíprocas entre las tres poblaciones ya mencionadas. Los híbridos producto de las cruzas, fueron molecular y citogenéticamente evaluados respecto a los progenitores y *A. franciscana* (*sensu stricto*).

8.2. Obtención de híbridos en laboratorio

La reproducción, ha sido usada como una primera herramienta básica en la caracterización de nuevas poblaciones de organismos (Abatzopoulos *et al.*, 1998), pues el concepto para definir *especie* está basado en el intercambio genético entre individuos mediante reproducción sexual (Dobzhansky *et al.*, 1977). Lo anterior engloba fuertemente el tema de la reproducción como un primer factor discriminante entre poblaciones y especies. Así en el género *Artemia* se ha logrado reportar formas gonocóricas con aislamiento reproductivo. Sin embargo es conveniente considerar los mecanismos pre y post - apareamiento pues el aislamiento reproductivo entre organismos puede deberse a factores abióticos (Clark y Bowen, 1976; Brown y Bowen, 1991; Barata *et al.*, 1996; Baxevanis y Abatzopoulos, 2004). Estos autores han demostrado que el comportamiento reproductivo entre algunas poblaciones del género *Artemia*, se ve afectado por la no tolerancia a los iones contenidos en el agua de mar así como también por la temperatura aunque en algunas cruzas el aislamiento reproductivo ha sido observado después de la F2. Considerando lo anterior, las pruebas de fertilidad realizadas en el presente trabajo a las poblaciones de *Artemia*, fueron bajo condiciones estándares de cultivo (Campos-Ramos *et al.*, 2003). En el presente trabajo se logró obtener descendencia hasta dos generaciones (F1 y F2) en todas

las cruzas recíprocas con lo cual se comprobó la compatibilidad reproductiva entre las poblaciones de *Artemia* de SFB (cepa comercial), Pichilingue y Yavaros. Correa y Tapia (1998) evaluaron fertilidad en poblaciones mexicanas (San Quintín B. C. y Yavaros, Son.) respecto a la especie *Artemia franciscana*, sin embargo el trabajo de estos autores se basó en la obtención y evaluación detallada de una generación filial (F1) por cada cruce realizada. Un año más tarde, Castro *et al.*, (1999) bajo condiciones controladas de cultivo, caracterizaron aspectos reproductivos de poblaciones mexicanas de *Artemia* (Yavaros Son. y Bahía de Ceuta Sin.) respecto a *A. franciscana*. Estos autores encontraron variaciones en el comportamiento reproductivo (entre las cuales destacaron la producción de quistes o nauplios) al evaluar cada una de las cruces recíprocas. De modo semejante, en el presente trabajo se observó variación en el comportamiento reproductivo (Yavaros y Pichilingue) similar al que reportaron Castro *et al.*, (1999) para las poblaciones mexicanas. Cabe señalar que en el presente trabajo no fue posible evaluar características del ciclo reproductivo de la progenie. Bowen (1965) en un estudio citogenético realizó cruces entre ocho poblaciones americanas de *Artemia* (entre las cuales se incluye la localidad de Pichilingue) y reportó fertilidad entre siete cepas respecto a *Artemia franciscana*. Otras de las poblaciones de *Artemia* de Baja California México, reproductivamente caracterizadas son de la localidad de San José (Correa *et al.*, 1993). Mediante cruzamiento entre *Artemia* nativa de México y *A. franciscana* obtuvieron dos generaciones (F1 y F2) y reportaron alta fertilidad en la progenie obtenida, con lo cual se determinó que tales localidades pertenecen a *Artemia franciscana*. Análogamente, Correa y Tapia (1998), analizaron el comportamiento reproductivo de la población de *Artemia* de San Quintín Baja California cuyos hallazgos ya fueron discutidos en párrafos anteriores. Sin duda, las poblaciones de Yavaros y Pichilingue presentan diversidad en el patrón reproductivo. Por lo cual, deberían ser evaluadas las características biológicas específicas de cada población ya que pueden presentar características de importancia para la acuicultura (Correa y Bückle, 1993).

8.3. Citogenética

El estudio de organismos a nivel citológico mediante el análisis detallado de cromosomas es un rasgo muy confiable en la inferencia taxonómica y en la determinación de especies. De esta manera, la citogenética juega un papel importante dentro de la sistemática de plantas y animales (Moran, 1976; Baimai *et al.*, 1984). Al respecto, mediante técnicas de tinción Barigozzi *et al.*, (1984) reportaron la presencia de bloques microscópicos de heterocromatina denominados cromocentros en núcleos interfásicos de nauplios de *Artemia*. En dicho trabajo, se menciona que los cromocentros, DNA repetitivo (Adenina y Timina), el bandeo C y la familia del tipo *Alu I*, están correlacionadas positivamente. Trabajos posteriores sobre citogenética han usado frecuentemente cromosomas y cromocentros en la biogeografía, evolución y especiación en poblaciones del género *Artemia* (Abreu-Grobois y Beardmore, 1989; Abatzopoulos *et al.*, 1998; Rodríguez *et al.*, 1998; Papeschi *et al.*, 2000; Gajardo *et al.*, 2001; Torrentera; Abreu-Grobois, 2002), comparando sus resultados con la especie gonocórica *Artemia franciscana*. Lo anterior hace a *Artemia franciscana* la especie más estudiada dentro del género *Artemia* (Rodríguez *et al.*, 1998; Gajardo *et al.*, 2001; Kappas *et al.*, 2004).

La evaluación citogenética en el presente trabajo se basó en el conteo de cromocentros en la población de *Artemia* de San Francisco, E.U.A. (SFB) (cepa comercial), Pichilingue Méx. (PCH) y Yavaros Méx. (YAV), así como híbridos producidos mediante cruza recíprocas entre estas poblaciones.

Los valores del número de cromocentros observados para la población SFB (*Artemia franciscana*), concuerdan con los resultados reportados por Barigozzi *et al.*, (1984) quienes observaron 14.8 ± 1.8 cromocentros en la misma población. De modo contrastante, Abreu-Grobois y Beardmore (1989) reportaron un promedio de 17.7 cromocentros y Torrentera y Abreu-Grobois (2002) reportaron una media de 15.9 cromocentros para la especie *Artemia franciscana*. Asimismo, en estos trabajos se reportaron diferentes intervalos de cromocentros obtenidos a partir de la evaluación de poblaciones (11 - 24 y 5 - 15 respectivamente), dentro de los

cuales se pueden ubicar los resultados obtenidos en el presente trabajo para *A. franciscana* (SFB). De acuerdo con Baimai *et al.*, (1984), las diferencias en la heterocromatina tiene aplicación en la identificación de especies hermanas. De modo similar, Barigozzi *et al.*, (1984) propusieron la hipótesis de que los cromocentros son visibles sólo en la *Artemia* del nuevo continente, misma que fue comprobada por Abreu-Grobois y Beardmore (1989) mediante la evaluación citogenética de 42 poblaciones de *Artemia* de diferentes orígenes geográficos. Asimismo, Abatzopoulos *et al.*, (1998) describieron que la especie diploide *Artemia tibetiana* (Tibet) no presentó cromocentros. Al respecto, es preciso enfatizar que los trabajos citados acerca de la discriminación de especies o poblaciones, mediante el número de cromocentros también fundamentaron sus hallazgos por medio de la evaluación del número y forma de cromosomas.

Otra de las poblaciones de *Artemia* estudiadas citogenéticamente en el presente trabajo pertenece a la localidad de Pichilingue B. C. S. Méx. (San Juan Nepomuceno), la cual fue previamente caracterizada por Bowen (1965), quien reportó que las hembras cigogénicas determinan el sexo (heterogamética sexual). A pesar de que en ése trabajo se determinó mediante cruces y análisis cariotípicos, que la *Artemia* de la localidad PCH ($2n$) pertenece a la especie *Artemia franciscana* (citada en ese momento como *Artemia salina*), no existen registros previos de estudios citogenéticos basados en el número de cromocentros para esta población. Al respecto, en el presente trabajo se reporta por primera vez el número promedio de cromocentros para la población de *Artemia* de Pichilingue (12.1 ± 3.0). De modo comparativo, esta población presentó ligeras variaciones respecto al número promedio de cromocentros en la especie *Artemia franciscana* reportados por Barigozzi *et al.*, (1984), Abreu-Grobois y Beardmore (1989), Torrentera y Abreu-Grobois (2002) y Abatzopoulos *et al.*, (1986) quienes reportaron 15.8 ± 0.99 .

Algunas de las posibles causas respecto a las diferencias de la población PCH respecto a SFB deben considerarse el número de células analizadas por nauplio, ya que un número bajo de células limita las inferencias derivadas del

análisis. Asimismo, el número y estadio de los nauplios usados en el análisis también juegan un papel importante en las preparaciones celulares (Abatzopoulos *et al.*, 1986). Probablemente, las causas técnicas señaladas pudieran causar efecto sobre la determinación del número de cromocentros en cualquiera de las poblaciones estudiadas aquí, inclusive entre individuos. Sin embargo, existen factores bióticos y abióticos que producen una respuesta del organismo para adaptarse al ambiente, lo cual se ve reflejado en cierto grado de diferenciación (Torretera y Abreu-Grobois, 2002). Debido a estas variaciones, cada población de este crustáceo ha sido llamado variante microgeográfica de *Artemia franciscana* (Correa y Bückle, 1993). Este hecho hace de *Artemia* buen candidato para el estudio de aspectos evolutivos (Brown y Bowen, 1991; Gajardo *et al.*, 2001; Torretera y Abreu-Grobois, 2002).

La localidad de Yavaros Son., es una de las poblaciones de *Artemia* nativas de México más estudiadas (Abreu-Grobois y Beardmore, 1989; Correa y Bückle, 1993; Correa *et al.*, 1993b; Correa-Sandoval y De la Rosa-Vélez, 1996; Correa y Tapia, 1998; Castro *et al.*, 1999). En estos trabajos, se han reportado diferencias en las características evaluadas de esta población respecto a la especie *Artemia franciscana*. Abreu-Grobois y Beardmore (1989) reportaron un número de cromocentros promedio de 3.90 y un rango de 2 - 6 en la población de Yavaros. De modo comparativo, el valor de cromocentros observado para la población Yavaros en el presente trabajo concuerda con el valor y rango reportado por estos autores. Es importante mencionar, que la *Artemia* de Yavaros presentó el valor más bajo de cromocentros, esta característica sigue distinguiendo a la población YAV dentro de la especie *Artemia franciscana*. La población YAV es más parecida a la especie *Artemia persimilis* (3 cromocentros) con distribución en América del sur (Abreu-Grobois y Beardmore, 1989). Resultados similares relacionados con el bajo número de cromocentros fueron reportados en las poblaciones Celestum (1 – 3), Chuburna (1 – 4) y Chtampu (1 – 8) de Yucatán, Méx. (Torretera y Abreu-Grobois 2002).

La diferencia del número de cromocentros existente entre la población de Yavaros respecto a la especie *Artemia franciscana* ya había sido reportada por

Abreu-Grobois y Beardmore (1989), sin embargo ahora se comprueba que existen diferencias significativas entre las poblaciones mexicanas (PCH y YAV). Asimismo, la población SFB y PCH son estadísticamente diferentes aunque la diferencia mostró ser muy baja. El hecho de que la población YAV, estadísticamente muestra marcadas diferencias respecto a la población PCH (ambas nativas de México) y aún respecto a la especie *Artemia franciscana*, soporta la hipótesis de que la población YAV ha iniciado una clara diferenciación (Abreu-Grobois y Beardmore, 1989). A pesar de que ha sido comprobado que la variación de heterocromatina intra e inter específica es un fenómeno común en los eucariontes (Baimai *et al.*, 1984), las poblaciones de *Artemia* nativas de México, han adquirido características propias que probablemente son influenciadas por el ambiente (Correa y Bückle, 1993). Las variaciones citogenéticas existentes en el género *Artemia* sin duda muestran que la relación entre la taxonomía y citogenética es compleja (Lécher *et al.*, 1995).

Respecto a la realización de híbridos o cruzamiento intra-específico, generalmente ha sido usada para la determinación de heterosis o vigor híbrido en diferentes taxa, así como en la introducción de nuevos genes a organismos de importancia en la acuicultura (Bryden *et al.*, 2004). Aunque se han reportado híbridos (producto de reproducción sexual entre dos especies) en zonas de transición, poco se conoce de estos organismos acerca del impacto de la hibridación en términos evolutivos. Algunos trabajos han obtenido híbridos entre poblaciones del género *Artemia* bajo condiciones de laboratorio para evaluar características citogenéticas respecto a los progenitores (Papeschi *et al.*, 2000; Gajardo *et al.*, 2001). De esta manera, el análisis de cromocentros en híbridos y poblaciones en América del sur, han revelado que existen zonas de hibridación entre *Artemia franciscana* y *A. persimilis* en zonas de transición de Chile y Argentina.

De acuerdo con Papeschi *et al.*, (2000), se ha inferido mediante análisis cariotípicos que en estas zonas es posible encontrar híbridos F2 e incluso organismos provenientes de la cruce de híbridos F1 con la forma parental de

Artemia franciscana (backcross). En el presente trabajo se evaluó el número de cromocentros en híbridos obtenidos en laboratorio a partir de cruzas recíprocas entre las poblaciones de *Artemia* de SFB, PCH y YAV (*Artemia franciscana*). Con base a los valores de medidas de tendencia central, no se observó de manera clara un número de cromocentros intermedio de los híbridos respecto a los progenitores. Sin embargo, los híbridos de la cruce YAV X SFB y YAV X PCH muestran valores mínimos cercanos al número intermedio esperado. Sin duda los valores de cromocentros en híbridos, en gran medida están en función del número real de cromocentros de los progenitores. Por lo que, deben ser considerados los rangos reportados por Abreu-Grobois y Beardmore (1989); Torrentera y Abreu-Grobois (2002) para la población SFB y YAV. De acuerdo con Bowen (1965), las diferencias citogenéticas observadas en híbridos, pueden ser atribuidas al transporte de cromosomas nuevos entre una población y otra. Este hecho puede explicar la variación de cromocentros entre los híbridos analizados aquí. Asimismo, dentro del género *Artemia* han sido reportadas asociaciones cromosómicas en la metafase tardía que producen la formación de cromocentros de diferente intensidad incluso dentro de individuos (Abatzopoulos, 1986 y Rodríguez *et al.*, 1998).

Con base a la comparación de cromocentros de híbridos producidos en laboratorio (C1 - C6) respecto a los progenitores, la población de YAV presentó diferencias significativas. Asimismo, mediante el análisis de agrupamiento es posible observar a la población YAV como un grupo diferenciado entre las poblaciones e híbridos. El bajo número de cromocentros en la población YAV confirma que ésta presenta cierto grado de diferenciación citogenética dentro de la especie *Artemia franciscana*. Estos resultados concuerdan con los publicados por Abreu-Grobois y Beardmore (1989) quienes reportaron que la población YAV formó uno de tres grupos entre la especie *Artemia franciscana* y *Artemia monica*. A través de estudios citogenéticos, los cromocentros han sido estudiados en las especies *Artemia persimilis* (44 cromosomas y <3 cromocentros) y *Artemia franciscana* (42 cromosomas y 15 cromocentros) para tratar de explicar su estado primitivo. De este modo, se ha sugerido con base al bajo número de cromocentros

que la especie del Mediterráneo *A. salina* es el ancestro de *A. persimilis* y que probablemente *A. franciscana* deriva de ésta última (Gajardo *et al.*, 2001). Estos mismos autores reportaron que el número de cromocentros en poblaciones de *Artemia franciscana* disminuye de Norte y Sur hacia el Ecuador. De modo similar, en el presente trabajo, la población SFB (número de cromocentros alto, 13.5) mostró diferencias significativas respecto a PCH y en el diagrama de árbol se ubica en un grupo opuesto a YAV (3 cromocentros).

Por otro lado, el número de cromocentros en híbridos mostró amplia variación con promedios tan cercanos al que se esperaba obtener de la cruce YAV X SFB y YAV X PCH. Gajardo *et al.*, (2001) reportaron un traslape en el número de cromocentros de organismos encontrados en zonas de hibridación entre *Artemia persimilis* y *A. franciscana*. Estos mismos autores, reportaron un número de cromocentros intermedio en híbridos producidos en laboratorio entre estas dos especies.

En el presente trabajo, los híbridos no mostraron diferencias respecto a PCH, esto puede deberse al aporte genético de una población a otra (flujo genético) ya que éstos fueron obtenidos mediante cruces recíprocas entre poblaciones citadas como *Artemia franciscana* (Hontoria y Amat, 1992; Correa y Bückle, 1993; Correa *et al.*, 1993; 1993b; Castro *et al.*, 2000). Asimismo, estos resultados sugieren realizar estudios enfocados hacia el modo de herencia de cromocentros con base al análisis de individuos adultos. Al respecto, existen estudios genéticos basados en el uso de microarreglos o isoenzimas que permiten explicar la procedencia de un individuo y así dar a conocer su linaje (Schwenk, 1993; Jerry *et al.*, 2004). De esta manera se podría discutir respectivamente el grado de divergencia de la población YAV y los hallazgos del “parentesco citogenético” entre los híbridos (producto de la cruce YAV x SFB) respecto a la población PCH. Sin duda, las diferencias estadísticas observadas comprueban la heterogeneidad en cuanto al número de cromocentros entre poblaciones e híbridos y por ende en la especie *Artemia franciscana*.

8.4. Análisis molecular

De acuerdo a la complejidad taxonómica del género *Artemia*, actualmente se han desarrollado técnicas genéticas (AFLP's (fragmentos amplificados de longitud polimorfit) y RFLP's (fragmentos de restricción de longitud polimorfit) y PCR que proporcionan información que permiten identificar, agrupar o caracterizar poblaciones o especies pertenecientes a este género. Sin duda, características tales como el modo de herencia materna, alto índice de evolución (5 - 10 veces más rápido que el genoma nuclear) y una baja recombinación, hacen del ADN mitocondrial una buena herramienta genética en estudios evolutivos entre especies lejanas y/o estrechamente relacionadas (Browne y Bowen, 1991; Pérez *et al.*, 1994; Gajardo *et al.*, 2004). Actualmente se conoce que la longitud del genoma mitocondrial es de 14 a 42 kb en los metazoarios y el contenido de genes es generalmente conservado (Crease, 1999). Dentro del género *Artemia*, ha sido obtenido el genoma mitocondrial por Valverde *et al.*, (1994) para la especie *Artemia franciscana*, el cual presenta 37 genes y un total de 15.822 kilo bases de longitud. Este trabajo sin duda ha sido base fundamental para investigaciones posteriores sobre genética, pues las inferencias acerca de la evolución o especiación del género son más confiables cuando se trabaja a nivel genético. Posterior a la obtención del genoma, Batuecas *et al.*, (1988) caracterizaron el ADNmt de *Artemia* a nivel de genes y reportaron que la organización del genoma es muy parecida al ADNmt de *Drosophila*.

Dentro del genoma mitocondrial, los genes 12S y 16S son muy conservados lo cual hace de estos genes útiles para inferir filogenia de niveles altos como phila o subphila y niveles medios tales como familia o género (Hwang y Kim, 1999). De acuerdo con Avise (1994) es recomendable realizar inferencias con pares de bases que representen fragmentos o genes completos, pues así se da a conocer un panorama más real de la divergencia evolutiva del grupo en estudio. En el presente trabajo de tesis, se analizó un fragmento de 477 pares de bases del gen 16S de la población de SFB, PCH, YAV y en cuatro híbridos producidos en laboratorio mediante cruza recíprocas entre estas poblaciones. De

acuerdo a la longitud del genoma mitocondrial (15822 pb) y del gen 16S (1152 pb) de *Artemia franciscana*, el fragmento del gen analizado aquí corresponde a la posición 12177 - 12652 y representa ~42 % de la longitud total para el gen de *A. franciscana* reportado por Valverde *et al.*, (1994). Al respecto, ha sido discutido y evaluado ampliamente el uso y aplicación de este gen, así como la longitud promedio (pares de bases) usada generalmente en estudios filogenéticos dentro del grupo de los crustáceos (Hwang y Kim, 1999; Schubart *et al.*, 2000). Estudios realizados en 7 especies de anfípodos, han permitido identificar y agrupar 32 individuos mediante el alineamiento de 179 pb del gen 16S de este grupo (Schubart *et al.*, 2000). Asimismo, Bucklin y Lajeunesse (1994) estudiaron genéticamente al copépodo *Calanus pacificus*, estos autores basaron la inferencia taxonómica de este organismo mediante el alineamiento de 449 pares de bases del gen 16S de ADNmt. De modo comparativo, el análisis de alineamiento del gen 16S (477 pb) de las poblaciones estudiadas aquí, respecto al gen de *A. franciscana* obtenido de la base de datos del banco genético, permitió identificar cinco sitios variables. De los cuales, dos son filogenéticamente informativos y pueden ser usados para estudios posteriores (Nei y Kumar, 2000). De modo particular, se observaron tres pares de bases diferentes entre poblaciones nativas de México. Sin embargo, conjuntamente estas presentaron tres y cuatro bases diferentes respecto a la especie *A. franciscana*. Cuatro de estas variaciones observadas en el análisis de alineamiento son cambios (mutaciones) de tipo transición ($A \leftrightarrow G$ ó $T \leftrightarrow C$) y un cambio de tipo transversión ($G \rightarrow T$) (Nei y Kumar, 2000). Sin embargo, el tipo de variación frecuentemente observado en este análisis fue de tipo transición con cambios de nucleótidos preferentemente $T \leftrightarrow C$. Resultados similares fueron reportados por Pérez *et al.*, (1994) quienes determinaron que las transiciones totales llegan a representar hasta el 54 % de las sustituciones de nucleótidos dentro del genoma mitocondrial del género *Artemia*. Este tipo de variaciones ha sido observado en otros crustáceos, insectos y mamíferos (Wolstenholme y Clary, 1985; Garesse, 1998; Fratini y Vanini, 2002; Murugan *et al.*, 2002). El hecho de que la mayoría de los sitios de variación corresponden a cambios transicionales, no provoca cambios estructurales lo cual

significa que la evolución del gen 16S es restringida. Sin embargo, estas variaciones y el tipo de mutación transversional reportado aquí debe ser considerado en términos evolutivos a nivel intraespecífico (Dobzhansky *et al.*, 1977; Schubart *et al.*, 2000; Murugan *et al.*, 2002).

Sin duda los sitios variables y el tipo de variación en la secuencia del gen mitocondrial analizado, mostró que no existe diferencia entre machos y hembras dentro de cada población, esto permitió identificar dos nuevos haplotipos (PCH y YAV) cuyos respectivos valores de distancia genética (parámetro de Kimura - 2) interpoblacional e intraespecífico, oscilaron en un rango de 0.006 - 0.008. Comparativamente, la filogenia de poblaciones de Notostracos (género: *Triops*) de la península de Baja California, Méx., fue analizada por Murugan *et al.*, (2002) y basados en el gen 16S, reportaron un rango de distancia genética del parámetro de Kimura - 2 de 0.002 - 0.140.

Sin duda, los resultados de distancia genética (basados en 477 pb) reportados en el presente trabajo son indicativos de una baja diferencia genética de poblaciones nativas respecto a la especie *A. franciscana*, la cual está en función directa del número y tipo de mutaciones (Avice, 1994; Nei y Kumar, 2000). Sin embargo, de acuerdo a la historia evolutiva de *Artemia*, esta baja diferenciación genética es un fuerte indicador de una reciente separación de las poblaciones mexicanas respecto a la especie *A. franciscana*. Estos resultados, dan credibilidad acerca del grado de aislamiento poblacional existente dentro del género *Artemia*, inferido con base a estudios de aspectos reproductivos, citogenéticos (cromosomas y cromocentros), bioquímicos y morfométricos reportadas con anterioridad por Abreu-Grobois y Beardmore (1989), Correa-Sandoval y De la Rosa-Vélez (1996), Abatzopoulos *et al.*, (1998), Rodríguez *et al.*, (1998), Papeschi *et al.*, (2000), Gajardo *et al.*, (2001) y Torrentera y Abreu-Grobois (2002). De modo contrastante, Perez *et al.*, (1994) reportaron valores de distancia genética altos entre *Artemia partenogénica* diploica y tetraploica, estos autores concluyeron que las dos formas partenogénicas reúnen características genéticas para considerarlas especies diferentes.

De acuerdo con Hontoria y Amat (1992), la caracterización de poblaciones nativas de *Artemia* aporta información respecto al estatus sistemático del género y de esta manera contribuye a determinar el grado de aislamiento reproductivo, evolutivo y/o especiación inclusive a nivel poblacional. En el presente trabajo, la caracterización (ADNmt) previa de las poblaciones facilitó la caracterización de los híbridos por el hecho de conocer detalladamente cada haplotipo. Mismos que fueron comprobados mediante la técnica de agrupamiento de la media aritmética no ponderada (UPGMA) basado en el parámetro de distancia de Kimura - 2. Cada población fue agrupada en una rama del árbol con sus respectivos híbridos cuya herencia del gen 16S fue vía materna.

Hasta el momento, ya ha sido discutida la obtención y evaluación de híbridos producidos entre poblaciones del género *Artemia*. Sin embargo, investigaciones recientes con base a análisis citogenético y fenotípico, han demostrado que existen zonas de hibridación entre *Artemia franciscana* y *A. persimilis* en Argentina (Papeschi *et al.*, 2000). Este fenómeno pudiera explicar variaciones citogenéticas existentes intrapoblacionalmente (Torretera, 1993; citado por Torretera y Abreu-Grobois 2002). En el presente trabajo, la población PCH citogenéticamente es más parecida a *A. franciscana*, sin embargo no fue posible distinguir a PCH de los híbridos. Los resultados de biología molecular basados en la amplificación del gen mediante la PCR y su posterior alineamiento, no aporta información suficiente para demostrar si existe o no hibridación interpoblacional. Conjuntamente el agrupamiento de poblaciones e híbridos mediante el dendograma UPGMA explica la procedencia genealógica de estos últimos con base al modo de herencia materno del gen de las poblaciones (progenitores) hacia los híbridos (cruzas recíprocas). Por lo cual estos resultados, muestran de manera clara que es posible agrupar e identificar parcialmente cruzas recíprocas producidas en laboratorio producto del apareamiento entre poblaciones, pero la identificación estrictamente de los mismos debe ser mediante la aplicación de varias disciplinas para evitar dar a conocer resultados ambiguos debido a la dificultad que ha sido observada en la identificación de zonas de hibridación entre especies o subespecies (Torretera y Abreu-Grobois, 2002; Amat

et al., 2004; Jerry *et al.*, 2004). Al respecto, Gajardo *et al.*, (2001) reportaron que el número de cromocentros en híbridos producto de la cruce de *Artemia franciscana* X *A. persimilis* fue intermedio entre estas dos poblaciones (especies). Estos autores compararon sus resultados respecto a 32 poblaciones del género *Artemia* cuyos resultados sugieren la existencia de zona de hibridación entre estas especies en la Patagonia chilena. Sin duda, el análisis molecular mediante la amplificación de genes ribosomales permite discriminar o identificar cepas introducidas (Campos-Ramos *et al.*, 2003). Estos análisis muestran la diversidad genética y citogenética en poblaciones de este crustáceo, fenómeno que difícilmente puede ser visto en otros taxa (Gajardo *et al.*, 2001). Mediante la caracterización y evaluación de características biológicas de poblaciones nativas de México se pretende contribuir al estatus sistemático de este género. Asimismo, este es un primer intento mediante el cual se evalúa en cierto grado, el efecto de la hibridación genético molecular entre poblaciones pertenecientes a la misma especie.

9. CONCLUSIONES

1. Con base al número de cromocentros observado en la población de referencia (SFB = 13.5 ± 2.8) y de acuerdo a la información recabada acerca de estudios citogenéticos de poblaciones de *Artemia* nativas de México, en el presente trabajo se reporta por primera vez el número promedio de cromocentros para la población Pichilingue (PCH), B. C. S. (12.1 ± 3.0).
2. Mediante el número de células analizadas citogenéticamente, en el presente trabajo se comprueba que la población de Yavaros Sonora (YAV), es una de las poblaciones de *Artemia* nativas de México que presenta valores bajos de cromocentros dentro del grupo de norte América, tal como fue reportado por Abreu-Grobois y Beardmore (1989).
3. El análisis de cromocentros en híbridos producidos en laboratorio mediante el apareamiento de poblaciones podría ser una alternativa para detectar cepas introducidas.
4. El análisis genético mediante la amplificación de 477 pares de bases del gen 16S ARNr de ADNmt mostró que las poblaciones Pichilingue, B. C. S. (PCH) y Yavaros, Sonora (YAV), poseen haplotipos propios, los cuales indican diversidad genética de las poblaciones nativas estudiadas aquí respecto a la especie *Artemia franciscana*.
5. El fragmento del gen 16S de ARNr analizado en las cruzas recíprocas mostró haplotipos de origen materno.
6. El análisis de alineamiento del fragmento del gen 16S de ARNr obtenido y los correspondientes valores de distancia genética muestran una baja diferenciación genética entre poblaciones nativas y respecto a la especie *Artemia franciscana*. Estos resultados podrían indicar una diferenciación

relativamente reciente de las poblaciones estudiadas aquí, respecto a la especie *A. franciscana*.

7. Debido a la baja diferenciación genética obtenida mediante el análisis de secuencia del gen 16S ADNmt, se concluye que la identificación parcial de cruzas recíprocas producidas en laboratorio, puede realizarse a través de la caracterización previa de poblaciones y de este modo, explicar la procedencia genealógica del híbrido.

10. RECOMENDACIONES

1. Respecto al comportamiento reproductivo, en este estudio se ha mencionado que no fue posible profundizar en la evaluación de la progenie híbrida. Por lo tanto se sugiere una caracterización cuantitativa y cualitativa de los híbridos producidos entre la población de Yavaros y Pichilingue.
2. De acuerdo a la variación citogenética observada en la comparación de poblaciones respecto a híbridos, es necesario realizar estudios similares para probar el grado de diferenciación intrapoblacional e intraespecífica.
3. Asimismo, es importante considerar la caracterización específica de híbridos producidos mediante el apareamiento entre poblaciones nativas. Empleando de manera conjunta varias disciplinas tales como morfometría, citogenética, genética (RFLP'S, AFLP'S y microsatélites).
4. Con base a los resultados observados en la presente investigación, es recomendable amplificar genes codificadores de proteínas o genes hipervariables, los cuales pueden proporcionar información de variación genética incluso entre individuos.

BIBLIOGRAFÍA

- Abatzopoulos T.J., C.D. Kastritsis y C.D. Triantaphyllidis, 1986. A study of Karyotypes and heterochromatic associations in *Artemia*, with special reference to two N. Greek populations. *Genetica*. 71: 3-10.
- Abatzopoulos T.J., B. Zhang y P. Sorgeloos, 1998. *Artemia tibetiana*: preliminary characterization of a new *Artemia* species found in Tibet (People's Republic of China). *International Study on Artemia*. LIX . *International Journal of Salt Lake Research*. 7: 41-44.
- Abreu-Grobois, F.A. y J.A. Beardmore, 1980. *International study on Artemia*. II. Genetic characterization of *Artemia* populations: an electrophoretic approach. En: *The brine shrimp Artemia* (G. Persoone, P. Sorgeloos, O. Roels, and E. Jaspers Eds). *Universa Press, Wetteren, Belgium*. 1: 133-146.
- Abreu-Grobois F.A. y J.A. Beardmore, 1989. Chromosomes and chromocenters in the genus *Artemia*. *An. Inst. Cienc. del Mar y Limnol. Univ. Nal. Autón. México*. 16(2):231-244.
- Amat, F., R.G. Cohen, F. Hontoria y J.C. Navarro, 2004. Further evidence and characterization of *Artemia franciscana* (Kellogg, 1906) populations in Argentina. *J. Biogeogr.* 31: 1735-1749.
- Avise, J.C., 1994. *Molecular marker, natural history and evolution*. Chapman y Hall. *International Thompson Publishing*. 2nd edition.
- Baimai, V., R. G. Andre y B. A. Harrison, 1984. Heterochromatin variation in the sex chromosomes in Thailand populations of *Anopheles dirus* A (Diptera: Culicidae). *Can. J. Genet. Cytol.* 26(5): 633-636.
- Barata C., F. Hontoria y F. Amat, 1996. Estimation of biomass production of *Artemia* with regard to its use in acuaculture: temperature and strain effects. *Acuaculture*. 142: 171-189.
- Barigozzi, C., G. Badaracco, P. Plevani, L. Baratelli, S. Profeta, E. Ginelli y R. Meneveri, 1984. Heterochromatin in the genus *Artemia*. *Chromosoma*. 90: 332-337.

- Batuecas, B., R. Garesse, M. Calleja, J.R. Valverde y R. Marco, 1988. Genome organization of *Artemia* mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Research*. 16(14): 6515-6529.
- Baxevanis, A.D. y T.J. Abatzopoulos, 2004. The phenotypic response of ME₂ (M. Embolon, Greece) *Artemia* clone to salinity and temperature. *J. Biol. Res.* 1: 107-114.
- Belk, D., 1982. Branchiopoda. En: *Synopsis and classification of living organisms* (S.P. Parker Ed). Vol. 2. MacGraw-Hill Book Company, New York, 174-180.
- Belk, D. y J. Brteck, 1995. Checklist of the Anostraca. *Hydrobiologia* 298: 315-353.
- Bengston, D.A., P. Léger y P. Sorgeloos, 1991. Use of *Artemia* has a food source for aquaculture. En: *Artemia Biology* (R.A. Brown, P. Sorgeloos y C.N.A. Trotman Eds). CRC Press. Boca Raton, FL. USA. pp. 255-285.
- Bowen, S.T., 1962. The genetics of *Artemia salina*. I. The reproductive cycle. *Biol. Bull.* 122: 25-32.
- Bowen, S.T., 1965. The genetics of *Artemia salina*. V. Crossing over between the X and Y chromosomes. *Genetics* 52: 695-710.
- Bowen, S.T., J.P. Durkin, G. Sterling y L.S. Clark, 1978. *Artemia* hemoglobins: Genetic variation in parthenogenetic and zygogenetic populations. *Biol. Bull.* 155: 273-287.
- Bucklin, A. y T.C. Lajeunesse, 1994. Molecular genetic variation of *Calanus pacificus* (Copepoda: Calanoida): preliminary evaluation of genetic structure and subspecific differentiation based on mtDNA sequences. *CalCOFI Rep.* 35: 45-51.
- Browne, R.A. y S.T. Bowen, 1991. Taxonomy and population genetics of *Artemia*. En: *Artemia biology* (R.A. Browne, P. Sorgeloos y C.N.A. Trotman Eds). CRC Press, Boca Raton Ann Arbor Boston, U.S.A. Chapter 9: 221-235.
- Bryden, C.A., J.W. Heath y D.D. Heath, 2004. Performance and heterosis in farmed and wild Chinook salmon (*Onchorhynchus tshawytscha*) hybrid and purebred crosses. *Aquaculture*. 235: 249-261
- Cabot, E., 1998. The Eye Ball Sequence editor. Version 3.2 (c).

- Campos-Ramos, R., A.M. Maeda-Martínez, H. Obregón-Barboza, G. Murugan, D.A. Guerrero-Tortolero y P. Monsalvo-Spencer, 2003. Mixture of parthenogenetic and zygogenetic brine shimp *Artemia* (Brachiopoda: Anostraca) in comercial cyst lots from Great Salt Lake, UT, USA. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 296: 243-251.
- Castro, J.A., A. Malpica-Sánchez, G. Castro-Mejía, T. Castro-Barrera y R. De Lara-Andrade, 1999. Variación del patrón reproductivo de dos poblaciones mexicanas de *Artemia franciscana* (Branchiopoda: Anostraca) y su comparación con la población de Bahía de San Francisco, California. *Rev. Biol. Trop.* 47(Supl. 1): 99-104.
- Castro, T., A. Malpica, J. Castro, G. Castro y R. De Lara, 2000. Environmental and biological characteristics of *Artemia* ecosystems in Mexico: An updated review. En: *Aquatic Ecosystems of Mexico: status and scope* (M. Munawar, S.G. Lawrence, I.F. Munawar y D.F. Malley Eds). Backhuys Publishers. pp. 191-201.
- Cohen, R.G., F. Amat, F. Hontoria y J.C. Navarro, 1999. Preliminary characterization of some Argentinean population from la Pampa and Buenos Aires provinces. *Int. J. Salt Lake. Res.* 8: 329-340.
- Correa, F. y L.F. Bückle, 1993. Morfología y biometría de cinco poblaciones de *Artemia franciscana* (Anostraca: Artemiidae). *Rev. Biol. Trop.* 41(1): 103-110.
- Correa, F., L.F. Bückle y D. Voltolina, 1993b. The biochemical composition of the cysts of some Mexican populations of *Artemia franciscana* Kellogg, 1906. *Comp. Biochem. Physiol.* 104B(1): 163-167.
- Correa, F., L.F. Bückle y De la Rosa Vélez, 1993. Hibridación en algunas poblaciones de *Artemia franciscana* (Anostraca: Artemiidae). *Rev. Biol. Trop.* 41(1): 97-101.

- Correa-Sandoval, F. y J. De La Rosa-Vélez, 1996. Allozymatic variation in three populations of *Artemia franciscana* (Kellogg, 1906) from Mexico. En: Improvement of the commercial production of marine aquaculture species. Proceedings of a workshop on fish and mollusk larviculture (G. Gajardo y P. Coutteau Eds). Impresora Creces, Santiago, Chile, 165-171.
- Correa, S.F. y O. Tapia, 1998. Comportamiento reproductivo de *Artemia franciscana* (Kellogg, 1906) de San Quintín, Baja California, México. Ciencias Marinas. 24(3): 295-301.
- Clark, L.S. y S.T. Bowen. 1976. The genetics of *Artemia salina*. VII. Reproductive isolation. J. Hered. 67: 385-388.
- Crease, T.J. 1999. The complete sequence of the mitochondrial genome of *Daphnia pulex* (Cladocera: Crustacea). Gene. 233: 89-99
- De los Rios, P. y O. Zúñiga, 2000. Comparación biométrica del lóbulo frontal en poblaciones americanas de *Artemia* (Anostraca, Artemiidae). Rev. Chil. Hist. Nat. 73: 31-38.
- Dobzhansky, T.F., J. Ayala, G.L. Stebbins y J.W. Valentine, 1977. Evolution. University of California, Davis. San Francisco. 572 pp
- Figuerola, J. y A.J. Green, 2002. Dispersal of aquatic organisms by water birds: a review of past research and priorities for future studies. Freshwater biology. 47: 483-494.
- Fratini, S. y M. Vannini, 2002. Genetic differentiation in the mud crab *Scylla serrata* (Decapoda: Portunidae) within the Indian Ocean. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 272:103–116
- Gajardo, G. y J.A. Beardmore, 2001. Coadaptación: lecciones desde el camarón de salmuera *Artemia*, "la Drosophila acuática" (Crustacea; Anostraca). . Rev. Chil. Hist. Nat. Mar. 74: 65-72.
- Gajardo, G., J.A. Beardmore y P. Sorigeoloos, 2001. International study on *Artemia*. LXII. Genomic relationships between *Artemia franciscana* and *A. persimilis*, inferred from chromocentre numbers. Heredity. 87: 172-177.
- Gajardo, G., J. Crespo, A. Triantaphyllidis, A. Thika, D.A. Baxevanis, I. Kappas y T.J. Abatzopoulos, 2004. Species identification of Chilean *Artemia*

- populations based on mitochondrial DNA RFLP analysis. *J. Biogeogr.* 31: 547-555.
- Garesse, R., 1998. *Drosophila melanogaster* DNA: Gene organization and evolutionary considerations. *Genetics* 118: 649-663.
- Hontoria, F. y F. Amat, 1992. Morphological characterization of adult *Artemia* (Crustacea, Branchiopoda) from different geographical origins. American populations. *J. Plankton Res.* 14(10): 1461-1471
- Hwang, U.W. y W. Kim, 1999. General properties and phylogenetic utilities of nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematics. *Korean J. parasitol.* 37: 215-228.
- Jerry, D.R., N.P. Preston, P.J. Crocos, S. Keys, R.S. Meadows y Y. Li, 2004. Parentage determination of Kuruma Shrimp *Penaeus (Marsupenaeus) Japonicus* using microsatellite markers (Bate). *Aquaculture.* 235: 237-247.
- Kappas, I., T.J. Abatzopoulos, N.V Hoa, P. Sorgeloos y J.A. Beardmore, 2004. Genetic and reproductive differentiation of *Artemia franciscana* in a new environment. *Mar. Biol.* 146: 103–117.
- Kumar, S., K. Tamura, I.B. Jakobsen y M. Nei, 2001. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA.
- Lécher, P., D. Defaye y P. Noel, 1995. Chromosomes and nuclear DNA of Crustacea. *Invert. Reprod. and Develop.* 27(2): 85-114.
- Lenz P. H. y R.A. Browne, 1991. Ecology of *Artemia*. En: *Artemia* biology (R. A. Browne, P. Sorgeloos y C. N. A. Trotman Eds). CRC Press, Boca Raton Ann Arbor Boston, U.S.A. Chapter 10. pp. 237-253.
- Maeda-Martínez, A.M., H. Obregón-Barboza, H. García-Velazco y M.A. Prieto-Salazar, 2002. Branchiopoda: Anostraca En: Biodiversidad, taxonomía y biogeografía de Artrópodos de México (J. Liorene y J.J. Monroe Eds). Univ. Naci. Autó. Méx. (UNAM), México, D. F.: 305-322.
- Mayer, R.J., 2002. Morphology and biometry of three populations of *Artemia* (Branchiopoda: Anostraca) from the Dominican Republic and Puerto Rico. *Hydrobiologia.* 486: 29-38.

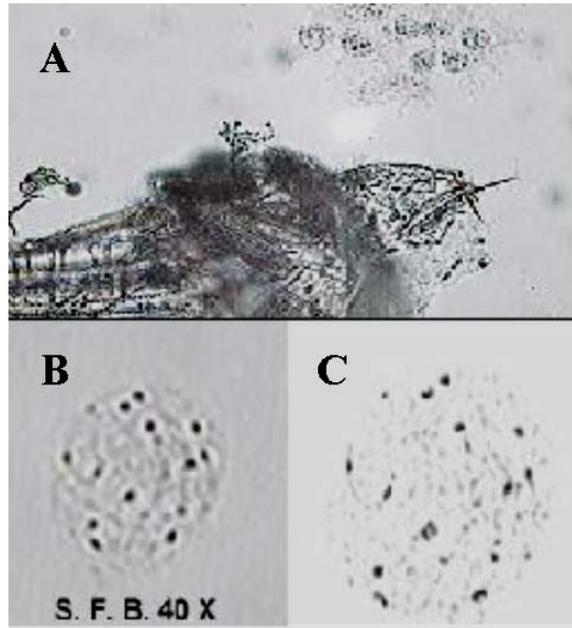
- Moran, R., 1976. *Haploppapus enormidens* (compositae). A new species from Baja California, México. *Phytologia*. 34: 371-374.
- Murugan, G., A.M. Maeda-Martínez, H. Obregón-Barboza y N.Y. Hernández-Saavedra, 2002. Molecular characterization of the tadpole shrimp *Triops* (Branchiopoda: Notostraca) from the Baja California Peninsula, Mexico: New insights on species diversity and phylogeny of the genus. *Hydrobiologia*. 486:101-113.
- Naegel, L.C.A. y S.A. Rodríguez, 2002. Ecological observations and biomass proximate composition of the brine shrimp *Artemia* (Crustacea: Anostraca) from Pichilingue, Baja California Sur, Mexico. *Hydrobiologia* 486: 185-190.
- Nei, M. y S. Kumar, 2000. Molecular evolution and phylogenetics. University Press. Oxford, U.S.A. 352 pp
- Palumbi, S.R., A.P. Martin, S. Romano, W.O. McMillan, L. Stice y G. Grabowski, 1991. The simple fool's Guide to PCR. Special publication of department of zoology, University of Hawaii, Honolulu Hawaii, U.S.A.,. 28 pp.
- Papeschi, A.G., R.G. Cohen, X.I. Pastorino y F. Amat, 2000. Cytogenetic proof that the brine shrimp *Artemia franciscana* (Crustacea Branchiopoda) is found in Argentina. *Hereditas*. 133: 159-166.
- Pérez, M.L., J.R. Valverde, B. Batuecas, F. Amat, R. Marco y R. Garesse, 1994. Speciation in the *Artemia* Genus: Mitochondrial DNA Analysis of bisexual and parthenogenetic brine shrimps. *J. Mol. Evol.* 38: 156-168.
- Rodríguez, G.S., A.G. Papeschi y R.G. Cohen, 1998. Mitotic and meiotic chromosomes of *Artemia* (Branchiopoda) from populations of la Pampa province, Argentina. *J. Crust. Biol.* 18(1): 36-41.
- Sorgeloos P., P. Lavens, P. Léger., W. Tackaert y D. Versichele, 1986. Manual for the culture and use of brine shrimp *Artemia* in aquaculture. 301 pp.
- Sorgeloos, P., P. Dhert y P. Candreva, 2001. Use of the brine Shrimp, *Artemia* spp., in marine fish larviculture. *Aquaculture*. 200: 147-159.
- Schubart, C.D., J.E. Neigel y D.L. Felder, 2000. Use of the mitochondrial 16S rRNA gene for phylogenetic and population studies of Crustacea. *Crustacean issues*. 12: 817-830.

- Schwenk, K., 1993. Interspecific hybridization in *Daphnia*: Distinction and origin of hybrid matriline. *Mol. Biol. Evol.* 10(6): 1289-1302.
- Taylor, J.D., T.L. Finston y P.D.N. Hebert, 1998. Biogeography of a widespread freshwater crustacean: Pseudocongruence and cryptic endemism in the North American *Daphnia laevis* complex. *Evolution* 52(6): 1648-1670.
- Torrentera, L. y S.I. Dodson, 1995. Morphological diversity of populations of *Artemia* (Branchiopoda) in Yucatan. *J. Crust. Biol.* 15: 86-102.
- Torrentera, L. y F.A. Abreu-Grobois, 2002. Cytogenetic variability and differentiation in *Artemia* (Branchiopoda: Anostraca) populations from the Yucatán Peninsula, México. *Hydrobiologia*. 486: 303-314.
- Triantaphyllidis, G.V., T.J. Abatzopoulos, E. Miasa y P. Sorgeloos, 1996. International study on *Artemia*. LVI. Characterization of two *Artemia* populations from Namibia and Madagascar: cytogenetics, biometry hatching characteristics and fatty acid profiles. *Hydrobiologia* 335: 97-106.
- Triantaphyllidis, G.V., G.R.J. Criel, T.J. Abatzopoulos, K.M. Thomas, J. Peleman, J.A. Beardmore y 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 y P. Sorgeloos, 1998. Review of the biogeography of the genus *Artemia* (Crustacea, Anostraca). *Jour. of Biogeogr.* 25: 213-226.
- Valverde, J.R., B. Batuecas, C. Moratilla, R. Marco y R. Garesse, 1994. The complete mitochondrial DNA sequence of the crustacean *Artemia franciscana*. *J. Mol. Evol.* 39: 400-408.
- Wolstenholme, D.R., y D.O. Clary, 1985. Sequence evolution of *Drosophila* mitochondrial DNA. *Genetics* 109, 725-744.
- Zar, H.J., 1999. *Bioestadistical analyses*. Ed. Prentice Hall, Third ed., E.U.A. 660 pp

ANEXOS

Anexo 1. Localización de las poblaciones estudiadas.

San Francisco Bay (SFB), Pichilingue B. C. S. Mex. (PCH) y Yavaros Son. (YAV). Modificado de Hontoria y Amat (1992).



Anexo 2. A: disociación celular de un nauplio. B y C muestran cromocentros en células interfásicas de la población SFB.

LOCUS	SFB
ORIGIN	477 bases.
1	CTTTGGGAGG TCGAGCCTGC CCACTGATGA ATTAAAGGGC CGTGGTATAC TGACCATGCG
61	AAGGTAGCAT AATCATTAGC CTTTTGATTT GAGGCTGGAA TGAATGGTTT GACGAGAGAT
121	GGTCTGTCTC TTCGATTAAA TTGAAGTTAA TCTTTAAGTG AAAAAAGCTTA AATGTACTTG
181	GAGGGCGATA AGACCCTATA GATCTTTACA TTAAATTCTT TTGTCTTGCG GTAGGTAATT
241	AGACAGAGTA AAACAATGTT CGGTTGGGGC GACGGTAAGA ACAGAATAAA CACTTACAAC
301	ATAAACACAT CAATAAATGA CCATTGATCC TTAGATGAAT AAAGACCAAG TTACCTTAGG
361	GATAACAGCG TAATTCTTTT TGAGAGTTCA AATCGACAAA AGAGTTTGCG ACCTCGATGT
421	TGGTTCAGGG ACCCTACTCG GTGCAGCAGC CTAGAGAGGC AGTCTGTTTCG ACTGTTA

Anexo 3. Secuencia de la región del gen 16S ADNmt de *Artemia franciscana*, San Francisco Bay (SFB) y C5 (♂ YAV x ♀ SFB).

LOCUS PCH
 ORIGIN 477 bases.

```

1   CTTTGGGAGG TCGAGCCTGC CCACTGATGA ATTAAGGGC CGTGGTATAC TGACCATGCG
61  AAGGTAGCAT AATCATTAGC CTTTTGATTT GAGGCTGGAA TGAATGGTTT GACGAGAGAT
121 GGTCTGTCTC TTCGATTAAA TTGAAGTTAA TCTTTAAGTG AAAAAGCTTA AATGTACTTG
181 GAGGGCGATA AGACCCTATA GATCTTTACA TTTAATTCTT TTGTCTTGCG GTAGGTAATT
241 AGACAGATTA AAACAATGTT TGGTTGGGGC GACGGTAAGA ACAGAATAAA CACTTACAAC
301 ATAAACACAT CAATAAATGA CCATTGATCC TCAGATGAAT AAAGACCAAG TTACCTTAGG
361 GATAACAGCG TAATTCTTTT TGAGAGTTCA AATCGACAAA AGAGTTTGCG ACCTCGATGT
421 TGGTTCAGGG ACCCTACTCG GTGCAGCAGC CTAGAGAGGC AGTCTGTTTCG ACTGTTA

```

Anexo 4. Secuencia de la región del gen 16S ADNmt de Pichilingue (PCH) y C4 (♀ PCH x ♂ YAV)

LOCUS YAV
 ORIGIN 477 bases.

```

1   CTTTGGGAGG TCGAGCCTGC CCACTGATGA ATTAAGGGC CGTGGTATAC TGACCATGCG
61  AAGGTAGCAT AATCATTAGC CTTTTGATTT GAGGCTGGAA TGAATGGTTT GACGAGAGAT
121 GGTCTGTCTC TTCGATTAAA TTGAAGTTAA TCTTTAAGTG AAAAAGCTTA AATGTACTTG
181 GAGGGCGATA AGACCCTATA GATCTTTACA TTTAATTTTTT TTGTCTTGCG GTAGGTAATT
241 AGACAGATTA AAACAATGTT CGGTTGGGGC GACGGTAAGA ACAGAATAAA CACTTACAAC
301 ATAGACACAT CAATAAATGA CCATTGATCC TCAGATGAAT AAAGACCAAG TTACCTTAGG
361 GATAACAGCG TAATTCTTTT TGAGAGTTCA AATCGACAAA AGAGTTTGCG ACCTCGATGT
421 TGGTTCAGGG ACCCTACTCG GTGCAGCAGC CTAGAGAGGC AGTCTGTTTCG ACTGTTA

```

Anexo 5. Secuencia de la región del gen 16S ADNmt de Yavaros (YAV), C3 (♂ PCH x ♀ YAV) y C6 (♀ YAV x ♂ SFB).