

Tesis de Posgrado

Caracterización morfológica y reproductiva de la población de *Artemia persimilis* (crustacea branchiopoda: Anostraca) de la Laguna Colorada Chica

Pastorino, Ximena Inés

2003

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Pastorino, Ximena Inés. (2003). Caracterización morfológica y reproductiva de la población de *Artemia persimilis* (crustacea branchiopoda: Anostraca) de la Laguna Colorada Chica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3595_Pastorino.pdf

Cita tipo Chicago:

Pastorino, Ximena Inés. "Caracterización morfológica y reproductiva de la población de *Artemia persimilis* (crustacea branchiopoda: Anostraca) de la Laguna Colorada Chica". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2003.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3595_Pastorino.pdf

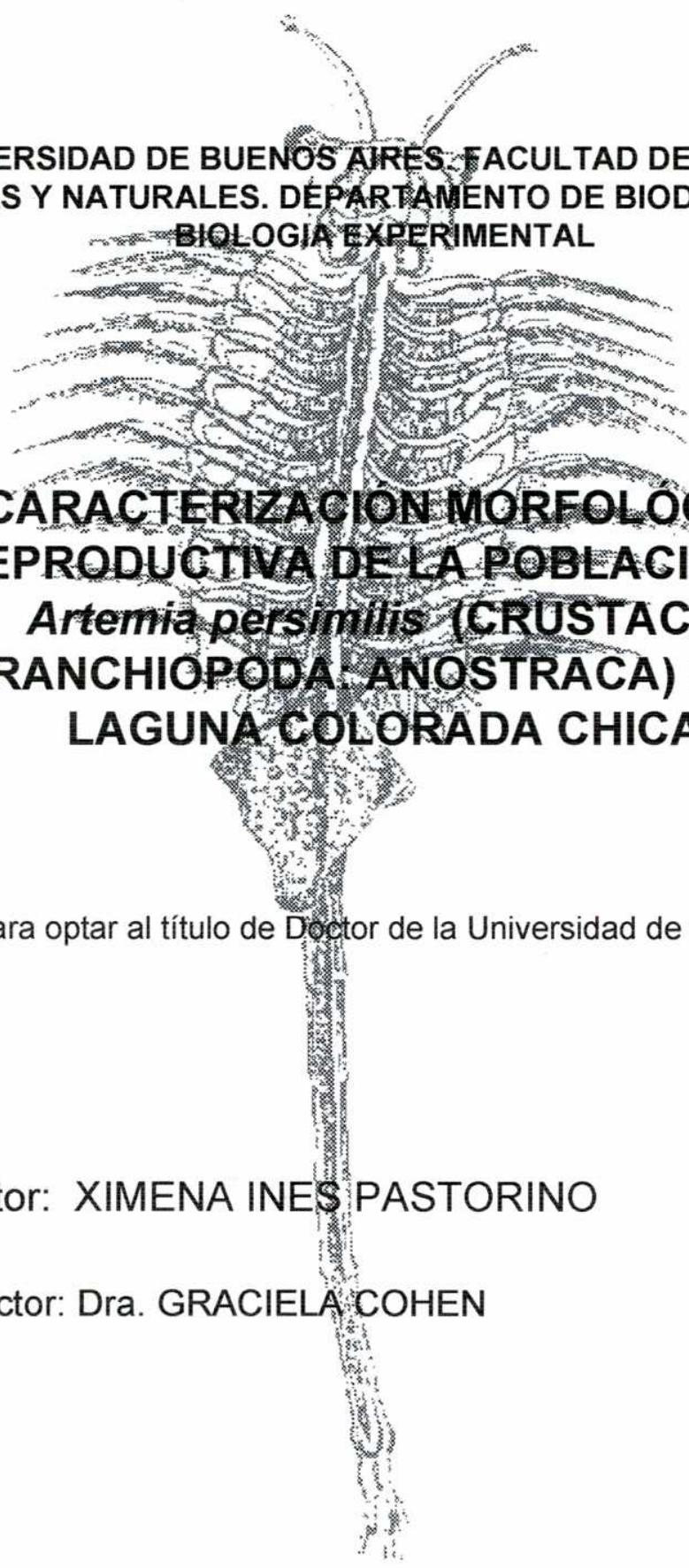
EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES. FACULTAD DE CIENCIAS
EXACTAS Y NATURALES. DEPARTAMENTO DE BIODIVERSIDAD Y
BIOLOGIA EXPERIMENTAL

**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y
REPRODUCTIVA DE LA POBLACIÓN DE
Artemia persimilis (CRUSTACEA
BRANCHIOPODA: ANOSTRACA) DE LA
LAGUNA COLORADA CHICA.**

Tesis para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

Autor: XIMENA INES PASTORINO

Director: Dra. GRACIELA COHEN

No 3595

2003

Resumen

Los crustáceos anostracos del género *Artemia* se encuentran globalmente distribuidos en todos los continentes excepto la Antártica. A pesar de la amplia distribución del género, los hábitats que puede ocupar se encuentran restringidos a salinas y lagos o lagunas salados, donde la salinidad puede variar ampliamente entre 30 y 300 g l⁻¹. Estos crustáceos anostracos, son utilizados habitualmente en Acuicultura, como presa viva en la cría de peces y crustáceos marinos y/o de agua dulce de interés comercial.

El género *Artemia* muestra una notable flexibilidad reproductiva que le permite adecuarse a las más diversas presiones de selección del medio; variando el tipo de descendencia que es liberada al medio en forma de quistes o larvas vivas, (reproducción ovípara u ovovivípara), y distribuyendo temporalmente la descendencia durante el período reproductivo. La reproducción es generalmente bisexual, aunque en *Artemia* puede presentarse también partenogénesis; en este último caso ambas modalidades son excluyentes. Esta variedad de estrategias reproductivas, sumada al potencial económico de este recurso natural, resalta la necesidad de profundizar el conocimiento de la biología de la reproducción de cada población.

Esta tesis analiza en detalle la biología reproductiva de *Artemia*, realizando la caracterización morfológica, morfométrica y reproductiva de una población Argentina localizada en la provincia de La Pampa. Los resultados obtenidos nos permiten confirmar la ubicación taxonómica de la población de *Artemia* de la laguna Colorada Chica dentro de la especie *A. persimilis* mediante el uso de caracteres morfológicos simples y morfometría. Se caracterizaron los 5 estadios que forman parte del ciclo reproductivo de las hembras y se determinaron las fases que forman parte del ciclo de puesta, como resultado de la superposición de ciclos reproductivos sucesivos. El ciclo reproductivo tiene una duración aproximada de 6 días y presenta dos períodos principales, uno que transcurre en los ovarios (aproximadamente 3 días) y otro que transcurre en los oviductos y el útero. Mediante el análisis del comportamiento reproductivo de las hembras mantenidas en estado virginal (aisladas de machos) se descartó la presencia de partenogénesis como una modalidad reproductiva de esta población. El estudio de las variables reproductivas reveló la presencia de un mayor porcentaje de oviparismo que ovoviviparismo, encontrándose hembras que fueron capaces de presentar estas dos modalidades reproductivas en camadas sucesivas. Las hembras criadas en diferentes condiciones de salinidad presentaron un mayor rendimiento reproductivo en la salinidad de 90 g l⁻¹, medido en función del número total de descendientes producidos por una hembra y al número total de puestas. Finalmente, un estudio a nivel microscópico, realizado en hembras y machos de las especies *A. persimilis* y *A. franciscana*, permite describir la morfología de la zona involucrada en el abrazo copulatorio.

Agradecimientos

A mi directora de tesis, Dr. Rosa Graciela Cohen. Por guiarme científicamente y por su dedicación a lo largo de todo este tiempo.

A mi madre. Por apoyarme en este emprendimiento y sentirse cada día mas orgullosa de "su nena".

A Tomas, mi esposo y compañero incondicional. Por estar siempre y tener la paciencia infinita para soportarme en los malos momentos. Espero que me alcance la vida para que sigamos disfrutándola juntos como lo hacemos ahora. Gracias hasta "el infinito y más allá".

A mis hermanos. Federico, gracias por las infinitas horas que compartimos delante de la computadora haciendo presentaciones. Virginia, por seguir luchando y agrandar la familia dándonos esos hermosos sobrinos y ese cuñado que es un genio. A los dos, por estar a mi lado y ayudarme a no aflojar en los momentos de desesperación.

A Josefina. Por ayudarme a soñar con esta tesis desde siempre y no dejarme caer en la tentación de las cosas negativas.

A Martín y Mercedes. Por los llamados telefónicos inesperados que siempre nos levantan el animo. Tendré muchos asaditos de domingo para agradecerles.

A Jorge. Por compartir el vicio y la familia (Los Reca). La navidad no es lo mismo desde que nos juntamos todos.

A Mario y su papá. Por estar siempre en "internet" y compartir sus conocimientos de computación. Las primeras fotos de mi tesis sen ven gracias a ustedes.

A mis amigas, las de la facu y de la vida. *Daniela*, por ser el referente de mi pasado y ayudarme a recordar siempre todo lo que he luchado. *Pato*, por las asesorias de cocina, estadísticas, de vestuario, etc. *Juliana*, por ser así, tan loca y cuerda a la vez. *Julia*, por compartir la desesperación y las alegrías de escribir la tesis. *Irene*, por los consejos y comprender cuando es hora de aflojar la cuerda. *Verónica*, por las horas de comunicación electrónica y enseñarme a usar el "Origin". *Paloma*, por enseñarnos que las amigas como nosotras solo se fabrican en Argentina. *Emilia*, por decirme siempre "diosa" y enseñarme la danza del vientre. *Ana*, por compartir "esos" cursos de postgrado. *Patri*, por que aun cuando estas siempre colgada de la palmera, sé que puedo contar con vos. *A todas*, por engancharse siempre en mis proyectos delirantes y por quererme como me quieren. Amigas como ustedes no se encuentran en la primera esquina y así como no se encuentran, no se preocupen que, no pienso perderlas.

A mis compañeros de trabajo y profesores de la facultad. *Graciela E.*, por aclararme las dudas y alentarme para seguir adelante. *Quique M.*, por la paciencia estadística, el pequeño cordero pascual te estará eternamente agradecido. *Pablo P.*, por brindarme siempre todo el apoyo que estuvo a tu alcance y por hablar de frente. *Daniel N.*, por los mail tranquilizadores, las lecturas correctoras, los mapas y las figuras. *Silvia M.*, por los preprácticos compartidos y el apoyo constante.

A Gustavo y Verónica. Por el aguante permanente, el resumen, las conclusiones, las ideas. Son muchas las cosas por que agradecerles.

Al CONICET. Por brindarme el apoyo económico para realizar esta tesis.

1. Introducción General.

1.1- Ubicación taxonómica del grupo en estudio	1
1.2- Generalidades de la clase Branchiopoda	1
1.3- Características generales del orden Anostraca	3
1.3.1- Morfología	3
1.3.2- Historia natural	7
1.3.3- Distribución geográfica	10
1.4- La familia Artemiidae	11
1.5- El género Artemia	11
1.5.1- Taxonomía del género Artemia	13
1.5.2- Ciclo ontogenético	16
1.5.2.1- Estadios en el desarrollo post-embrionario	17
Período naupliar: estadios larvales 1 a 2	18
Período metanaupliar: estadios larvales 3 a 5	18
Período post-metanaupliar: estadios larvales 6 a 12	20
Período post-larval (estadios larvales 13 a 17)	20
1.5.3- Sistema reproductor de Artemia	21
1.5.3.1- Masculino	21
1.5.3.2- Femenino	22
Glándulas de la cáscara. La envoltura terciaria	23
1.5.4- Modalidades reproductivas. Oviparismo y ovoviviparismo	24
1.5.4.1- Detención del desarrollo embrionario: diapausa y quiescencia	24
La trehalosa	26
1.5.5- Tácticas reproductivas	26
1.5.5.1- Variación en la modalidad reproductiva	26
1.5.5.2- Distribución temporal de la descendencia	27
1.5.6- Costo reproductivo	28
1.5.7- Claves en el apareamiento	29
1.5.8- Distribución mundial	31
1.5.8.1- Localización del género Artemia en Argentina	32
1.5.9- Ecología y variabilidad poblacional	34
1.5.9.1- Aislamiento ecológico	36
1.5.10- Importancia económica	37

2. Hipótesis y Objetivos.

2.1- Hipótesis principales	40
2.2- Objetivos	41

3. Materiales y Métodos

3.1- Animales	42
3.2- Obtención de quistes	44
3.3- Eclosión	45
3.4- Cría de los animales	46
3.4.1- Alimentación	47
3.4.2- Sexado de los animales utilizados en las experiencias reproductivas	47

4. Resultados y Discusión

4.1 Nuevos aportes a la caracterización morfológica de la población de Artemia de la laguna Colorada Chica, y confirmación de su identidad específica.

Introducción.....	49
Metodología.....	51
Resultados.....	55
Morfología.....	55
Antena 2 de los machos.....	55
Segmentos genitales de las hembras.....	57
Morfometría.....	60
Discusión y conclusiones.....	70

4.2 Caracterización reproductiva de la población de A. persimilis de la laguna Colorada Chica.

Introducción.....	71
4.2.1- Morfología y secuencia de los estadios dentro del ciclo reproductivo.....	73
Metodología.....	73
Resultados.....	74
Descripción y secuencia de los estadios en el ciclo reproductivo.....	74
Puestas ovíparas y ovovivíparas. Variables reproductivas.....	80
Observaciones sobre las glándulas de la cáscara.....	81
Discusión y conclusiones.....	82
4.2.2- Determinación de la variación horaria en la proporción de estadios dentro del ciclo reproductivo.....	83
Metodología.....	83
Resultados.....	84
Discusión y conclusiones.....	87
4.2.3- Duración de los estadios dentro del ciclo reproductivo en hembras mantenidas en pareja y hembras aisladas de machos. Comparación de características reproductivas.....	88
Metodología.....	88
Resultados.....	90
Duración de los estadios en el ciclo reproductivo.....	90
Comparación del rendimiento reproductivo entre hembras mantenidas en pareja y hembras aisladas.....	93
Características reproductivas que presentan las hembras virginales.....	95
Discusión y conclusiones.....	96
4.2.4- Características de las principales fases dentro del ciclo reproductivo y el ciclo de puesta.....	98
Metodología.....	98
Resultados y Conclusiones.....	100
Fases con oocitos en los ovarios:.....	100
Fases con oocitos en los oviductos:.....	103
Fases con oocitos u embriones en el ovisaco:.....	107
Características del abrazo copulatorio.....	109

4.3 Respuesta de las variables reproductivas y del ciclo de vida a diferentes tratamientos salinos, registrada en animales de *A. persimilis* de la laguna Colorada Chica

Introducción	111
4.3.1- Efecto de un shock salino o un cambio gradual de salinidad en los primeros estadios larvales, medido en el rendimiento reproductivo de las hembras adultas.	114
Metodología	114
Resultados	116
Discusión y conclusiones	120
4.3.2- Efecto de diferentes shocks salinos sobre el rendimiento reproductivo de las hembras adultas.	122
Metodología	122
Resultados	124
Discusión y conclusiones	137
Consideraciones Ecológicas	140

4.4 Comportamiento reproductivo en *Artemia persimilis*. Estudio de la morfología del abrazo copulatorio en *A. franciscana* y *A. persimilis*.

Introducción	142
Metodología	144
Resultados y conclusiones	146
Comportamiento reproductivo	146
Comportamientos anómalos en los machos de <i>A. persimilis</i>	148
Morfología de la zona involucrada en el abrazo copulatorio en <i>A. franciscana</i> y <i>A. persimilis</i>	150
Machos	150
Hembras	152
Comparación de la morfología del amplexo entre <i>A. persimilis</i> y <i>A. franciscana</i>	154
Discusión y conclusiones	163

5. Conclusión General

5.1. Confirmación de la identidad específica de la población de <i>Artemia</i> de la laguna Colorada Chica	165
5.2. Caracterización reproductiva de la población de <i>A. persimilis</i> de la laguna Colorada Chica.	166
Influencia del abrazo del macho (amplexo) sobre el comportamiento reproductivo de las hembras.	167
Duración de los estadios que constituyen el ciclo reproductivo en la población <i>A. persimilis</i> de la laguna Colorada Chica.	168
5.3. Influencia de diferentes tratamientos salinos sobre las variables reproductivas y del ciclo de vida en la población <i>A. persimilis</i> de la laguna Colorada Chica.	168
5.4. Comportamiento de cópula en <i>Artemia</i>	170
Morfología del abrazo precopulatorio en <i>Artemia</i>	170

6. Referencias

Prólogo

En nuestro país el conocimiento de la biota de los cuerpos de agua salados es incipiente y ha despertado hasta el momento poco interés. Probablemente esto es consecuencia de la relativa inaccesibilidad y/o de la baja diversidad biológica de estos biotopos, ya que muy pocos organismos pueden tolerar condiciones ambientales tan desfavorables. Sólo ha habido emprendimientos interesados en estos ambientes como fuente de productos minerales u orgánicos o, por su valor recreativo y estético (Williams, 1996), y como reservas naturales de biodiversidad (Williams, 2000). Sin embargo, estos biotopos cuentan con una fauna y flora halófilas características y de alto grado de endemismo, con interesantes adaptaciones a condiciones ambientales extremas. Los “camarones de la salmuera” (*brine shrimp*) crustáceos anostracos del género *Artemia*, son de sus habitantes más conspicuos. Estos organismos constituyen un recurso natural de preferencia utilizado en todo el mundo y a gran escala en acuicultura, como presa viva en la cría de peces y crustáceos marinos y de agua dulce, de interés comercial. Debido al creciente incremento a partir de la década del 80’ de la demanda mundial de *Artemia* para su aplicación a la piscicultura y camaronicultura, la disponibilidad y la calidad de las fuentes tradicionales, Bahía San Francisco (California) y Gran Lago Salado (Utah) en EE.UU., han ido disminuyendo considerablemente (Amat *et al.*, 1990). El panorama se ha complicado aún más a partir de 1997, ya que un organismo de control, la UDWR (Utah División of Wildlife Resources), ha determinado una veda (por debajo de cierta densidad mínima) en la cosecha en el Gran Lago Salado, debido fundamentalmente a dos razones que afectaron la disponibilidad del recurso: la sobre-explotación y la dilución de la salinidad del lago como consecuencia de lluvias excepcionales derivadas del fenómeno de “El Niño” que permitieron la aparición de predadores (Abelin, 1997). Ante la gran vulnerabilidad e imposibilidad de control de la principal fuente mundial de quistes (van Stappen, 1997), se ha iniciado recientemente en todo el mundo una intensa actividad de localización y estudio de nuevas poblaciones de *Artemia* que ofrezcan fuentes

alternativas de explotación. En este sentido nuestro país presenta muy buenas perspectivas, teniendo en cuenta las grandes superficies de cuerpos de agua salados que podrían sustentar poblaciones de este crustáceo tanto en forma de quistes (embriones criptobióticos) como en forma de larvas y / o adultos (Drago & Quirós, 1996).

El desarrollo de la acuicultura en Argentina ha estado tradicionalmente limitado a plantas piloto o emprendimientos comerciales menores, probablemente debido a la fuerte tradición en el consumo interno y la exportación de carnes rojas. En nuestro país el consumo de peces y /o crustáceos como fuente proteica no es parte habitual de la dieta humana y, a diferencia de lo que ocurre en algunos países latinoamericanos como Chile, Ecuador, Perú y Brasil, tampoco forma parte de la alimentación de los sectores de menos recursos. Por el contrario, es considerado como un plato exquisito, no frecuente y propio de sectores de mayor poder adquisitivo (Saint-Paul, 1992).

Desde 1980 y debido a su disponibilidad, facilidad de cría y conservación, las especies de *Artemia* han sido el "caballito de batalla experimental" en numerosas áreas del conocimiento básico (genética, morfología, taxonomía, biología celular, biología molecular, bioquímica, etc.) y fundamentalmente aplicado (ecología, toxicología, acuicultura, etc.). Por ello tienen especial importancia: la correcta identificación específica de cada población, su caracterización reproductiva y la forma en que la variación local de los factores ambientales, particularmente la salinidad, afecta las diversas variables reproductivas. Aún cuando los datos de campo son limitados, los resultados obtenidos a partir de la cría de los animales en el laboratorio bajo condiciones estandarizadas pueden aportar una información valiosa sobre las diferentes estrategias reproductivas de las poblaciones silvestres, bajo diversos regímenes climáticos.

El conocimiento de estos aspectos en cada población argentina de *Artemia*, permitirá comprender mejor los mecanismos de adaptación al hábitat de estos anostracos; podrá facilitar la elección de la población más adecuada para ser utilizada en técnicas de inoculación artificial (ya bastante extendidas) para

generar nuevas poblaciones en ambientes desprovistos naturalmente de este crustáceo; finalmente, también permitirá hacer una evaluación de la calidad del recurso (% oviparismo; tamaño de quistes y larvas; fertilidad; cantidad de puestas/ hembra, etc.) para atender adecuadamente las demandas del mercado. Los registros argentinos sobre *Artemia* han sido hasta hace poco tiempo muy escasos (Birabén, 1954; Guiñazú, 1960) hasta que recientemente nuestro equipo de investigación bajo la dirección de la Dra. Rosa Graciela Cohen, empezó a desarrollar un proyecto sobre la localización e identificación específica de las poblaciones argentinas de este crustáceo, en cooperación con grupos de investigación de otras partes del mundo (Proyectos UBACYT, Proyecto ICI de la AEI, Proyecto CYTED, Proyecto INCO de la Unión Europea) dando un importante impulso al tema y produciendo los primeros resultados. (Amat *et al.*, 1994; Cohen, 1995, 1998; Cohen & Amat, 1998 a y b; Rodríguez Gil *et al.*, 1998; Cohen *et al.* 1999 a, b; Papeschi *et al.*, 2000; Pastorino *et al.*, 2002).

En el presente trabajo se analizan diversos aspectos de la biología reproductiva de *Artemia* y se hace particularmente la caracterización morfológica, morfométrica y reproductiva de una población Argentina de *Artemia* de la provincia de La Pampa.

1. Introducción General

1.1- Ubicación taxonómica del grupo en estudio

Phylum Arthropoda

Subphylum Crustacea Pennant, 1777

Clase Branchiopoda Latreille, 1816

Orden Anostraca Sars, 1867: 8*-9** familias

Fam. Artemiidae Grochowski, 1895

Género *Artemia* Leach, 1819

Artemia persimilis Piccinelli y Prosdocimi, 1968

Artemia franciscana franciscana Kellogg, 1906

Artemia franciscana monica Verrill, 1869

Orden Notostraca Sars, 1867: 1 familia

Orden Spinicaudata Linder, 1945: 4*-5** familias

Orden Laevicaudata Linder, 1945: 1 familia

Orden Anomopoda Sars, 1865: 5 familias

Orden Ctenopoda Sars, 1865: 2 familias

Orden Onychopoda Sars, 1865: 3 familias

Orden Haplopoda Sars, 1867: 1 familia

“Conchostracos”

“Cladóceros”

*Según Belk, 1982, Fryer, 1987: no se incluye fam. Artemiopsidae en Anostraca, ni fam. Limnadopseidae en Spinicaudata

** Según: Brtek, 1997

1.2- Generalidades de la clase Branchiopoda

El nivel taxonómico de los Branchiopoda ha sido alternativamente de clase o subclase según el tratamiento otorgado por diversos autores a las categorías taxonómicas superiores (Alonso, 1996).

Los branquiópodos son crustáceos generalmente pequeños, con un tamaño que varía entre un mínimo de 0.26 mm (hembra del cladócero Anomopoda *Alonella nana*) y un máximo de 100-120 mm (Anostraca: *Branchinecta gigas* y algunos Notostraca).

La mayoría de las especies habitan cuerpos de agua dulce (charcos o lagunas) generalmente temporarios aunque a veces pueden ser permanentes; algunos viven en

ambientes salinos a hipersalinos, y muy pocos son marinos (algunos cladóceros Ctenopoda y Onychopoda). No está claro si el grupo se diversificó en estos ambientes a partir de múltiples radiaciones desde el mar, o si hubo una única invasión que precedió la gran radiación morfológica del grupo en los ambientes continentales (Martin, 1992).

Los Branchiopoda constituyen un grupo extremadamente heterogéneo y muy generalizado. La gran heterogeneidad podría asociarse con un largo tiempo de evolución, ya que algunos registros fósiles asignados a los anostracos, datan del Cámbrico superior (Waloßek, 1995), y particularmente el género *Artemia* tiene un registro que se remonta al Pleistoceno (Abele, 1982). Tal vez como consecuencia de esto, muchas peculiaridades del grupo podrían considerarse como adaptaciones convergentes ante presiones de selección semejantes (homoplasias) más que homologías (Martin, 1992). Se observan, además, muchas excepciones e incluso, son más frecuentes las diferencias entre algunos taxones que las semejanzas, lo que indicaría una gran radiación adaptativa (Fryer, 1987). Además, a pesar de su organización muy generalizada, presentan algunos mecanismos complejos y estructuras altamente especializadas para sobrevivir en ambientes muy desfavorables. A pesar de las grandes diferencias morfológicas, la mayoría de los carcinólogos los consideran un taxón natural (Schram, 1986, Fryer, 1987, Martin, 1992), fundamentalmente sobre la base de una combinación de caracteres única entre los crustáceos:

larva nauplio con anténula pequeña, uniartejada, sólo con setación distal; con protopodito de la antena grande, de más de la mitad de la longitud total del apéndice

aparato de alimentación de filtro no selectivo, postmandibular; labro muy glandular, alargado posteriormente, cubriendo ventralmente las piezas bucales; mandíbulas de tipo *roller-grinding*; 2 pares de maxilas reducidas o ausentes; surco alimentario esternal; apéndices bucales y toracópodos (filopodios) con armadura setosa especialmente modificada.

espermatozoides ameboides sin acrosoma (Wingstrand, 1978).

Trabajos recientes en los que se utilizan técnicas de biología molecular (Hanner & Fugate, 1997, Spears & Abele, 1999, 2000) apoyan la monofilia del taxón.

1.3- Características generales del orden Anostraca

1.3.1- Morfología

Los anostracos son animales inermes, de cutícula muy poco esclerotizada que, como su nombre lo indica, carecen de caparazón. Los adultos miden generalmente de 1 a 3 cm, aunque pueden alcanzar 10-12 cm en la especie neártica *Branchinecta gigas*. Son generalmente de color blanquecino, aunque pueden presentar color rojo o anaranjado, verde azulado, verde brillante, etc., en todo el cuerpo o en parte de él. La coloración es inespecífica, y puede cambiar entre poblaciones de la misma especie. Frecuentemente, un sexo es blanquecino y el otro coloreado (Cohen, com. pers.). Esta coloración puede deberse a la presencia de epibiontes, a pigmentos en la cutícula o epidermis, al alimento ingerido o a pigmentos circulantes.

Poseen un cuerpo alargado dividido en tres tagmas bien diferenciados, que en la clase reciben los nombres de cabeza (céfalon), tórax y abdomen. La cabeza (Fig. 1 A) es corta y redondeada; posee cinco somitos. En la parte anterior se encuentra el ojo naupliar impar y lateralmente se desarrolla un par de ojos compuestos pedunculados.

Lleva dos pares de antenas unirramosas: un par de anténulas o antenas 1, delgadas y no segmentadas; un par de antenas o antenas 2 con un dimorfismo sexual muy notable: no segmentadas y bastante reducidas en las hembras; robustas, biarticuladas y modificadas para el abrazo copulatorio en los machos.

Las mandíbulas, de tipo “*roller-grinding*”, con palpos reducidos (Cohen, 1989 (1991)), son simétricas o asimétricas.

Con 2 pares de maxilas reducidas o vestigiales.

El labro, flexible, está provisto de glándulas secretoras; se proyecta posteriormente por debajo de la región maxilar y limita la boca ventralmente.

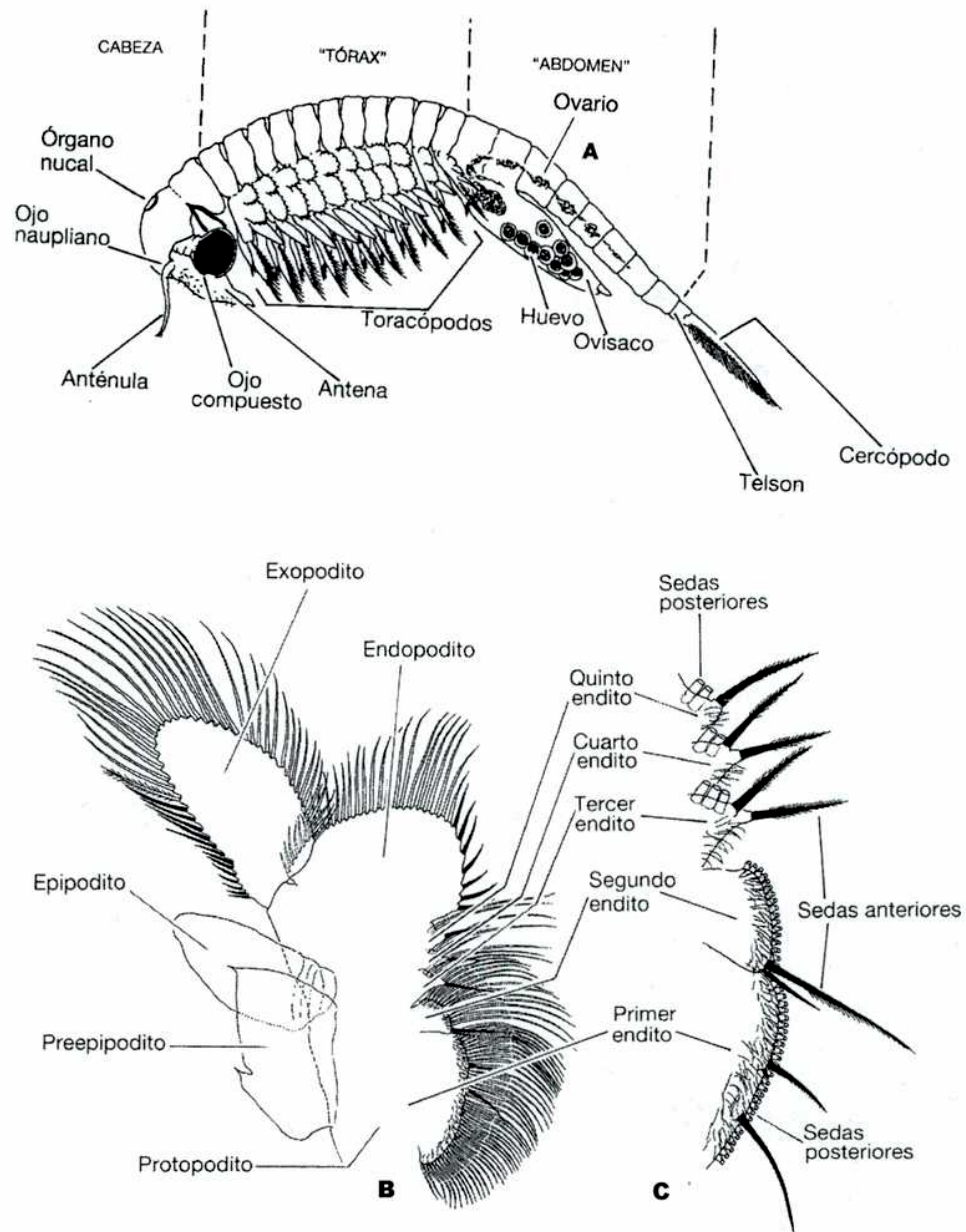


Figura 1. Morfología general de Anostraca. (A) Vista lateral de una hembra, (B) Filopodio, (C) Detalle de las enditas del filopodio (Tomado de Alonso M., 1996).

El tórax (Fig. 1 A) presenta generalmente 11 somitos, cada uno con un par de apéndices foliáceos dirigidos ventralmente y muy similares entre sí. La estructura de los toracópodos corresponde al tipo filopodial (Fig. 1 B) con un protopodito basal, que lleva distalmente dos lóbulos setosos: un exopodito externo y un endopodito interno (Fig. 1 C). En la porción proximal del protopodito se desarrollan: hacia el lado interno, cinco enditas cortas, con una armadura setosa característica; hacia el lado externo, un epipodito osmorregulador y un preepipodito simple o dividido parcial o totalmente. Los esternitos de los segmentos torácicos son ventralmente cóncavos, formando entre las bases de los filopodios, el surco alimentario longitudinal ventral.

El abdomen posee ocho segmentos desprovistos de apéndices y un segmento anal (9° somito ó telson) que lleva un par de urópodos o ramas furcales. Los dos primeros segmentos, segmentos genitales, están parcialmente fusionados. En el macho, estos segmentos presentan un par de penes bien desarrollados (Fig. 2 B) con una parte basal rígida y otra apical retráctil. En la hembra, presentan un único saco ovígero más o menos alargado posteriormente (Fig. 1 A).

En una resumida descripción de la anatomía interna podemos destacar que el sistema nervioso consta de un cerebro rudimentario seguido de una cadena nerviosa con 13 ganglios metaméricos (sistema nervioso en escalera). Los primeros once ganglios inervan la región torácica y los dos últimos son los ganglios genitales. El sistema circulatorio es abierto, con un vaso dorsal extendido longitudinalmente, con ostíolos metaméricos. Presentan una hemolinfa formada por plasma, hemoglobina disuelta y células incoloras ameboideas. El aparato digestivo empieza en la boca ventral, sigue en un esófago vertical que alcanza la parte dorsal de la cabeza y se dilata en un par de sacos digestivos; a partir de allí se inicia un intestino rectilíneo que desemboca en el ano, localizado posteriormente en una invaginación del segmento anal o telson, entre los urópodos o ramas furcales.

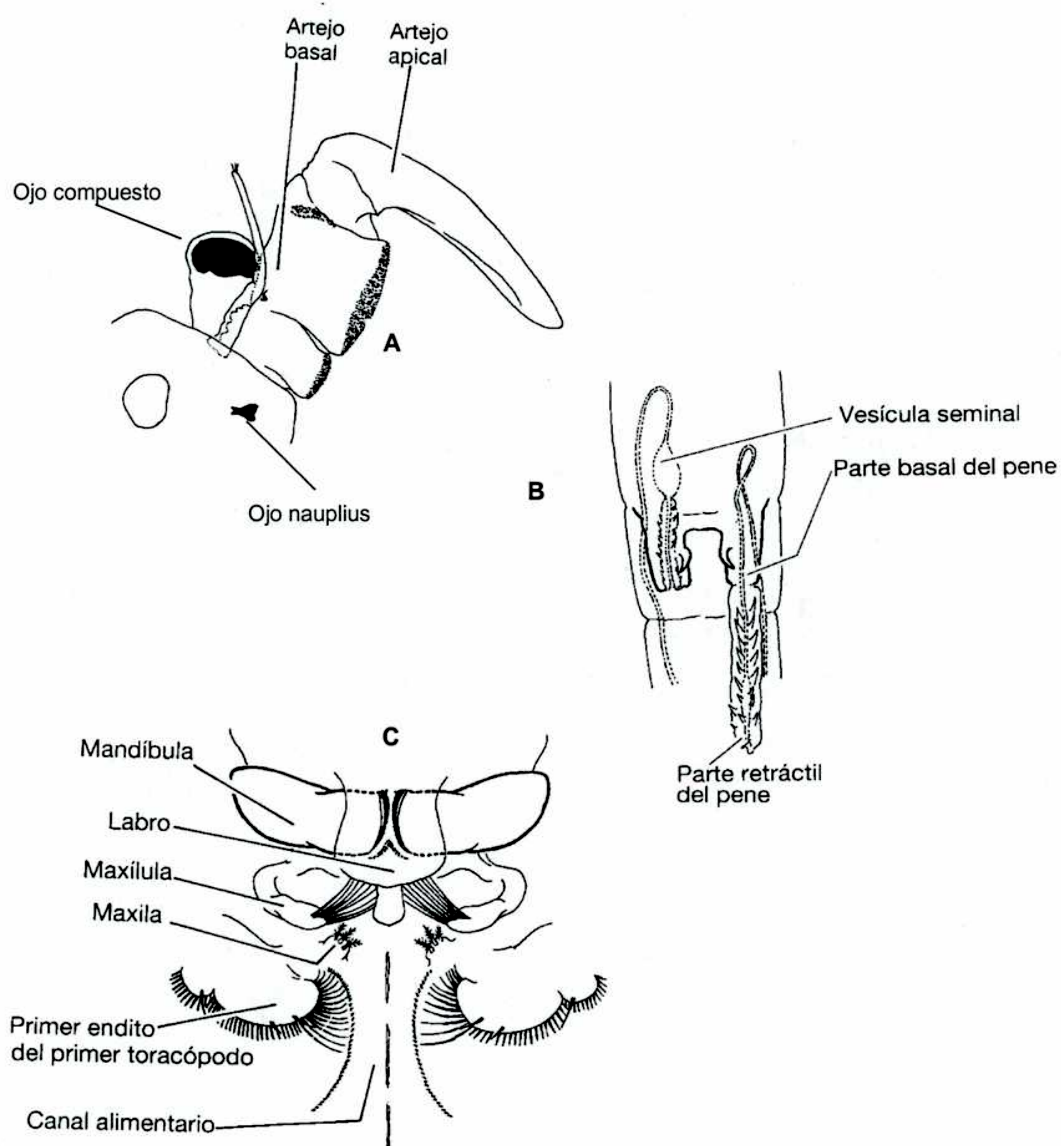


Figura 2. Morfología general de Anostraca. (A) Antena 2 izquierda del macho, vista anterior, (B) Vista ventral de los segmentos genitales del macho, donde se encuentran los penes, (C) Vista ventral de la cabeza mostrando los apéndices cefálicos utilizados en la alimentación (Tomado de Alonso M., 1996).

En el macho un par de testículos alargados se extienden a lo largo del abdomen hasta el primer somito genital; los vasos deferentes se dirigen en sentido anterior y, en conexión con los penes, pueden o no dilatarse para formar un par de vesículas seminales (Fig. 2 B). En la hembra, dos pares de ovarios, también alargados longitudinalmente, pueden extenderse posteriormente por un número diverso de segmentos, o bifurcarse en una porción torácica que se extiende anteriormente y una porción abdominal que se extiende posteriormente. Los ovarios conectan con un par de oviductos laterales que desembocan en un útero impar, contenido en el ovisaco. Allí también desembocan las secreciones de las glándulas de la cáscara, que recubren los huevos (quistes), formando el corion o cáscara que les permite soportar condiciones de stress ambiental.

1.3.2- Historia natural

Los anostracos viven limitados a aguas con pocos depredadores ya que son presa fácil debido a su tamaño macroscópico, movimiento predecible, y su carencia de estructuras defensivas. Se ha sugerido que el escape a la predación fue una de las fuerzas más importantes que impulsó la evolución de sus complicadas estrategias de supervivencia (Brendonck & Persoone, 1993) y su adaptación a ambientes muy desfavorables e inestables. En estos cuerpos de agua extremos, sometidos constantemente a grandes variaciones ambientales diarias y estacionales que en algunos casos llevan a la desaparición completa del hábitat, muy pocos organismos son capaces de sobrevivir, incluyendo los posibles predadores. Estos biotopos de muy baja biodiversidad, son de extensión muy diversa, desde charcos a lagunas generalmente temporarios o efímeros, de agua dulce o salobre hasta lagunas o lagos salados y salinas costeras o continentales. Dentro del grupo *Artemia* es uno de los pocos anostracos que frecuenta típicamente ambientes con salinidades que van desde 20 a 300 g l⁻¹.

El desplazamiento y la alimentación se realizan conjuntamente mediante el batido de los filopodios. Mientras el animal se traslada con su parte ventral hacia arriba, los filopodios van filtrando y reteniendo partículas (fitoplancton, bacterias, protozoos,

detritos orgánicos, arcillas con materia orgánica adsorbida, etc) que se acumulan en el surco alimentario ventral (Fig. 2 C) formando un bolo alimenticio aglutinado por secreciones de los apéndices que va siendo empujado por las primeras enditas hacia la boca. El tamaño de las partículas ingeridas está en proporción al tamaño del animal, por lo cual las especies gigantes (*Branchinecta gigas*, *B. ferox*) son predadoras o combinan un tipo de alimentación filtrador-predador y son capaces de ingerir incluso a otros anostracos, cladóceros y copépodos del plancton.

Dada la delgadez de la cutícula, la respiración se realiza a través de toda la superficie del cuerpo y apéndices.

La reproducción es generalmente bisexual, aunque en *Artemia* puede presentarse también partenogénesis; en este último caso ambas modalidades son excluyentes. El binomen *Artemia parthenogenetica* agrupa poblaciones partenogenéticas con individuos di, tri, tetra, pentaploides o mezcla de varias ploidías (Triantaphyllidis *et al.*, 1998). La forma de reproducción bisexual sería propia de las especies diploides y la asexual de las poliploides (Amat, 1985). En las especies que necesitan la participación de los dos sexos para la reproducción, durante la gametogénesis varios oocitos maduran simultáneamente en los ovarios, los oocitos maduros quedan retenidos en los oviductos y luego pasan al útero (en el ovisaco), donde serán fecundados. En algunas especies, el paso desde los oviductos al útero no se realiza hasta después de la cópula. La modalidad de acoplamiento puede variar ligeramente según las especies. En general el macho abraza a la hembra con las segundas antenas por la parte anterior del ovisaco (Rogers, 2002) y luego de un tiempo, en que la pareja nada abrazada, el macho introduce uno de los penes en el orificio de salida del ovisaco (gonoporo).

En *Artemia* el desarrollo embrionario de los huevos puede completarse en el útero siguiendo un proceso ovovivíparo, tras el cual los nauplios abandonan el útero totalmente formados, o puede interrumpirse en alguna fase temprana (criptobiosis). En este último caso, que corresponde a un proceso ovíparo, los embriones en desarrollo, son recubiertos por secreciones hematinicas de las glándulas de la cáscara, constituyendo quistes, embriones criptobióticos rodeados de un corion o envoltura

terciaria. El mecanismo de criptobiosis tiene dos componentes: una inactivación metabólica endógena, que depende del medio interno del individuo y otra exógena, que depende del medio ambiente. Normalmente, los quistes son expulsados desde el ovisaco al medio exterior y su eclosión requiere de mecanismos previos de activación. En general, para suspender la latencia endógena es necesario que los quistes pasen por una etapa de congelamiento o deshidratación (Thiéry, 1987). Posteriormente, la vuelta de las condiciones ambientales favorables (inundación por descongelamiento o precipitación) suspende la latencia exógena y se reanuda entonces el desarrollo. A partir de este momento los quistes están en condiciones de eclosionar. La mayoría de las especies de anostracos son ovíparas; sin embargo, las especies de *Artemia* pueden presentar ambas modalidades reproductivas. La eclosión de los quistes no es generalmente inmediata. Esto tiene un importante significado ecológico para la supervivencia en cuerpos de agua temporarios, en los que la aparición de condiciones favorables o adversas suele ser frecuente e impredecible. En condiciones adversas, la situación más ventajosa para la población será ser sorprendida cuando la proporción de formas criptobióticas sobre formas totales o parcialmente desarrolladas sea lo más elevada posible. Cuando las condiciones ambientales mejoren, los quistes podrán eclosionar y las larvas nacidas serán capaces de crecer y completar en un corto tiempo su desarrollo post-embrionario, alcanzando rápidamente la maduración sexual (Brendonck & Persoone, 1993).

La ubicación de los anostracos en determinados cuerpos de agua no sigue un patrón regular y definido. Además su abundancia en un mismo cuerpo de agua puede variar considerablemente en temporadas sucesivas. Existen varias hipótesis para explicar esta situación que hace tan difícil poder comprender la distribución local y temporal de este grupo animal. Por un lado, existiría una discontinuidad en el hábitat reflejada en condiciones micro climáticas dentro del cuerpo de agua. Estos microhabitats se producirían por el establecimiento de gradientes resultante de las condiciones locales de inundación y no serían los adecuados para permitir la eclosión de los quistes. Por otro lado, existiría una variabilidad intrínseca de los quistes en los requerimientos ambientales necesarios para la eclosión. En algunos casos existe solo un porcentaje de

quistes dentro de la puesta que se encuentran activados y la ocurrencia de varios ciclos de deshidratación–hidratación es necesaria para que 100% de la puesta logre eclosionar.

1.3.3- Distribución geográfica

Actualmente los anostracos son encontrados en zonas áridas, en estepas subtropicales y en desiertos de todos los continentes (Banarescu, 1990). Cuando se trata de entender la distribución tan amplia que presenta este grupo de animales hay que tener en cuenta que los anostracos estarían presentes en la tierra a partir del Cámbrico superior o Devónico inferior (Alonso, 1996, Waloßek, 1995). Al parecer, su distribución respondería a los movimientos geológicos que han sufrido los continentes en el pasado dado que algunos géneros (*Artemia*, *Branchinella* y *Branchinecta*) tendrían una representación en el supercontinente Pangea (Belk, 1984a). Más tarde, la distribución pudo haberse ampliado por intermedio de factores bióticos (transportados en las patas de aves) o abióticos (viento) que permitieron y permiten la dispersión de los quistes. La mayor diversidad de anostracos se encuentra actualmente en las zonas templadas y debe ser interpretada como el resultado de una importante radiación que sufrió este grupo al adaptarse a vivir en ambientes tan inestables. Las condiciones abióticas (composición química del agua y temperatura) de estos ambientes serían unos de los determinantes para entender la distribución geográfica de este grupo (Dimentman, 1981 en Cohen, 1998). Teniendo en cuenta que estos animales habitan ambientes acuáticos efímeros que en general no son muy extensos, no debe ignorarse la actividad del hombre cuando se analiza la presencia actual de estos crustáceos (Belk, 1998). El uso indiscriminado de la tierra por parte del hombre ha producido la desaparición de varios humedales y cuerpos de agua temporarios que son el hábitat por excelencia de los anostracos. En adición a esto, la inoculaciones artificiales con fines comerciales de especies foráneas, en cuerpos de agua habitados por especies endémicas, ha producido cambios radicales en la presencia geográfica de determinados grupos (Camara, 2001).

1.4- La familia *Artemiidae*

La familia *Artemiidae* , posee las siguientes características:

Contiene un solo género cosmopolita halobionte: *Artemia*

Antenas 2 del macho con los artejos basales unidos medialmente; con tubérculo frontal redondeado ornamentado, proximal-medial. Con artejos apicales anchos y aplanados (Fig. 3 C).

Maxilas 2 típicas, con unas pocas sedas dirigidas anteriormente y una seda adicional en posición más distal, dirigida posteriormente.

Once pares de apéndices torácicos de tipo filopodial, con un solo preepipodito.

Ovisaco corto y ancho, con un par de lóbulos laterales con o sin espinas y dos espinas ventrales (Fig. 3 B). Quistes esféricos de corion liso.

Vesículas seminales poco definidas. Los penes se proyectan ventralmente, con las bases próximas entre sí (Figs. 3 F, 3 G). Partes basales rígidas, no retráctiles, a veces con evaginaciones espiniformes medioventrales; partes distales retráctiles, poco ornamentadas, con o sin proceso distal (Torreterra & Belk, 2002).

Membrana de articulación entre el octavo y noveno segmento abdominal (o telson) muy poco definido o ausente (Figs. 3 B, 3 F)

1.5- El género *Artemia*.

Aun cuando el primer registro científico sobre la presencia de *Artemia* en un cuerpo de agua data de 1755, este animal era conocido popularmente desde mucho antes (Schlosser en Küenen y Baas-Becking, 1938). Al parecer varios grupos étnicos le atribuían la propiedad de mejorar la producción de sal en los lugares donde se los encontraba.

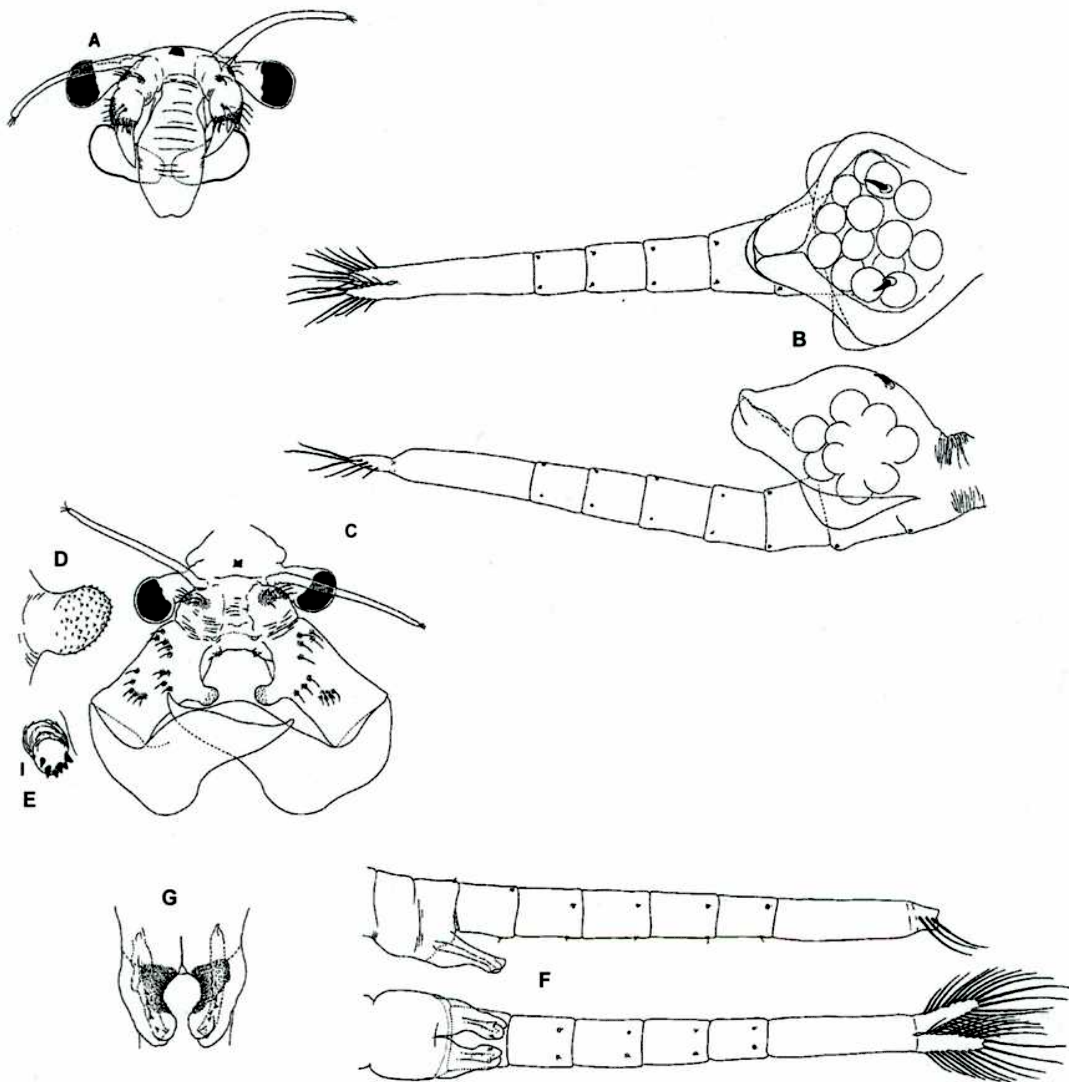


Figura 3. Morfología general de *Artemia* sp. (A) Vista anterior de la cabeza de la hembra, (B) Vista lateral y ventral del abdomen de una hembra, dónde se observan los segmentos genitales y el saco ovigero (ovisaco) lleno de huevos, (C) Vista anterior de la cabeza del macho, (D) Detalle del tubérculo frontal, (E) procesos antenales, (F) Vista lateral y ventral del abdomen de un macho, dónde se observan los segmentos genitales con los penes, (G) Vista ventral de los penes (Tomado de Alonso M., 1996).

Desde la segunda mitad del siglo XIX *Artemia* se ha transformado en uno de los objetos de estudio de mayor disponibilidad e interés en muchas áreas de investigación y en diversas disciplinas (histología, genética, radiología, toxicología, biología molecular, ecología, evolución, etc.).

1.5.1-Taxonomía del género *Artemia*

El género *Artemia* está considerado como un complejo de especies hermanas y súper-especies (grupos de especies incipientes *in statu nascendi*) definido por el criterio de aislamiento reproductivo (Bowen *et al.*, 1985, 1988). Como muchas de estas especies habrían surgido recientemente (a escala geológica) en la radiación del holoceno se observan entre ellas mínimas diferencias morfológicas y un espectro diverso en el grado de aislamiento reproductivo. Existen problemas taxonómicos motivados por la presencia de barreras parciales frente al flujo génico por los cuales algunas poblaciones serían intermedias entre razas y especies (Browne y Bowen, 1991). Algunos experimentos de *cross-breeding* entre diversas poblaciones, evidenciaron la presencia de un aislamiento reproductivo entre algunas de ellas que, hasta ese momento, habían sido erróneamente incluidas en *Artemia salina* (Halfer-Cervini *et al.*, 1968; Barigozzi, 1972, 1974, 1990; Clark & Bowen, 1976; Bowen *et al.*, 1978; Browne, 1983). Estos experimentos condujeron al reconocimiento de especies hermanas o crípticas (*sibling species*), términos que se refieren a especies reproductivamente aisladas en la naturaleza, pero muy similares en su apariencia externa (Bowen *et al.*, 1980). Los nombres de esas entidades taxonómicas han sido asignados en acuerdo con las Convenciones Internacionales de Nomenclatura Zoológica (Bowen & Sterling, 1978).

El *binomen* *Artemia salina* se estableció para designar a la población original que se encontró en el lago salado de Lymington, Inglaterra. Algunos ejemplares de esa población fueron empleados por Schlösser en 1755 para hacer la primera ilustración, y por Linnaeus en 1758 para hacer la descripción de la especie (Küenen & Baas-Becking, 1938). En estudios recientes se han encontrado grandes similitudes morfológicas, entre ejemplares africanos, descritos como *Artemia tunisiana* y

ejemplares de la población original de Lymington, que justifican considerar a ambos nombres (*A. salina* y *A. tunisiana*) como sinónimos (Mura, 1990). Actualmente, el lago salado de Lymington ha desaparecido, y *Artemia* no ha sido encontrada nuevamente en Inglaterra. Por tal motivo, la única comparación que puede realizarse entre las poblaciones actuales de *Artemia* y la población extinta de Lymington, implica el estudio comparativo de caracteres morfológicos con los especímenes de la serie tipo preservados en la colección del Museo Británico de Historia Natural de Londres (Triantaphyllidis *et al.*, 1997). El *binomen* *A. salina* (Linnaeus, 1758) tiene prioridad sobre el *binomen* *A. tunisiana* Bowen, 1965. Por lo tanto, el primer nombre utilizable más antiguo es el nombre válido y el segundo pasa a ser un sinónimo.

Teniendo en cuenta las importantes diferencias genéticas que existen entre las poblaciones de *Artemia* que presentan un modo de reproducción partenogenético, la definición de especie dentro del género se ha transformado en algo confusa (Abreu-Grobois, 1987).

Existen numerosos problemas en reconocer y poder asignar correctamente las nuevas poblaciones que están siendo encontradas, a una especie en particular. Como ejemplo de estas dificultades podemos mencionar la coexistencia de dos poblaciones de *Artemia* con diferente modo reproductivo en el mismo cuerpo de agua. Esto ocurre en algunas salinas españolas y portuguesas donde se encuentran mezclas entre poblaciones partenogenéticas y otras bisexuales (Amat, 1983; Sorgeloos, 1985; Baitchorov & Nagorskaja, 1999). Se agrega a lo anterior que algunas salinas han sido artificialmente inoculadas con poblaciones de *Artemia* que no son endémicas de las regiones donde se localizan esos cuerpos de agua (Camara & Medeiros Rocha, 1987). El mayor problema para realizar una correcta identificación de las poblaciones radica en la falta de caracteres diagnósticos confiables y convenientes que puedan ser utilizadas en una descripción. En general los machos son los portadores de los caracteres morfológicos más conspicuos, tradicionalmente utilizados para la identificación específica. En cambio las hembras de las diversas especies suelen ser muy parecidas, lo que dificulta su asignación a una especie en particular. Según Brendonck y Coomans (1994b) los caracteres diagnósticos de las especies de

anostracos deben buscarse en las estructuras relacionadas con la reproducción porque son éstas las implicadas en el reconocimiento y estimulación sexual además del enganche de la pareja durante el abrazo copulatorio. En otras palabras; los caracteres sexuales externos y el comportamiento durante el cortejo y apareamiento son muy conservativos para cada especie. Por ej., en un estudio realizado por Abreu-Grobois (1987) se tabulan las diferencias entre las especies en cuanto al número de cromosomas y cromocentros así como las diferentes morfologías de la furca, ovisaco, penes y lóbulos frontales del macho. No obstante, los estudios morfológicos son habitualmente realizados para unas pocas poblaciones y los caracteres considerados podrían "no" ser idénticos para todas las poblaciones dentro de una especie en particular. Para aquellos casos frecuentes entre los anostracos en los que sólo se encuentran en la naturaleza las hembras ovígeras o simplemente los quistes, diversos autores han investigado la forma y estructura de los quistes y han diseñado claves de identificación específica sobre la base de caracteres tales como la ornamentación superficial, el diámetro y/o el espesor del corion (Brendonck & Coomans, 1994 a y b; Thiéry & Gasc, 1991). El uso de estos caracteres para la taxonomía tiene una utilidad muy variada según las familias, géneros o especies (Mura, 1991). Para el caso particular de *Artemia*, si bien puede haber diferencias interespecíficas en los diámetros y espesores del corion (con una gran variabilidad inter-poblacional agregada), la cubierta terciaria es lisa en todas las especies conocidas. Por lo tanto en este caso, no son características útiles a nivel específico. Por otro lado, estos caracteres podrían llegar a tener alguna utilidad para identificar especies presentes en el pasado, ya que muchas veces se encuentran quistes como microfósiles en los sedimentos (Shepard & Hill, 2001).

Tratándose de especies crípticas como es el caso de las de *Artemia*, para asegurar la asignación a una determinada especie, deben utilizarse complementariamente, diversos tipos de caracteres: ecológicos, biométricos, morfológicos, morfométricos, citogenéticos, moleculares, electroforéticos, cruzamientos inter e intraespecíficos, perfiles bioquímicos, etc. (Amat *et al.*, 1994; Triantaphyllidis *et al.*, 1997; Rodríguez Gil *et al.*, 1998; Cohen *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 1999; de los Ríos, 2000; de los Ríos &

Zuñiga, 2000; Papeschi *et al.*, 2000; Torrentera & Belk, 2002, Camargo *et al.*, 2002; Abatzopoulos *et al.*, 2002).

1.5.2- Ciclo ontogenético

El desarrollo post-embrionario de *Artemia* puede dividirse en una serie de estadios larvales determinados por sucesivas mudas en las cuales la fisonomía del animal cambia hasta alcanzar el estado adulto. Durante la vida adulta, las mudas continúan, pero sólo producen pequeños cambios corporales, a veces no asociados con cambios del tamaño del animal.

Las hembras bisexuales son fecundadas varias veces durante la vida adulta. Cada fecundación origina una puesta:

- a) de tipo ovíparo, constituida por quistes o embriones criptobióticos, que luego de un tiempo de retención son liberados al medio
- b) de tipo ovovivíparo, en la que las hembras liberan directamente las larvas nauplio al medio acuoso.

En el caso de las puestas ovíparas, existe un período de tiempo, que podríamos considerar como "indeterminado", que transcurre entre el momento de la liberación de los quistes al medio y el momento de su eclosión. Este tiempo puede ser muy corto, como ocurre en los llamados huevos subitáneos que eclosionan a las pocas horas de ser liberados, o ser muy largo como ocurre con la mayoría de los quistes que permanecen quiescentes un tiempo, en la orilla de los cuerpos de agua, hasta poder eclosionar.

El ciclo ontogenético tiene una duración diferente según las especies. En una población de *A. persimilis* de la provincia de La Pampa, el desarrollo postembrionario a partir de la eclosión de quistes o a partir de larvas nauplio, hasta alcanzar el estado adulto, puede completarse en un período de tiempo que varía entre 9 a 21 días y la longevidad promedio es de 30 a 50 días (Fig. 4).

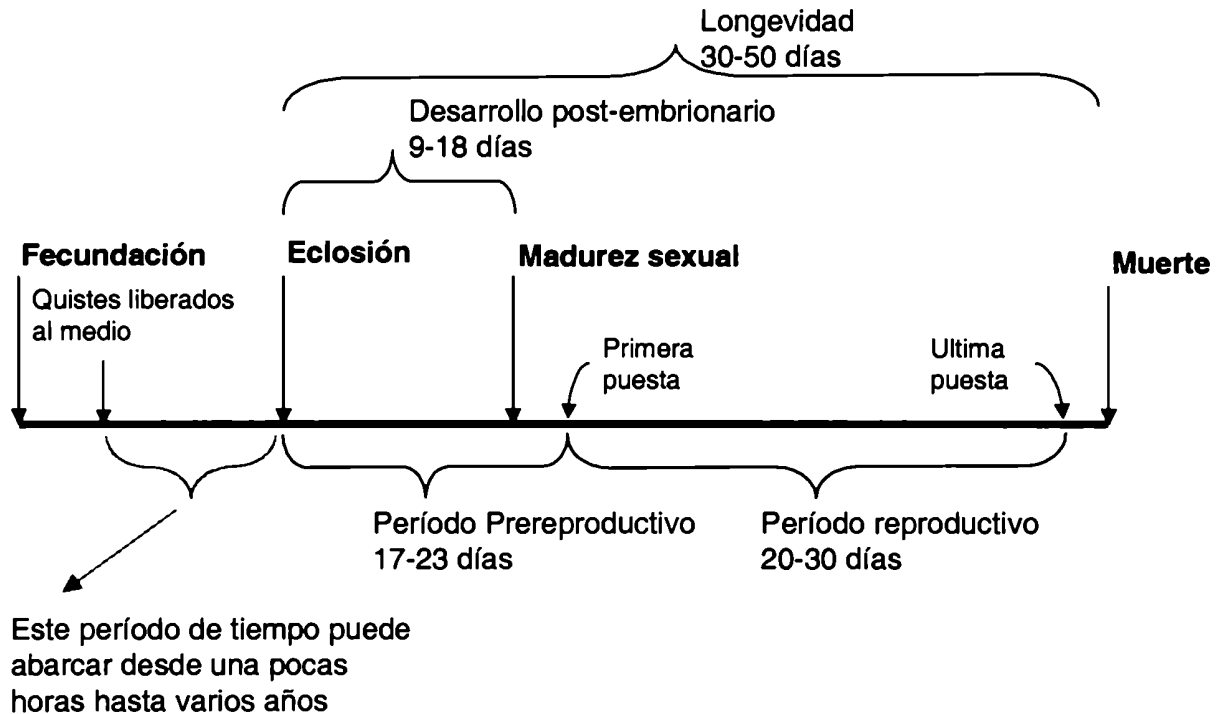


Figura 4. Ciclo ontogenético en una población de *A. persimilis* de la provincia de La Pampa.

1.5.2.1- Estadios en el desarrollo post-embrionario

El desarrollo ontogenético de *Artemia* puede seguirse observando a través de la serie de mudas, el agregado sucesivo de segmentos o grupos de segmentos al cuerpo del nauplio hasta alcanzar el número definitivo; la formación gradual a partir de brotes, de los apéndices (piezas bucales y filopodios, con sus lóbulos y armaduras setosas), los cambios graduales en la forma, tamaño, armadura setosa, orientación y adquisición de ornamentaciones, de las antenas según los sexos, además de los cambios funcionales;

el pasaje gradual de los sistemas alimentario y locomotor de las larvas al adulto; la delimitación de los segmentos genitales y evolución de los órganos sexuales externos; la aparición de los segmentos abdominales y furcas caudales (Schrehardt, 1987; Cohen *et al.*, 1999). Varios autores relacionan estos cambios de apariencia con las sucesivas mudas, pero como no existe un consenso en el número de mudas, que puede variar según los autores entre 9 y 17, es esperable la existencia de discrepancias en el número total de estadios larvales durante el desarrollo post-embrionario (Anderson, 1967; Schrehardt, 1987; Criel, 1991b; Cohen *et al.* 1999). El desarrollo post-embrionario de *A. persimilis* según Cohen *et al.* (1999) consta de dos estadios naupliar, tres metanaupliar, siete post-metanaupliar y cinco post-larvales, incluidos en 4 períodos, hasta alcanzar el estado adulto. Una descripción más completa de todos los estadios larvales desde L1 hasta L17 puede encontrarse en Cohen *et al.* (1999).

Puede hacerse una breve descripción de los 4 períodos, según estos últimos autores:

Período naupliar: estadios larvales 1 a 2

El primer estadio en el ciclo ontogenético de *Artemia* es el característico estadio naupliar de los crustáceos, aunque con ciertas características propias de los Branchiopoda. El nauplio recién eclosionado (Fig. 5) posee el ojo nauplio ubicado en el centro de la frente y tres pares de apéndices cefálicos: antena 1; antena 2 y mandíbulas birramosas. El cuerpo presenta forma sub-cónica, es de color anaranjado debido a la gran cantidad de vitelo acumulado y su tamaño ronda los 0.4-0.5 mm. Durante las primeras 24 a 48 hs después de la eclosión el nauplio se alimenta de las reservas que posee en el vitelo y utiliza la antena para desplazarse en la columna de agua.

Período metanaupliar: estadios larvales 3 a 5

El desarrollo continúa con estadios metanaupliar poco coloreados, en los que el intestino tiene un contenido oscuro, y el ano está abierto al exterior. Esto indica que las reservas de vitelo se han terminado, y el animal se está alimentando por sus propios

medios. El cuerpo se alarga posteriormente agregándose con cada muda uno a varios somitos. La antena 1 desarrolla nuevas estructuras sensoriales. La antena 2 actúa activamente en la locomoción pero ahora también interviene junto con la mandíbula, en la captura del alimento, acarreándolo hacia el labro que es de gran importancia en el proceso alimentario. Al final de este período se encuentran definidos todos los apéndices bucales, seis a 7 segmentos torácicos y los brotes ya lobulados o no, de hasta 4 pares de filopodios.

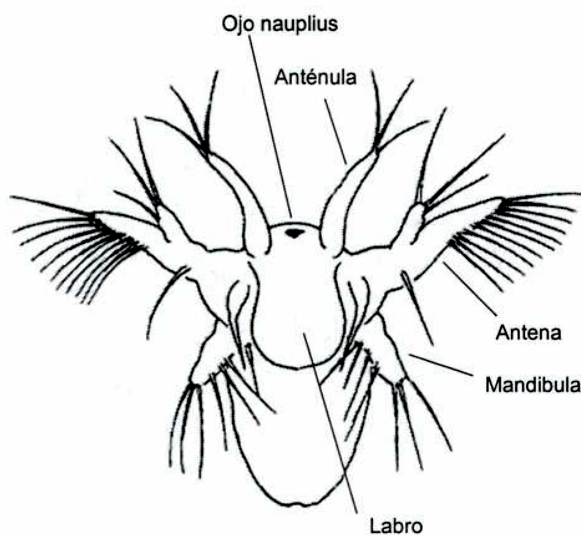


Figura 5. Larva nauplio de *Artemia* (Tomado de Alonso M, 1996).

Período post-metanaupliar: estadios larvales 6 a 12

En la antena¹ se completa el desarrollo del aparato sensorial. Los ojos compuestos se desarrollan y transforman en ojos pedunculados. Las estructuras de la antena 2 que intervienen en la natación o que asisten en la captación de alimento comienzan a reducirse a medida que se va completando el desarrollo de los filopodios, los que van asumiendo gradualmente la función locomotora, filtradora y transportadora de alimento hacia la región bucal. La mandíbula comienza a reducir los caracteres larvales y a adquirir la morfología del apéndice adulto. Los dos pares de maxilas alcanzan su forma y función adulta. A partir del estadio post-metanaupliar VI (estadio larval 11) pueden diferenciarse los sexos. En la larva masculina, la región genital (que corresponde a los dos primeros segmentos del abdomen) presenta ventralmente un par de montículos globulares por segmento, que corresponden a los brotes de los penes (Fig. 54 en Cohen *et al.*, 1999). En la larva femenina, esta región genital presenta el brote del ovisaco, que se observa como un único promontorio de forma globosa y con un pequeño gonoporo (Fig. 47 en Cohen *et al.*, *op.cit.*).

Período post-larval (estadios larvales 13 a 17)

Durante este período se completan todos los cambios morfológicos en el cuerpo y en los apéndices, que determinan la diferenciación entre los sexos.

La antena 2, empieza a desarrollar su dimorfismo sexual a partir de la postlarva 1. En el macho la antena 2, progresivamente más robusta, va rotando hasta alcanzar la posición ventral típica del apéndice en el adulto. En la hembra la antena es triangular, látero-ventral y se va reduciendo de tamaño hacia el final del período. En ambos sexos la armadura setosa larval desaparece gradualmente y el endopodito se reduce. El cuerpo de la antena adulta va a quedar limitado al exopodito larval. En el macho, las bases de ambas antenas quedan unidas por un puente medio. A fines del período post-larval aparece, en la parte media del puente, un par de montículos espinosos. Se desarrolla también una articulación secundaria, que divide ambos exopoditos antenales en una parte basal cilíndrica y robusta y una distal, aplanada y falciforme; en la parte

basal, el lóbulo frontal, que ya había aparecido a fines del período anterior, se hace progresivamente más conspicuo y ornamentado. En la región genital los órganos sexuales externos, penes pares y ovisaco impar completan su desarrollo. En la porción rígida de cada uno de los penes aparece una espina medio-proximal. En el ovisaco, de forma triangular aparecen un par de pequeñas espinas puntiagudas en posición ventral y otro par de espinas más grandes y de punta roma, en posición lateral. Al final del período los ovarios muestran oocitos, que en algunos pocos casos ya han bajado hacia los oviductos.

1.5.3- Sistema reproductor de *Artemia*

1.5.3.1- Masculino

El sistema reproductor masculino consta de un par de testículos, un par de conductos deferentes, glándulas accesorias, y penes (Criel, 1991a). Los testículos son estructuras tubulares simples y huecas rodeadas por una delgada membrana testicular hialina. Histológicamente presentan dos tipos celulares principales: células somáticas de soporte y células germinales. Los conductos deferentes se unen a los extremos anteriores de los testículos, formando un lazo y terminado en el extremo superior de los penes. Los espermatozoides son almacenados todo a lo largo de los vasos deferentes y son mantenidos en movimiento por medio de contracciones rítmicas de la musculatura de los mismos (Brown, 1970). Los penes están compuestos por dos partes: la basal fija (o rígida) y la distal que es retráctil y se invagina en la basal. Las partes fijas de ambos penes forman una pieza única pero bifurcada distalmente, que está cubierta de una cutícula similar a la que cubre el resto del cuerpo. Las partes evaginables que se proyectan hacia afuera durante la cópula, son tubos parcialmente invaginados en "dedo de guante", que conectan el extremo distal del vaso deferente con el exterior. Cuando las partes retráctiles de los penes se encuentran extendidas, el revestimiento del lumen se transforma en la cubierta exterior y ambos vasos deferentes se convierten en las partes más distales del tracto reproductivo (Fig. 6). Unas glándulas

accesorias se localizan cerca de la unión entre los conductos deferentes y la porción retráctil de los penes, pero su función es aún desconocida.

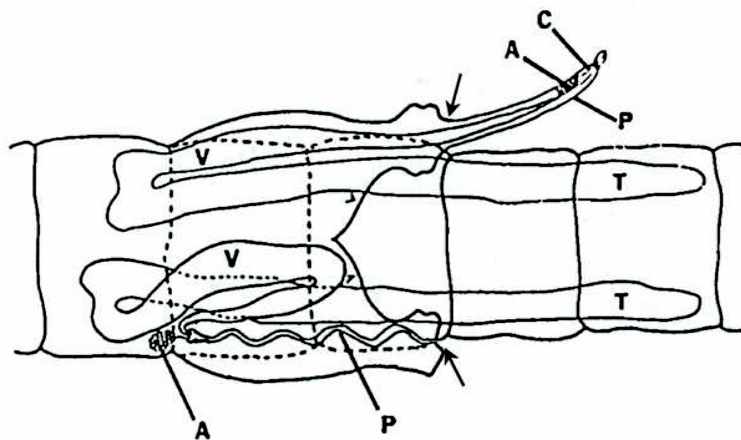


Figura 6. Representación esquemática en vista ventral del sistema reproductor masculino. En la zona superior del dibujo se muestra un pene evertido y en la inferior el pene se encuentra retraído como se lo observa normalmente. Las flechas muestran la unión entre la parte rígida y la retráctil de los penes. A, glándula accesoria; C, ducto colector; P porción retráctil del pene; T, testículo; V, vaso deferente. (Tomado del Criel, 1991a)

1.5.3.2- Femenino

El sistema reproductor femenino consta de un par de ovarios y un par de oviductos que desembocan en el útero al que se abren varios grupos de glándulas de la cáscara (Criel, 1991a). Los ovarios son estructuras tubulares pares que se extienden desde el último segmento torácico, pasando a través de los segmentos genitales hasta aproximadamente el tercer o cuarto segmento abdominal. Microscópicamente, se observan en los ovarios cambios cíclicos que reflejan los diferentes estados de maduración de los oocitos en el ciclo reproductivo (vitelogénesis). A nivel del primer segmento abdominal los ovarios se conectan con los oviductos o "bolsas laterales", que son esféricos y se proyectan hacia los lados del ovisaco para desembocar en el borde

ántero-lateral del útero a través de una membrana u obturador. Los oviductos poseen un epitelio secretor rodeado por fibras musculares en disposición longitudinal y circular. Cuando los oocitos están maduros, son movilizados desde los ovarios hacia los oviductos donde permanecen algún tiempo, rodeándose de secreciones glandulares. Una vez allí, los oocitos completan la primera división meiótica y desarrollan una membrana de fertilización (Fautrez-Firlefyn, 1971; Criel, 1989; Murugan *et al.*, 1996). Durante la cópula, el útero funciona como un receptáculo seminal mientras los oocitos permanecen en los oviductos. De esta forma, los procesos de cópula y fertilización están separados. Luego de un tiempo los oocitos pasan al útero donde se produce la fertilización.

Glándulas de la cáscara. La envoltura terciaria

Las especies del género *Artemia* presentan tres pares de glándulas de la cáscara ubicadas en el útero de forma póstero-lateral dorso-medial y ántero-lateral. Las mismas están formadas por varios grupos de unidades glandulares. Generalmente cada unidad esta formada por dos células oblongas separadas por un lumen que comunica con el útero por medio de un conducto. Este conducto esta formado por una célula "cuello" y un pequeño numero de células "conducto" (Anderson *et al.*, 1970). La matriz citoplasmática de las células glandulares contiene glucógeno, lípidos, numerosas mitocondrias y un aparato de Golgi y retículo endoplasmático rugoso bien desarrollados. Cuando las hembras producen huevos con envoltura terciaria (quistes), el material para formar la porción más externa de esa cáscara es sintetizado en las glándulas de la cáscara. Durante esta síntesis se forman en las glándulas un gran número de vesículas membranosas que contienen lipoproteínas y cuya acumulación le confieren coloración a las glándulas. En los diferentes ciclos reproductivos el color de las glándulas puede variar desde un castaño oscuro hasta la casi total transparencia. La gruesa envoltura terciaria (cáscara o corion) que se deposita rodeando a los embriones, es inicialmente homogénea y más tarde se hace esponjosa, llenándose de estructuras similares a alvéolos. Cuando termina la maduración de la cáscara se adiciona a los embriones una capa más externa y homogénea. La envoltura terciaria

queda así formada por dos capas: una alveolar (mas interna) y una cortical o cuticular (mas externa). Esta envoltura terciaria no protege a los embriones contra la pérdida de agua pero les brinda una protección contra daño mecánico, radiaciones ultravioletas y hongos (Belk & Cole, 1975).

1.5.4- Modalidades reproductivas. Oviparismo y ovoviviparismo

Las hembras de *Artemia* pueden producir dentro del útero algunas camadas de embriones que tienen una cáscara delgada y completan su desarrollo embrionario en el ovisaco, liberando larvas nauplio al medio (ruta ovovivípara). Otras camadas de embriones, en cambio, presentan una gruesa cáscara y detienen su desarrollo embrionario (diapausa) en estado de gástrula temprana antes de ser liberadas al medio como quistes (proceso ovíparo). Se ha sugerido que el destino de cada camada estaría determinado completamente por el tipo y cantidad de secreción liberada en el útero por las glándulas de la cáscara (Dutrieu, 1960; Lochhead & Lochhead, 1940). Sin embargo, no se ha determinado aún el verdadero papel que cumplen estas glándulas en la determinación del tipo de descendencia, ovípara u ovovivípara, que pueden presentar las hembras de *Artemia*. La actividad secretora de las glándulas de la cáscara en las hembras de los anostracos está sincronizada (a pesar de mostrar cierto grado de variación), con el pasaje de los oocitos desde los oviductos hacia el ovisaco (Fautrez-Firlefyn, 1971)

1.5.4.1- Detención del desarrollo embrionario: diapausa y quiescencia.

Los embriones en diapausa son aquellos cuyo desarrollo embrionario está detenido debido a algunas señales endógenas (procesos fisiológicos o cambios estructurales). Estos embriones no reiniciarán su actividad metabólica hasta que la diapausa finalice, aunque las condiciones del medio sean favorables (Clutter, 1978; Drinkwater & Clegg, 1991). Muchos organismos entran en diapausa al captar "claves" ambientales que pueden ser interpretadas por su medio interno como indicadores de condiciones negativas; de esta forma entran en detención metabólica antes que estas condiciones

desfavorables los afecten. La salida de la diapausa, llamada "activación", requiere la exposición específica a determinados factores ambientales estimulantes (deshidratación, congelamiento, falta de oxígeno, disminución de la salinidad, disminución del alimento, contaminación ambiental, etc.). Como estas condiciones ambientales son desfavorables para reiniciar el desarrollo, el embrión entra en un estado hipometabólico consecutivo a la diapausa, llamado quiescencia. En este estado el embrión responde directamente a las condiciones del medio externo (factores exógenos). El metabolismo normal se restablecerá cuando las condiciones ambientales sean favorables (Fig. 7).

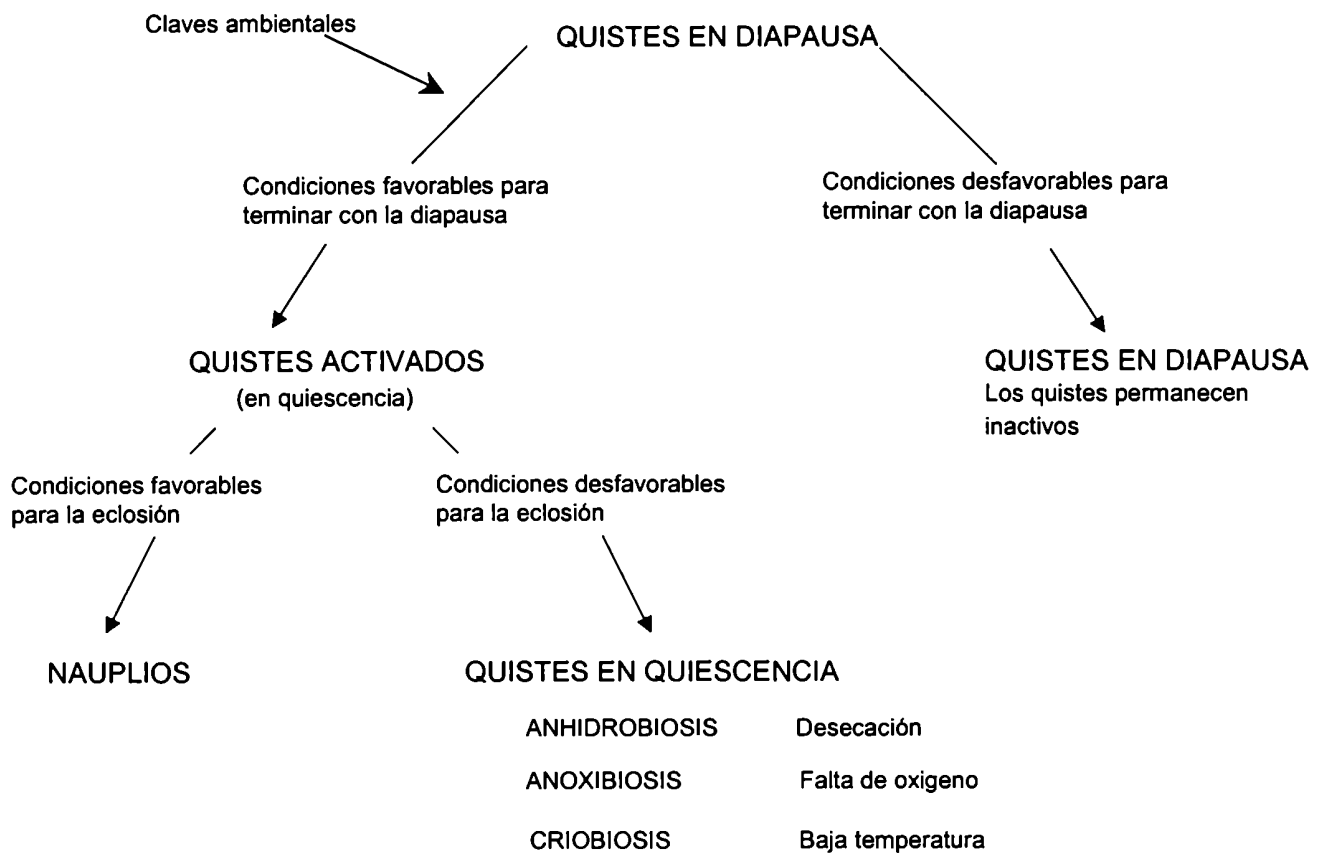


Figura 7. Diferentes rutas metabólicas que pueden seguir los embriones de *Artemia* que se encuentran en diapausa. (Tomado de Drinkwater & Clegg, 1991)

La trehalosa

En el género *Artemia* la diferencia entre los embriones que entrarán en diapausa y los que seguirán la ruta del ovoviviparismo se daría, aparentemente, muy temprano en el desarrollo. A un tiempo determinado, los embriones que serán presumiblemente diapáusicos, presentarán grandes reservas de trehalosa, un disacárido no reducido, que se sintetiza aparentemente en los embriones cuando están en el útero.

La trehalosa forma parte de 15% del peso seco del quiste y se ha propuesto que su uso como carbohidrato de reserva, en lugar del glucógeno, tiene un importante valor adaptativo relacionado con la habilidad de este disacárido para preservar las membranas y organelas celulares sin cristalizarse en condiciones de sequedad extrema (Clegg, 1964 y 1974).

1.5.5- Tácticas reproductivas

El género *Artemia* muestra una notable flexibilidad reproductiva que le permite adecuarse a las más diversas presiones de selección del medio. Por un lado, variando el tipo de descendencia que es liberada al medio y por otro distribuyendo temporalmente la descendencia durante el período reproductivo.

1.5.5.1- Variación en la modalidad reproductiva

Todas las poblaciones de *Artemia* conocidas combinan las modalidades reproductivas ovovípara y ovípara en una proporción diversa (Gajardo & Beardmore, 1989). Según algunos autores los quistes son parte de una compleja táctica para la supervivencia en ambientes temporarios e inestables (Lavens & Sorgeloos, 1987; Drinkwater & Clegg, 1991; Fryer, 1996). Esto parece ser muy razonable considerando su compleja y especializada morfología y sus características funcionales altamente especializadas. Sin embargo, la producción de quistes acarrearía múltiples desventajas. En varias poblaciones criadas y estudiadas en laboratorio se encuentra una baja producción de quistes en comparación a la descendencia ovovípara y una baja tasa de eclosión de

los quistes producidos. En adición a esto, cuando se promedian los datos para muchas poblaciones de *Artemia*, se obtiene que una típica puesta de quistes es 74% más pequeña que una de nauplios (Browne, 1980a). Todo esto indicaría la existencia de un balance o intercambio entre las ventajas y desventajas involucradas en la producción de quistes o nauplios. Resulta interesante destacar que, para una misma población de *Artemia*, el tamaño de los nauplios nacidos a partir de la eclosión de quistes es menor que el de los nacidos en forma ovovivípara (Amat, 1980). Este fenómeno quedaría explicado por el mayor gasto energético que significa el modo de reproducción ovíparo cuando se lo compara con el ovovivíparo (Morris, 1971), teniendo en cuenta que 22% de la masa del quiste es utilizada solamente para la encapsulación (Clague, 1962). El punto de vista más generalizado entre los especialistas es que el cambio del ovoviviparismo al oviparismo se encuentra bajo control ambiental. Producido por una disminución en la disponibilidad de alimento, una disminución en el contenido de oxígeno, un incremento en la salinidad, etc. (D' Agostino & Provasoli, 1968; Browne, 1982; Amat, 1985). Inversamente, en un ambiente adecuado recientemente colonizado, la proporción de ovoviviparismo, sería mayor para asegurar un rápido aumento del número de individuos. Sin embargo, algunos autores señalan que en *Artemia franciscana* el cambio del ovoviviparismo al oviparismo está asociado, al menos en parte, con el nivel de heterocigosis de las hembras, las cuales serían más resistentes a las condiciones adversas del medio cuanto mayor sea su número de *loci* heterocigotas (Gajardo & Beardmore, 1989). Posiblemente exista un componente ambiental y otro genético en la determinación del cambio de un tipo de reproducción al otro.

1.5.5.2 Distribución temporal de la descendencia

Las poblaciones de *Artemia* criadas y estudiadas en laboratorio muestran la capacidad de producir muchas puestas en el tiempo que dura el período reproductivo y de producir un gran número de descendientes en cada una de ellas. Es decir tienen un alto potencial biótico. La bibliografía clásica sugiere que el factor más importante en la determinación del crecimiento inicial de una población es la edad a la que ocurre la primera puesta de las hembras (Cole, 1954).

Por un lado, *Artemia* es un gran colonizador de ambientes salinos. La dispersión de los quistes se realiza en forma pasiva principalmente por el viento o en las patas, plumas o tubo digestivo de las aves acuáticas que frecuentan cuerpos de agua de ciertas características. También el hombre se ha convertido en tiempos recientes en un importante medio de dispersión de los quistes, en relación con un desarrollo poco cuidadoso de su actividad económica. Dado que los quistes tienen una gran capacidad adaptativa para tolerar un intervalo muy amplio de variación en los factores ambientales, es muy probable que los quistes que alcancen un biotopo adecuado puedan ser el comienzo de una nueva población. Un gran número de descendientes por puesta producidos lo más rápido posible (ovovivíparamente) sería una gran ventaja adaptativa para obtener una rápida explotación del nuevo ambiente. Por otro lado, las poblaciones ya establecidas están sometidas a una elevada competencia intraespecífica por los recursos. En este caso, la posibilidad de producir muchas camadas de descendientes sería ventajosa ya que aseguraría la representación en el futuro de un genotipo especial dentro del banco de genes de la población (Browne, 1980a).

1.5.6- Costo reproductivo

Las modalidades reproductivas junto con el rendimiento, son dos factores críticos para entender el potencial evolutivo de las poblaciones de *Artemia*. El costo asociado a la reproducción es un componente integral de la teoría de la evolución y de la determinación de las diferentes tácticas evolutivas. Algunas hipótesis postulan que los recursos energéticos están disponibles para los organismos de manera finita. Como resultado de esto, existiría un gasto energético cuando las reservas destinadas al mantenimiento y crecimiento del individuo son desviadas hacia la reproducción. En este caso y de acuerdo con esta premisa, sería de esperar un crecimiento más lento del individuo cuando este se reproduce. Sin embargo, en experimentos donde se comparó la supervivencia entre hembras mantenidas en pareja y otras donde la reproducción fue retrasada artificialmente, no se encontró que el retraso en la reproducción produjera un aumento de la supervivencia (Browne, 1982). Según Daly (1978), algunos costos

reproductivos se pagan desde el momento de la madurez sexual cuando los recursos son desviados hacia el desarrollo de los órganos del sistema reproductor. Los resultados de las experiencias realizadas en laboratorio parecen concordar con lo anterior, porque en condiciones de alimentación *ad libitum* no se observan mayores supervivencias en los grupos con retraso reproductivo, indicando que mucho del gasto reproductivo fue pagado antes de que se produzca la reproducción (Browne, 1982). Cuando el alimento es escaso, una parte de las reservas que la hembra destina a la producción de cigotas podría ser reasignada, dando como resultado una mayor supervivencia en las hembras vírgenes que en los grupos apareados. Los machos no parecen almacenar los recursos reproductivos y por lo tanto no tienen reservas para soportar situaciones de baja alimentación dando como resultado una supervivencia similar entre los machos que se aparean y los que no.

1.5.7- Claves en el apareamiento

El cortejo entre hembras y machos de *Artemia* estaría relacionado con la presencia de claves visuales y táctiles. Tanto machos como hembras llevan una cantidad de estructuras y ornamentaciones cuticulares que posiblemente tengan alguna intervención en el reconocimiento y/o estimulación de los sexos para el apareamiento. Los machos de *Artemia* utilizarían claves visuales poco precisas para guiar su comportamiento de selección de la hembra y posterior cópula, y las hembras usarían claves táctiles reconociendo en el macho estructuras de la antena y de la parte basal de los penes (Belk, 1991). Todavía no está claro si pueden existir otros factores que intervengan en los encuentros sexuales al momento de seleccionar pareja. En estudios llevados a cabo en laboratorio, donde se realizaron pruebas de competitividad entre poblaciones bisexuales y partenogenéticas, se encontró que los machos de *Artemia* no parecen exhibir una preferencia por abrazarse a las hembras bisexuales (de su especie) o a las partenogenéticas (Browne, 1980b). En la mayoría de los anostracos, la estimulación mecánica de los penes y/o el *clasping* del macho, además de la liberación de espermatozoides durante la cópula, podrían ser los desencadenantes naturales del desplazamiento de los oocitos desde los oviductos hacia el ovisaco. Como la hembra

de *Artemia* no tiene la capacidad de reservar el esperma del macho para fecundar varias camadas de oocitos, cada cópula corresponde a una única puesta. Posiblemente, como una forma de evitar un nuevo encuentro con otro macho antes de liberar la puesta, la hembra permanece abrazada al macho más allá de la cópula, hasta el momento de la oviposición y posterior muda (Bowen, 1962). Se ha mencionado en algunos anostracos que, en ausencia de cópula, los oocitos alojados en el tracto femenino se reabsorben (Prophet, 1963; Munuswamy & Subramoniam, 1985; Brendonck, 1991). Por otro lado, las hembras de *Artemia* presentarían un ciclo endógeno del huevo por el cual, si el macho falla en abrazar y copular a la hembra, y por lo tanto no ocurre la fertilización, los oocitos maduros no fecundados no se reabsorben, sino que pasan desde los oviductos hasta el útero y desde allí, luego del período usual de retención, son liberados del ovisaco como puestas de "huevos infértiles" transparentes (Bowen, 1962; Belk, 1991). Además de *Artemia*, en otros anostracos también se ha citado la liberación al medio de gametas no fecundadas, algunas rodeadas de una precaria cáscara o totalmente desnudas (Garreau de Loubresse, 1980). En tres especies de *Streptocephalus*, las hembras no fertilizadas presentan también un ciclo endógeno y liberan al medio huevos infértiles que no presentan cáscara (Murugan *et al*, 1996). Esto significaría que aquí la cópula sería necesaria para desencadenar la actividad de las glándulas de la cáscara. Por el contrario en otros anostracos como *Tanymastix* se encontró producción y liberación de huevos con cáscara (aunque alterada) en hembras mantenidas aisladas de machos (Garreau de Loubresse, 1980).

1.5.8- Distribución mundial

El género *Artemia* Se encuentra ampliamente distribuido en todos los continentes con excepción de la Antártida (Fig.8). Entre las especies que son endémicas del viejo Mundo se reconocen: *A. parthenogenetica* Barigozzi 1974, distribuida en Europa, Asia y Australia; *A. salina*, Leach, 1819, en la región mediterránea de Europa; *A. urmiana* Gunther, 1900, en Irán, *A. sinica* Yaneng, 1989, en China (Bowen & Sterling 1978) y *A. tibetiana* Abatzopoulos, 1998, en Tibet (Abatzopoulos *et al.*, 1998). Las especies

reconocidas como endémicas del Nuevo Mundo son: *A. franciscana* Kellogg, 1906, que presenta una amplia distribución en toda América y cuya presencia se ha registrado en forma natural o introducida en todo el continente; *A. monica* Verrill, 1869, considerada por algunos autores como subespecie de *A. franciscana*, que está muy restringida en su distribución y sólo se la encuentra en el lago Mono en Estados Unidos; y *A. persimilis* Piccinelli y Prosdocimi, 1968, que sólo se ha registrado hasta el momento en la Argentina y algunas localidades de Chile (Amat et al., 1994; Colihueque & Gajardo, 1996 a, b; Rodríguez Gil et al., 1998; Cohen et al., 1999; Gajardo et al., 1998, 1999; de los Ríos, 2000).

A pesar que *A. persimilis* fue también citada en la salina de San Bartolomeo, en Cerdeña (Italia), los infructuosos intentos por cruzar machos y hembras de las poblaciones argentinas e italianas han llevado a concluir que las dos poblaciones pertenecen a especies diferentes (Halfer-Cervini, 1968; Piccinelli & Prosdocimi, 1968; Clark & Bowen, 1976). En las actualizaciones biogeográficas de Vanhaecke et al. (1987) y Triantaphyllidis et al. (1998) se pueden encontrar listas extensas y detalladas a escala mundial, de localizaciones del género *Artemia*.

En algunos casos es difícil reconocer si la aparición de una especie en un cuerpo de agua particular ocurrió naturalmente o por la acción del hombre. En 1977, quistes de *A. franciscana* de la población de la Bahía de San Francisco fueron introducidos artificialmente en el Noreste de Brasil (Cámara & Medeiros Rocha, 1987). Además de este caso puntual la inoculación artificial de *Artemia*, para ser utilizada en acuicultura ocurrió y ocurre actualmente en casi todo el mundo (Narciso, 1989; Thiéry & Robert, 1992). Si estas introducciones no se realizan siguiendo criterios ecológicos, las prácticas de inoculación artificial pueden ser una amenaza contra los patrones biogeográficos de las especies de *Artemia* y su variabilidad natural.

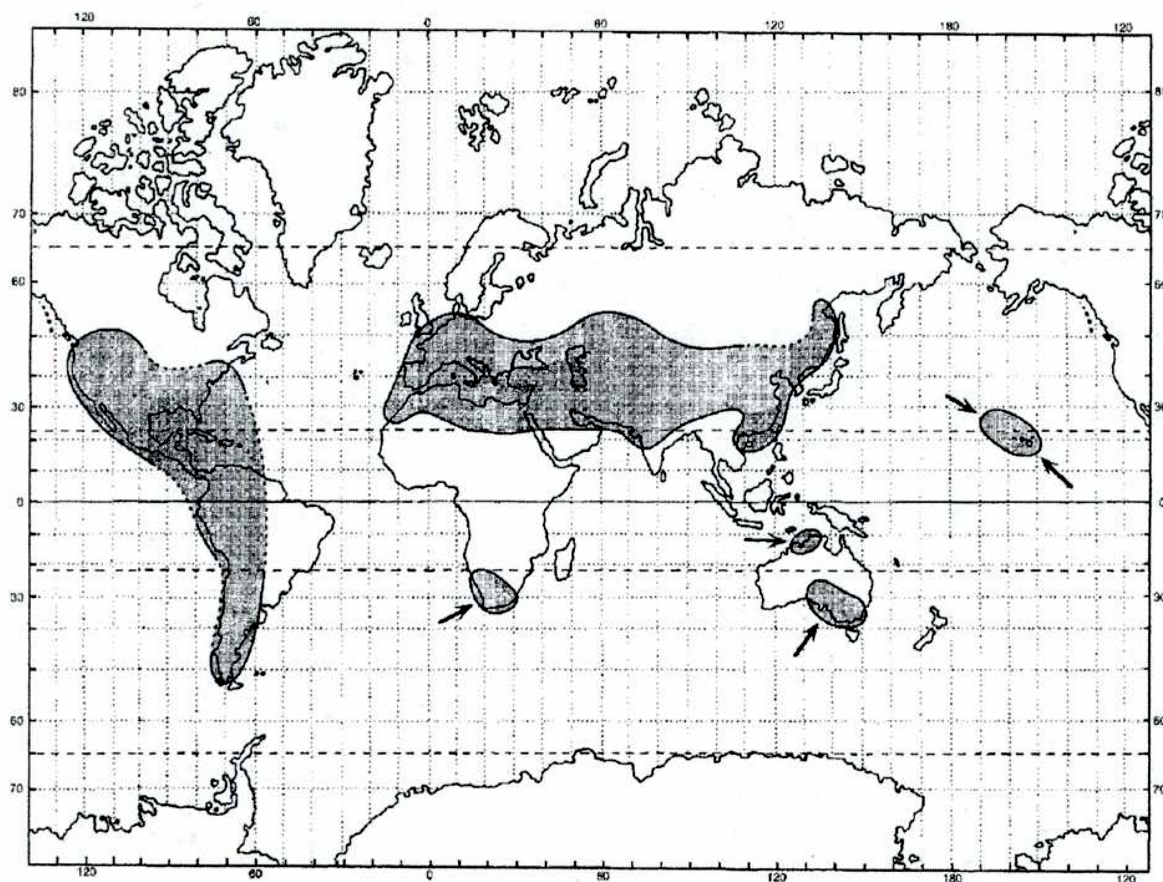


Figura 8. Distribución mundial de *Artemia*: área comprendida entre las zonas sombreadas rodeadas de líneas continuas. Las líneas punteadas indican que la conexión entre zonas sombreadas es desconocida. Las flechas indican zonas de disyunción en la distribución (Tomado de Brtek J. & Mura G, 2000).

1.5.8.1- Localización del género *Artemia* en la Argentina

La Argentina cuenta con grandes superficies de lagos, lagunas saladas y salinas bajo distintas condiciones climáticas, que son potenciales biotopos naturales para la instalación de poblaciones de *Artemia*. Hasta el momento, el género se ha encontrado en las provincias de Chaco, Córdoba, Buenos Aires, La Pampa y Santa Cruz (Cohen, 1995). El registro correspondiente a la provincia de Santa Cruz (Birabén, 1954) es muy importante porque extiende considerablemente el límite austral del género. *Artemia*,

identificada como *A. salina*, fue hallada en pequeños salares, cercanos a la costa atlántica, a 48° 3' de latitud Sur, en Bahía Laura y a 51° 4' latitud Sur, al norte de Río Gallegos, cerca del Cabo Buen Tiempo. Este límite austral del género se ha corroborado con el hallazgo reciente de una población chilena, asignada primeramente a *A. franciscana* y más recientemente a *A. persimilis*, en la laguna La Amarga, en Torres del Paine, a 51° de latitud Sur (Campos, 1996; Gajardo *et al.*, 1998). Hasta el momento la presencia de *A. persimilis* se ha confirmado en varias localidades argentinas en las provincias de Buenos Aires y La Pampa, y en algunas chilenas (Cohen *et al.*, 1999; de los Ríos, 2000). La especie *A. franciscana* se encuentra en todo el continente americano incluyendo la República Argentina (Crespo, 2002) y se halla actualmente en un proceso de especiación incipiente, evidenciado por su gran diversidad interpoblacional (Beardmore *et al.*, 1996). Junto con el proceso evolutivo, debe mencionarse la dispersión natural (eólica y por zoocoria) de los quistes y una dispersión artificial producida por la acción del hombre que involuntaria o deliberadamente, ha ido introduciendo quistes de esta especie, con fines económicos. En consecuencia, *A. franciscana* presenta una amplia distribución en toda América y existe una gran dificultad para definir límites en las áreas de contacto, entre esta especie y *A. persimilis* (Papeschi *et al.*, 2000).

Vanhaecke *et al.* (1987) y Triantaphyllidis *et al.* (1998) mencionaron en sus trabajos no mas de cuatro sitios donde se localiza *Artemia* en la Argentina pero es probable que en los nombres de las localidades y coordenadas existan algunas confusiones entre la ciudad de Buenos Aires y la provincia que tiene el mismo nombre donde se encuentran varios lagos salados y salinas (Angelelli, *et al.*, 1976; Drago & Quirós, 1996).

1.5.9- Ecología y variabilidad poblacional

A pesar de la amplia distribución del género *Artemia* su hábitat se encuentra restringido a salinas (frecuentemente sometidas a la explotación comercial de sal) y lagos o lagunas salados, donde la salinidad puede variar ampliamente entre 20 y 300 g l⁻¹ (Browne & MacDonald, 1982). El límite inferior de su intervalo de tolerancia a la salinidad está determinado principalmente por el límite superior de tolerancia de sus predadores en un biotopo dado. La tolerancia poblacional a la salinidad es uno de los factores esenciales para la colonización de nuevos ambientes, y su conocimiento puede ser importante para la comprensión del patrón de distribución geográfica. Particularmente los anostracos del género *Artemia* se han adaptado a vivir en ambientes sometidos a regímenes climáticos muy variados, con composiciones de salmueras muy diversas y caracterizados por presentar comunidades de baja diversidad y simples estructuras tróficas. Como una consecuencia de la gran plasticidad del grupo, cada población en particular se adapta a las condiciones climáticas generales de la región en la que se encuentra su cuerpo de agua y a las condiciones particulares de este biotopo. El resultado es que cada población presenta variables reproductivas y de su ciclo ontogenético que están en equilibrio con las condiciones ambientales locales. Esto hace que sea sumamente importante tener claramente identificada cada población.

Existen estudios realizados en el laboratorio donde se demuestra que diferentes poblaciones de *Artemia*, dentro de una misma especie, presentan diferencias estadísticamente significativas con respecto a características reproductivas (Lenz & Browne, 1991). De esta forma observando estas características se podrían diferenciar algunas especies. Por ejemplo, si se comparan poblaciones de *A. salina* (sinónimo válido de *A. tunisiana*) con poblaciones de *A. parthenogenetica*, se puede observar que las primeras siempre presentan puestas más pequeñas, un menor número de puestas/hembra, una menor cantidad de descendientes totales/hembra, un período reproductivo más corto y una menor longevidad, con respecto a las segundas. Además, *A. parthenogenetica* presenta una mayor relación entre cantidad de nauplios/cantidad de quistes (Browne & Halanych, 1989). Las poblaciones americanas de *A. franciscana*

y *A. persimilis*, se encuentran en las puntas opuestas de un variado espectro para muchos parámetros reproductivos y del ciclo de vida. Es así como *A. franciscana* presenta una mayor cantidad de descendientes por puesta, un mayor porcentaje de eclosión de quistes, los mayores periodos reproductivos y una mayor longevidad de los machos.

Se ha puesto a prueba la respuesta de las diferentes poblaciones de *Artemia* a variaciones en las condiciones de salinidad y temperatura observándose importantes variaciones en lo que se refiere a la tolerancia de algunas poblaciones a diferentes composiciones iónicas de las salmueras en las que habitan (Browne *et al.*, 1988; Browne & Bowen, 1991). Animales provenientes de lagos poco clorurados con altos niveles de carbonatos o sulfatos presentan muy poca viabilidad cuando se los cultiva en agua de mar concentrada y los obtenidos de lagos con muy altas concentraciones de cloruro de sodio que mueren cuando se los coloca en aguas altamente carbonatadas (Bowen, 1964; Bowen *et al.*, 1985; Bowen *et al.*, 1988).

Las especies bisexuales y las partenogenéticas en el Viejo Mundo presentan diferencias en cuanto a la temperatura óptima para desarrollarse (Lenz & Browne, 1991; Barata *et al.*, 1996a y b; Browne & Wanigasekera, 2000). *A. parthenogenetica* muestra un mayor rendimiento en altas temperaturas y en las poblaciones bisexuales el mayor rendimiento se observa a temperaturas bajas. También es interesante la divergencia en la respuesta a la temperatura que se observa entre algunas poblaciones de *A. franciscana* como la de Bahía de San Francisco (SFB) (EEUU), la de Macao (MAC) (Brasil) y la de Barotac Nuevo (BN) (Filipinas). Las dos últimas poblaciones derivaron de inoculaciones artificiales a partir de quistes de la población de SFB y se encuentran en cuerpos de agua que están sometidos a altas temperaturas. Al poco tiempo de producida la inoculación, las poblaciones MAC y BN mostraron una mayor supervivencia a temperaturas superiores a los 30° C, que la población norteamericana original (SFB). Algunos autores (Gajardo & Beardmore, 1993; Gajardo *et al.*, 1995) han inferido rápidos cambios evolutivos, en unas pocas generaciones, en las poblaciones MAC (Brasil) y de Salar de Atacama (Chile) por acumulación de nuevos alelos, como consecuencia de cambios estacionales drásticos en temperatura y salinidad, y de un tipo de recolección sesgada para la explotación comercial (Camara, 1996). También se

encontraron diferencias al comparar animales de la población SFB recolectados en el ambiente natural y animales de la misma población que fueron criados en laboratorio durante 25 años (Browne, 1985). Esto podría explicarse como una adaptación hereditaria a las altas temperaturas aunque la gran plasticidad que presenta *A. franciscana* no puede tomarse como una regla general (Lenz & Browne, 1991). Las diferentes condiciones climáticas (variaciones anuales de temperatura y precipitaciones) que se observan a través del continente americano, y particularmente de nuestro extenso territorio, además de los cambios hidrobiológicos locales en cada biotopo particular, se traducirían en una marcada y rápida tendencia a desarrollar características adaptativas locales, propias de cada población (selección de formas o cepas locales). Por otro lado, los datos experimentales sugieren que el género *Artemia* ha sido sometido a una gran variedad de presiones selectivas que se refleja en la gran variabilidad en sus características reproductivas y del ciclo de vida.

1.5.9.1- Aislamiento ecológico

Dado el relativo aislamiento de cada biotopo habitado por *Artemia* y el particular método de dispersión de los quistes por vientos o aves limícolas migratorias, probablemente se estén dando fenómenos de deriva genética que promuevan la diferenciación de formas locales en ambientes sometidos a cambios de tamaño poblacional causados por los sucesivos ciclos de extinción y recolonización, típicos de los ambientes temporarios (Gajardo *et al.* 1998). Como consecuencia existiría una gran heterogeneidad genética aún entre poblaciones de la misma especie (Gajardo *et al.*, 1995; Camara, 1996; Gajardo & Beardmore, 2001). Esta es la razón por la cual muchas poblaciones dentro de la 'super-especie' *A. franciscana* se encuentran aisladas ecológicamente. Por ejemplo, las poblaciones existentes en los salares continentales de América del Norte han experimentado grandes cambios en la composición de sus salmueras durante el Holoceno y en apariencia, algunas 'semi-especies' (especies incipientes) de *A. franciscana* no se han adaptado a esos cambios en el ambiente (Lenz & Browne, 1991). Existen estudios que han evidenciado la presencia de barreras genéticas entre poblaciones de *A. franciscana* parecidas morfológicamente que habitan

biotopos con similares concentraciones y tipos de salmueras pero que están geográficamente aisladas. Cuando este tipo de barreras genéticas limitan la supervivencia de la progenie híbrida es correcto describir a la población como una sub-especie dentro del complejo de especies, es decir que está próxima a alcanzar una nítida especiación. A partir del desarrollo de medios sintéticos fue posible poner a prueba el aislamiento reproductivo entre algunas poblaciones de *A. franciscana* que están aisladas ecológicamente en la naturaleza. Estas poblaciones pudieron ser hibridizadas artificialmente bajo condiciones muy restrictivas demostrándose que todas ellas forman parte de la misma super-especie (Browne & Bowen, 1991). Esto significa que todas representan un grupo monofilético de poblaciones alopátricas en el que se incluyen especies hermanas, semi-especies y sub-especies (Abreu-Grobois, 1987; Bowen *et al.*, 1985; Bowen *et al.*, 1988).

1.5.10- Importancia económica

A pesar que el camarón de la salmuera (*brine shrimp*) es conocido por el hombre desde hace cientos de años, su uso para emprendimientos comerciales comenzó a mediados del siglo 20, cuando muchos investigadores encontraron que las larvas de *Artemia* podían ser usadas como alimento en la cría de otras especies. Los nauplios de *Artemia* son un recurso natural utilizado habitualmente a gran escala como presa viva en la cría comercial de peces (piscicultura) y crustáceos marinos (camaronicultura); a escala menor, son utilizados en acuarofilia. Además, junto a otras especies de anostracos han sido propuestos como eslabón trófico en cadenas simples de reciclado de desechos industriales, agropecuarios o incluso domiciliarios por su gran capacidad para la filtración no selectiva (Sorgeloos, 1980; Jawahar & Brendonck, 1995). Una importante ventaja que presentan *Artemia* con respecto a las dietas inertes consiste en que pueden obtenerse fácilmente larvas en estado fresco, a partir de la eclosión de quistes producidos en el medio natural y que luego de ser procesados, estos quistes pueden ser almacenados en los laboratorios hasta el momento de su uso.

La historia de la comercialización y cosecha de los quistes de *Artemia* presenta una evolución muy interesante (Bengtson, 1991). En la década del 50' los suministros

comerciales de quistes de *Artemia* para uso como alimento para peces de acuario provenían de los EE.UU. Con el inicio de las investigaciones en la cría de peces y crustáceos marinos a gran escala a comienzos de los 60', surgieron nuevas oportunidades de comercialización para los quistes de *Artemia*. Dado el creciente incremento de la demanda de *Artemia* para el uso en investigaciones en acuicultura y camaronicultura en todo el mundo, la disponibilidad e incluso la calidad de las fuentes tradicionales (Bahía de San Francisco y el Gran Lago Salado) fueron disminuyendo, produciéndose además un aumento muy importante en el precio de los quistes. Este fue el principal motivo por el cual en todo el mundo se comenzó a desarrollar una intensa actividad de localización y estudio de nuevas poblaciones de *Artemia* que pudieran ofrecer fuentes alternativas de explotación (Amat *et al.*, 1990; Lavens & Sorgeloos, 2000). En la Universidad de Ghent se empezaron a desarrollar estudios teóricos y aplicados sobre la biología de *Artemia*. Desde allí algunos investigadores proclamaron que "el problema del desabastecimiento mundial de quistes era algo artificial y temporario". Efectivamente esto se verificó cuando comenzó la comercialización de quistes procedentes de otras partes del mundo, facilitada por la ayuda de organizaciones internacionales y empresas privadas. Para mediados de los 80' los cambios en la situación con respecto al desabastecimiento de los quistes de *Artemia* fueron obvios, con nuevos productos comerciales disponibles en el mercado que venían desde la Argentina, Australia, Brasil, Colombia, Francia y Tailandia. Los precios bajaron considerablemente y la competencia entre los nuevos países productores fue agresiva. Sin embargo, la calidad de eclosión de los productos comerciales no era constante y el valor nutricional variaba entre las diferentes fuentes comerciales y los diferentes lotes (Vanhaecke & Sorgeloos, 1983). Se agregó a esto que algunos sitios productores tradicionales (Gran Lago Salado de Utha) dejaron de existir temporariamente, debido a que ciertas condiciones ambientales fueron desfavorables durante largos períodos de tiempo (van Stapen & Sorgeloos, 1993; Sorgeloos, 1995). Actualmente, la producción de quistes, viabilidad y precio son relativamente estables gracias a los esfuerzos en las crecientes investigaciones sobre la biología de *Artemia* y la evaluación y prospección de nuevos sitios de extracción que se realizan en todo el mundo (Vu Do *et al.*, 1988; Barata, Hontoria, Amat, 1996; Mejía

Castro, *et al.*, 1999; Correa & Tapia, 1998; Alvarez & Sánchez, 1994; van Stappen, *et al.*, 2001; Zmora *et al.*, 2002). Además, constituyen factores importantes el mejoramiento en los métodos de cosecha y procesamiento de los quistes, la implementación de certificaciones de calidad y las modernas técnicas de mejoramiento del valor nutricional de *Artemia* mediante el uso de dietas de enriquecimiento (García-Ortega *et al.*, 1998; Nghia *et al.*, 2001). El precio de los quistes es ahora dependiente de la calidad, encontrándose tipos más económicos (de baja calidad) caracterizados por nauplios grandes con pocos niveles de ácidos grasos esenciales y quistes de gran calidad que eclosionan de manera sincronizada dando pequeños nauplios libres de contaminantes y con altos niveles de ácidos grasos esenciales. El consumo de quistes de *Artemia* desde mediados de los 80' ha aumentado a cientos de toneladas anuales como resultado de la expansión mundial en el cultivo comercial de peces marinos, camarones y langostas (Triantaphilidis *et al.*, 1994). Para muchas especies que son fuertes candidatos para su aplicación en acuicultura, la transición desde los proyectos piloto hasta la comercialización ha comenzado desde hace poco tiempo. En vista de la creciente demanda de larvas de peces y camarones y la esperada extensión de la lista de nuevas especies de peces con capacidad para el cultivo comercial (e. g., mahi-mahi, mero, etc.) la demanda de quistes de *Artemia* se presume que irá en aumento en los años venideros (Sorgeloos, 1989; Sorgeloos & Sweetman, 1993; Naihong, *et al.*, 1999). La producción artesanal, a pequeña escala, a pesar de que presenta un buen desarrollo técnico en varios países de Latinoamérica y el sur de Asia (Sorgeloos, 1987; Naihong *et al.*, 1994), no contribuirá significativamente al abastecimiento mundial de quistes. Sin embargo, estos emprendimientos comerciales pueden proveer interesantes posibilidades para el desarrollo de economías locales con restringidas posibilidades para la importación (Hendry, *et al.*, 2001; Djunaidah, *et al.*, 2001).

2. Hipótesis y Objetivos

2.1-Hipótesis principales

- ✓ Tratándose de especies crípticas como es el caso de las de *Artemia*, para asegurar la asignación a una determinada especie, debe recurrirse a diversas metodologías. (Triantaphyllidis 1997; De los Ríos, 2000; Amat *et al.*, 1994; Rodríguez Gil *et al.*, 1998; Cohen *et al.*, 1999)
- ✓ Dado que, antes que una hembra ovígera de anostraco libere al medio los productos de una puesta (quistes o "nauplii") ya se ha iniciado en sus vías reproductivas la maduración de una segunda camada, es posible reconocer una *secuencia de estadios reproductivos* (etapas de maduración de oocitos = ciclo reproductivo) y una *secuencia de figuras* (superposición de estadios de 2 ciclos reproductivos sucesivos = ciclo de puesta) (Brendonck, 1991).
- ✓ Las hembras de *Artemia persimilis*, liberan en ausencia de machos, oocitos no fecundados al medio.
- ✓ Poblaciones de una misma especie presentan variaciones locales en algunos parámetros reproductivos y en características del ciclo de vida que se relacionan con las condiciones climáticas del biotopo natural al que están adaptadas. La salinidad es un factor ambiental que afecta la morfología y morfometría, las variables reproductivas y la longevidad. (Browne,1988; Williams, 1998, Triantaphyllidis, 1995).
- ✓ Ambos sexos presentan en las antenas y/o en los segmentos genitales, estructuras cuticulares que están relacionadas con el reconocimiento o la estimulación sexual a nivel de especie durante la búsqueda de pareja y el amplexo.(Wilson *et al.*, 1993; Cohen *et al.*, 1999; De Los Ríos, *et al.* 2000)

2.2-Objetivos

- ✓ Confirmar la identidad específica de la población de *Artemia* de la laguna Colorada Chica (La Pampa, Argentina), y su grado de semejanza con otras poblaciones de las 2 especies americanas de *Artemia*, por medio de la morfometría y la morfología, en hembras y machos. Proponer nuevas variables morfométricas y describir algunas diferencias morfológicas específicas en ambos sexos.
- ✓ Describir los diferentes *estadios* en el ciclo reproductivo (del oocito en el ovario, hasta el quiste o larva nauplio, liberados al medio), caracterizarlos morfológicamente y postular un modelo de secuencia de las diferentes *figuras* de puesta (superposición de ciclos reproductivos entre dos puestas consecutivas) y su duración relativa en hembras maduras de una población argentina de *Artemia persimilis* Piccinelli y Prosdocimi en condiciones estandarizadas de laboratorio.
- ✓ Describir los ciclos reproductivo y de puesta de hembras aisladas de machos (vírgenes).
- ✓ Determinar si existen factores masculinos que influyan sobre la madurez sexual de la hembra.
- ✓ Medir diversas variables reproductivas y del ciclo de vida de la población experimental y determinar experimentalmente de qué forma influye la salinidad del medio sobre las variables reproductivas y del ciclo de vida.
- ✓ Estudiar si algunas estructuras cuticulares masculinas y femeninas tienen alguna correspondencia y/o forman parte de un mecanismo tipo "llave-cerradura" a nivel de especie, durante el abrazo copulatorio (amplexo).

3. Materiales y Métodos

3.1- Animales

Todos los ejemplares utilizados en las distintas experiencias pertenecen al género *Artemia* (Custacea, Anostraca) y dentro de él a las poblaciones argentinas de: *A. persimilis*, de la Laguna Colorada Chica, y *A. franciscana*, de la laguna Mar Chiquita. Como material de referencia con fines comparativos, se consideraron: la población de Salinas Grandes de Hidalgo (La Pampa, Rep. Argentina), para *A. persimilis* y la del Gran Lago Salado (Utah, EEUU), para *A. franciscana*. Los quistes de las poblaciones argentinas fueron coleccionados en el campo, procesados según las técnicas habituales, almacenados en el Banco de quistes del Grupo *Artemia* (FCEN), y finalmente eclosionados en el laboratorio para obtener los animales de experimentación. El Banco de quistes mencionado, fue generado en el marco de un Proyecto CYTED (Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo) de colaboración entre España, Portugal y varios países latinoamericanos (1995-2000). Los quistes procedentes de la población norteamericana se obtuvieron a partir de quistes cedidos por el Dr. Francisco Amat (IATS; CSIC; Castellón, España). La ubicación geográfica de las poblaciones argentinas estudiadas puede verse en la figura 9.

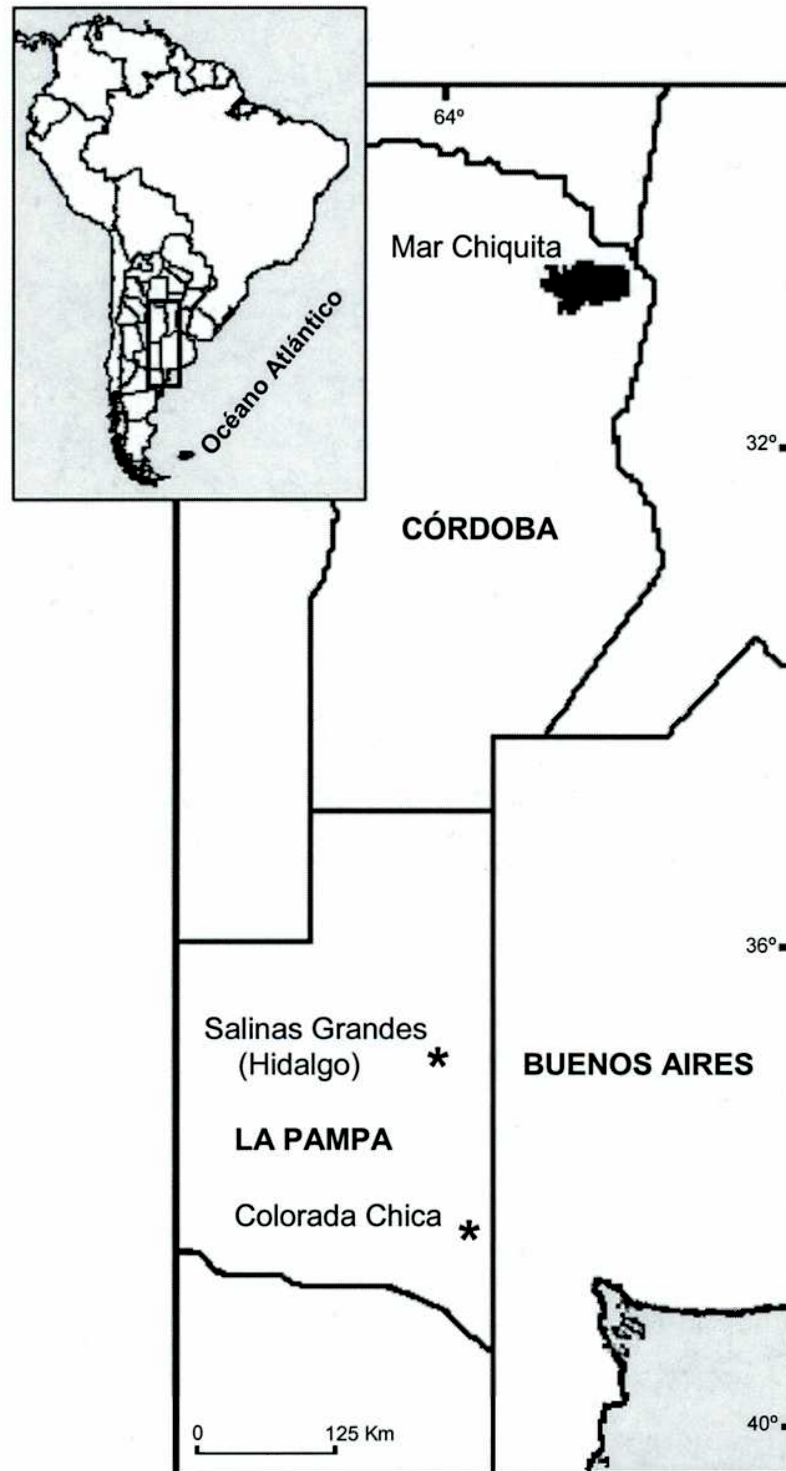


Figura 9. Ubicación geográfica de las poblaciones de *Artemia* argentinas estudiadas.

Laguna Colorada Chica: en la provincia de La Pampa a 38° 23' de latitud sur y 63° 36' de longitud oeste. Es un cuerpo de agua alargado en sentido nor-noroeste a sud-sudeste, de una longitud aproximada a los 15 km y de un ancho máximo de 1.000 m (Angelelli *et al.*, 1976)

Salinas Grandes de Hidalgo: en la provincia de La Pampa a 37° 13' de latitud sur y 63° 26' de longitud oeste. Se encuentra emplazada en una fosa alargada que tiene dirección noreste-sudoeste con una longitud de 10 km y un ancho de 5 km (Angelelli *et al.*, 1976)

Laguna Mar Chiquita: en la provincia de Córdoba a 30° 39' de latitud sur y 62° 30' de longitud oeste. Esta laguna salada, que es considerada una de las más grandes del mundo, posee una longitud aproximada de 130 km y un ancho de 115 km. Su extensión aumentó aproximadamente, desde 1900 km² en 1977 a 5000 km² en 1982 (Reati *et al.*, 1997)

Gran Lago Salado (GSL): en el Estado de Utah, en los Estados Unidos, a 41° de latitud norte y 112° 30' de longitud oeste. En este lago, que posee una superficie aproximada de 4.300 km², *A. franciscana* produce grandes cantidades de quistes que son cosechados y explotados comercialmente (Wayne & Gliwicz, 2001).

3.2- Obtención de quistes

Los quistes de *Artemia* flotan usualmente en el agua, y al ser empujados por el viento pueden ser arrastrados hasta las orillas de las salinas o lagunas saladas, donde se acumulan. El procesamiento comienza colocando porciones de tierra conteniendo quistes dentro de baldes con agua salada (de la misma laguna) de esta forma los quistes al flotar se separan de la tierra y otras basuras que quedan en el fondo. Luego se procede a filtrar todo lo que se encuentre flotando. Este filtrado se realiza a través de dos tamices, el primero de malla gruesa (así se retienen basuras indeseadas y se deja pasar a los quistes) y el segundo de malla fina (entre 100-200 µm) que retiene los quistes dado que estos tienen un diámetro mayor a los 200 µm (Cohen *et al.*, 1999). Los quistes así obtenidos son guardados en salmuera para ser procesados más tarde en el laboratorio. La separación fina de los quistes se hace por una técnica de flotación

diferencial por densidad, en aguas salada y dulce, lo que elimina cáscaras, quistes inviables y restos de impurezas (Amat, 1985). Una vez separados, los quistes se secan en estufa a 35-40°C y luego se almacenan a 4°C en heladera.

3.3- Eclosión

Para la hidratación y eclosión de los quistes se utilizó un 'eclosionador' (Fig. 10) dónde, por medio de aireación continua desde el fondo, se aseguró el movimiento constante de los quistes y por lo tanto una hidratación uniforme. El 'eclosionador' se mantuvo con una fuente de luz incandescente directa, que proveía no sólo de iluminación sino también de calor. La fuente luminica es imprescindible dado que la iluminación es una de las claves que actúa en la desactivación de la diapausa (van der Linden *et al.* 1985; Drinkwater & Clegg, 1991) y además produce el calentamiento de la solución de eclosión a una temperatura aproximada de 26 ± 2 °C.

La concentración salina de la solución de eclosión fue mantenida en 15 g l⁻¹ para los quistes pertenecientes a poblaciones de *A. persimilis* y de 35 g l⁻¹ para los pertenecientes a poblaciones de *A. franciscana*. Esta diferencia de concentraciones es la más adecuada para obtener el mayor rendimiento de eclosión en las diferentes poblaciones de *Artemia* estudiadas (Amat *et al.*, 1994). Luego de 24-48 horas la aireación fue suspendida y, aprovechando el fototactismo positivo de los primeros estadios larvales, los nauplios fueron concentrados con luz y separados de las cáscaras y de los quistes que no llegaron a eclosionar. Las salmueras utilizadas en todas las experiencias fueron obtenidas a partir de la disolución de bloques de sal obtenidos en las Salinas Grandes de Hidalgo. Las soluciones saladas, fueron filtradas a través de papel de filtro, utilizando una bomba de vacío. La concentración final de las distintas soluciones fue determinada con un salinómetro-refractómetro portátil. Este mismo aparato se usó para controlar y ajustar periódicamente la salinidad de todos los recipientes de cría de animales a medida que transcurrieron las diversas experiencias.

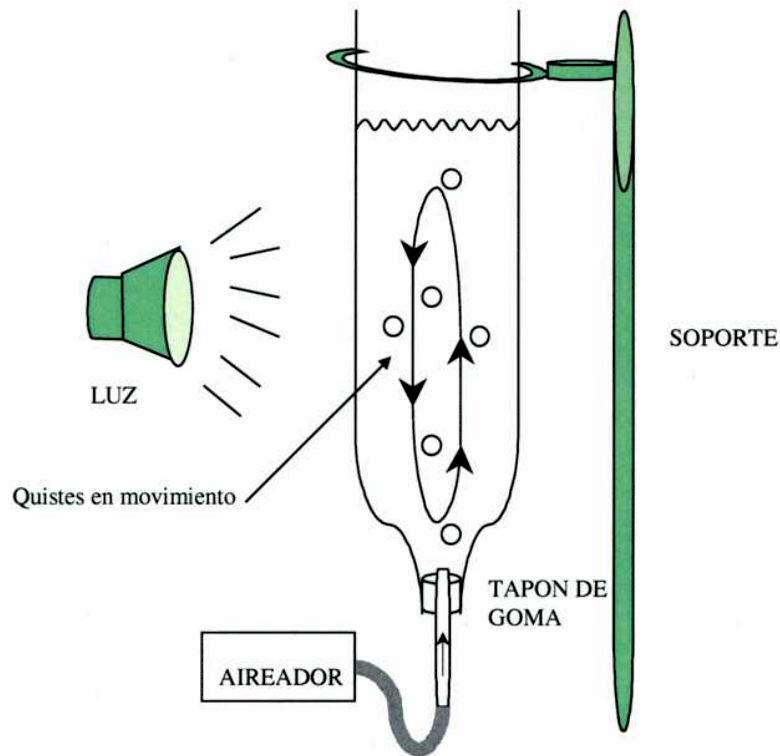


Figura 10. Dispositivo utilizado para realizar la eclosión de los quistes. Se muestra el contenedor de la solución de eclosión con los quistes en movimiento. El sistema de aireación desde la parte inferior del dispositivo permite un movimiento constante de los quistes como indica la dirección de las flechas. La fuente lumínica externa calienta la solución a aproximadamente 26 ± 2 °C.

3.4- Cría de los animales

Los nauplios resultantes de la eclosión de los quistes se transfirieron a vasos de precipitados, que sirvieron como recipientes de cría. Los recipientes se acomodaron dentro de peceras con agua, que fueron climatizadas a 26 ± 1 °C, actuando como baños térmicos. La salinidad fue aumentada desde 15 o 35 g l⁻¹ hasta la correspondiente a cada experimento. Los cultivos fueron mantenidos con iluminación fluorescente continua, aireación constante, pH: 8.5 y temperatura: 26 ± 1 °C controlada por termostato. Para todas las experiencias se trabajó a una densidad constante de 1

animal / 10 ml de medio de cultivo. Los detritos fueron removidos tres veces por semana y junto con esa operación se controlaron y ajustaron las condiciones de cultivo, para evitar cambios del medio durante la alimentación de los animales o por efecto de la evaporación.

3.4.1- Alimentación

Los cultivos de algas unicelulares utilizadas como alimento, fueron desarrollados a partir de inóculos de *Dunaliella salina* y *Tetraselmis suecica* facilitados por el Dr. Francisco Amat (IATS, CSIC. Castellón, España). Estos fueron mantenidos, fertilizados y repicados continuamente para evitar su envejecimiento y/ o contaminación, y para su reposición a medida que fueron siendo utilizados en la alimentación de los animales. Para determinar la concentración celular de los cultivos se utilizó una cámara de Neubauer o hemocitómetro. La ventaja de este método manual está en permitir registrar la cantidad de células al mismo tiempo que se estudia la viabilidad y pureza de los cultivos.

Los animales fueron alimentados tres veces por semana con 1 ml/ animal de una solución mezcla de algas a una concentración aproximada de $40\text{-}50 \times 10^6$ células/ ml de *Dunaliella* sp. y *Tetraselmis* sp.; según los patrones de alimentación encontrados en la bibliografía, esta cantidad de alimento es considerada *ad libitum* (Barata, 1996a). El medio de cada recipiente de cría se llevó nuevamente a volumen, y se ajustó la salinidad.

3.4.2- Sexado de los animales utilizados en las experiencias reproductivas

A fin de garantizar que las hembras y machos utilizados en las experiencias reproductivas fueran individuos virginales, los animales inmaduros en estadio post-larval avanzado, fueron narcotizados con una solución de agua carbonatada y sexados bajo microscopio estereoscópico. Para ello se utilizaron los caracteres sexuales incipientes, presentes ventralmente en el primer y segundo segmentos abdominales

(Cohen *et al.*, 1999). En los machos se observó ventralmente una pieza basal única con un par de evaginaciones distales, que corresponden a esbozos de los penes. Los cuales se proyectaban posteriormente y podían distinguirse en vista lateral. En las hembras se encontró ventralmente en esta región una prominencia impar media, que se proyectaba posteriormente y corresponde al esbozo del ovisaco. También se utilizaron para el sexado, las diferencias morfológicas que se encuentran en la segunda antena, dado que este órgano en los machos se agranda considerablemente para dar una estructura que sirve en el abrazo precopulatorio, mientras que en las hembras tiende a reducirse a una pequeña estructura triangular (Cohen *et al.*, *op. cit.*).

4.1 Nuevos aportes a la caracterización morfológica de la población de *Artemia* de la laguna Colorada Chica, y confirmación de su identidad específica

Introducción

La condición críptica de las especies de *Artemia*, junto con la gran plasticidad morfológica de las poblaciones naturales ante las variaciones del medio (que se manifiesta en una enorme variabilidad), han hecho necesario el uso simultáneo de más de un criterio taxonómico para la identificación específica, así como la búsqueda permanente de nuevos criterios.

Para realizar una correcta identificación de las poblaciones que van siendo descubiertas, los métodos habituales que se utilizan incluyen: caracterización morfológica (comparaciones de caracteres morfológicos, morfometría, biometría de quistes y larvas nauplios), caracterización reproductiva (medición de diversas variables reproductivas, cruzamientos inter e intraespecíficos), caracterización citogenética (número de cromosomas, número de cromocentros, análisis de mitosis y meiosis, contenido nuclear, etc.), caracterización bioquímica (patrones de movilidad electroforética de proteínas, perfil bioquímico de ácidos grasos, etc.), caracterización molecular (tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP), AFPL, análisis del ADN mitocondrial, etc.), caracterización ecológica (tolerancia a diversas variables ambientales: temperatura, salinidad, composición iónica de las salmueras, etc.; tipo de ambientes ocupados: tálaso o atálasohalinos).

Trabajos realizados sobre la morfología de *Artemia* han mostrado que los individuos presentan cambios morfológicos que están en relación con las condiciones ambientales a las que son criados. También se encuentran diferencias entre hembras y machos de la misma población aun cuando los animales son criados bajo las mismas condiciones, demostrándose la presencia de una variabilidad intrínseca además de una variabilidad ambiental (Gilchrist, 1960). Resultados similares fueron encontrados por Amat (1980) después de analizar exhaustivamente las características morfológicas de veintidós poblaciones de *Artemia* del mediterráneo y comparar estos resultados con los encontrados en la población de *A. franciscana* proveniente de la Bahía de San Francisco (California, EE.UU.). Amat concluyó que la variación encontrada en los caracteres morfológicos entre diferentes poblaciones de *Artemia* permiten la

identificación y diferenciación entre las 2 especies involucradas, la europea y la americana, pero resulta difícil la distinción entre poblaciones de la misma especie.

Para incrementar la confiabilidad sobre la observación de las semejanzas o diferencias en los caracteres morfológicos entre poblaciones, se puede complementar el método con mediciones de diferentes estructuras corporales (morfometría) que serán luego, sometidas a análisis estadísticos. Esto permite poner en evidencia de forma objetiva, las diferencias observadas entre los grupos en estudio, y lograr así una mayor sensibilidad del método de caracterización morfológico. Dada la gran variabilidad en la morfología de los individuos de una misma o de diferentes poblaciones relacionada con diversos factores ambientales, la condición principal para el uso de esta metodología es criar los animales de todas las poblaciones estudiadas, desde quistes hasta adultos, bajo las mismas condiciones experimentales. A pesar de esta complicación, la metodología en sí misma es bastante simple, porque implica medir con ocular micrométrico bajo microscopio estereoscópico u óptico, las diferentes partes del cuerpo y estructuras de los animales adultos en lugar de la utilización de técnicas más sofisticadas, complicadas y costosas.

Con el objeto de confirmar la asignación específica de la población en estudio en la presente Tesis, hemos realizado, en primer lugar, la caracterización morfológica de la población de *Artemia* presente en la laguna Coloraca Chica, tanto en hembras como en machos, aportando nuevos caracteres morfológicos, e introduciendo en el análisis morfométrico nuevas variables para cada sexo, no consideradas hasta ahora en los análisis tradicionales. Esta caracterización consistió en un análisis comparativo de las diferencias morfológicas observadas (morfología) y de las mediciones realizadas (morfometría) sobre algunos caracteres de los adultos, de la población argentina de Colorada Chica, con los de otras 3 poblaciones americanas: dos poblaciones de *Artemia* de diferentes localidades argentinas, laguna Mar Chiquita y Salinas Grandes de Hidalgo, y la población del Gran Lago Salado de Utah, EE.UU. (tabla 1). Las observaciones y mediciones fueron realizadas en ambos sexos, y los datos fueron analizados separadamente.

Metodología

Con el fin de establecer comparaciones con la población de Laguna Colorada Chica (CCh), (provincia de La Pampa, Argentina), se utilizaron quistes de las siguientes poblaciones:

1. Salinas Grandes de Hidalgo (SGH): población de referencia de *A. persimilis* (provincia de La Pampa, Argentina)
2. Laguna de Mar Chiquita (MCh) (provincia de Córdoba, Argentina)
3. Gran Lago Salado (GLS): población de referencia de *A. franciscana* (Utah, EE.UU.)

Las observaciones morfológicas y mediciones corporales fueron realizadas sobre animales criados en el laboratorio bajo las mismas condiciones de cultivo, ya descriptas en el ítem 3.4 de Materiales y Métodos general, a una salinidad final de 65 g l⁻¹.

Morfología:

Se hicieron observaciones morfológicas bajo microscopio estereoscópico de los adultos de ambos sexos de las 4 poblaciones, y se tomaron fotos de estructuras descriptas.

Morfometría:

20 hembras y 20 machos adultos de cada una de las 4 poblaciones fueron narcotizados con agua carbonatada y medidos bajo microscopio estereoscópico. Se midieron las siguientes variables morfométricas según se indica en la figura 11.

Longitud total (LT)

Longitud del abdomen (LAb)

Longitud desde el 3er. segmento abdominal hasta el ano (LAb3)

Longitud del 8vo. segmento abdominal (LAb8)

Longitud promedio de la furca (LF)

Longitud de la antena 1 (LA)

Diámetro del ojo compuesto (DOC)

Ancho de la cabeza (AC)

Ancho del 3er. segmento abdominal (AAb3)

Distancia entre los ojos compuestos (DEO)

Cantidad de sedas en la rama furcal derecha (#SFD)

Cantidad de sedas en la rama furcal izquierda (#SFI)

Se tomó además una medida exclusiva para cada sexo: el ancho del ovisaco en las hembras (ancho máximo sin incluir las espinas laterales) y el ancho máximo del tubérculo frontal en los machos.

Las comparaciones estadísticas entre los tubérculos frontales presentes en la antena 2 de los machos, fueron realizadas mediante un modelo de ANOVA de un factor. Para las comparaciones de las variables morfométricas entre hembras y machos se utilizó la estadística de "t" para muestras independientes (Sokal & Rohlf, 1995).

Para incrementar la sensibilidad del estudio morfológico y maximizar la separación entre las cuatro poblaciones en estudio, se evaluaron estadísticamente las diferencias, utilizando todas las variables morfométricas en conjunto mediante un análisis discriminante (AD). Este análisis es uno de los más utilizados para este tipo de procesamiento en el que se incluyen al mismo tiempo más de una variable, y la existencia de diferentes grupos está determinada a priori (Everitt, 2001; Legendre, 1998). La esencia básica del AD es determinar cómo se distinguen los grupos (en este caso las poblaciones) naturalmente existentes, observando las diferencias en los valores promedio de las variables discriminatorias (McGarigal, 2000). Especialmente uno podría preguntarse si dos o más grupos son significativamente diferentes unos de otros con respecto a las medias de una variable en particular. Visto de esta forma el AD puede entenderse como un análisis de la varianza (ANOVA) de un factor. Queda claro que si el valor promedio (media) de una variable es significativamente distinto en diferentes grupos, entonces podremos decir que esa variable nos posibilita discriminar entre los grupos.

Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa *STATISTICA 5*.

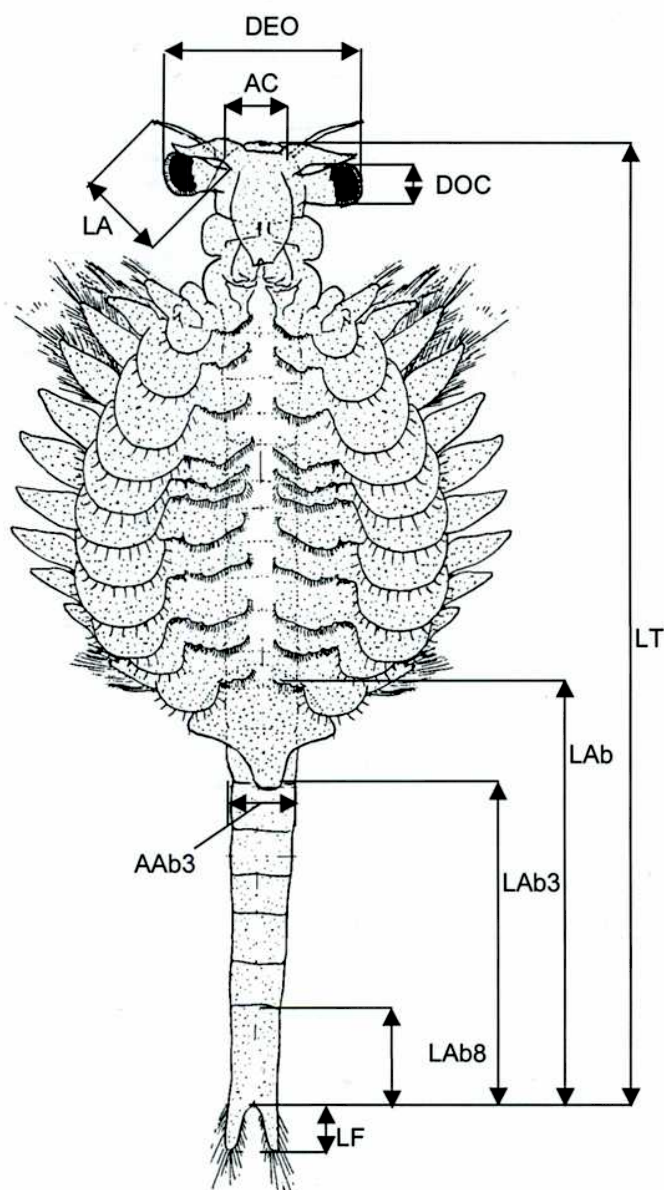


Figura 11. Medidas corporales utilizadas para la caracterización morfométrica de *Artemia*. **AAb3**- Ancho del tercer segmento abdominal. **AC**- ancho de cabeza medido como la distancia entre las dos antenas 1. **DEO**- distancia entre ojos, medida desde los extremos de los ojos compuestos. **DOC**- diámetro del ojo compuesto. **LA**- largo de la antena 1. **LAB**- longitud del abdomen tomada desde el final del tórax hasta el ano. **LAB3**- longitud desde el comienzo del tercer segmento abdominal hasta el ano. **LAB8**- longitud desde el comienzo del octavo segmento abdominal hasta el ano. **LF**- longitud promedio de la furca, medida desde el ano hasta el extremo distal de la furca, excluyendo las sedas furcales. **LT**- longitud total tomada desde la frente hasta el ano. (Tomado de Amat, 1980)

En el caso en que se utilice una sola variable como discriminante, la prueba de significación estadística es la de "F". Sin embargo, usualmente, como en el presente caso, se incluye en los análisis más de una variable, para encontrar cuál de ellas contribuye más a discriminar entre los grupos. Podemos pensar este tipo de análisis como un procedimiento para identificar límites entre los grupos de entidades (especies), los que estarían dados en términos de las variables que distinguen o discriminan entre las entidades en el respectivo grupo. Específicamente el AD implica obtener la combinación lineal, función canónica o función discriminante de dos o más variables, que discriminaría de la mejor manera entre los grupos establecidos desde un comienzo. La función canónica está definida como la combinación más favorable de las variables originales, donde cada variable es ponderada de acuerdo a su habilidad para discriminar entre los grupos. Cuando se aplica el análisis, cada entidad pasa a tener un valor en la función canónica y cuando se promedian todos los valores dentro de cada grupo se obtiene la media canónica del grupo. Esta media canónica es también llamada centroide, porque es la media de la composición de muchas variables al mismo tiempo. El centroide indica la ubicación más típica de una entidad, perteneciente a un grupo en particular; la comparación de los centroides de todos los grupos, nos muestra la separación a lo largo de la dimensión definida por la función canónica. El poder discriminatorio que tiene cada función canónica está medido por la magnitud de su eigenvalor o valor propio: cuanto mayor es el *eigenvalor*, mayor es la capacidad que tiene esa función para separar los distintos grupos. Una manera de medir la utilidad o no de una función canónica es examinar los coeficientes de correlación canónica. Estos coeficientes indican la correlación múltiple que existe entre las variables discriminatorias originales y cada función canónica resultante del análisis. El valor de los coeficientes de correlación canónica puede variar entre cero y uno; un valor de cero indica que no existe relación entre los grupos y la función canónica, mientras que valores cercanos a uno indican altos grados de asociación.

Resultados

Poblaciones	Localización geográfica	Individuos utilizados
Colorada Chica (CCh)	Provincia de La Pampa, Argentina 38° 23' S; 63° 36' O	22 hembras 21 machos
Salinas Grandes de Hidalgo (SGH)	Provincia de La Pampa, Argentina 37° 13' S; 63° 26' O	20 hembras 20 machos
Mar Chiquita (MCH)	Provincia de Córdoba, Argentina 30° 39' S; 62° 30' O	21 hembras 20 machos
Gran Lago Salado (GLS)	Estado de Utah, Estados Unidos 41° N; 112° 30' O	20 hembras 20 machos

Tabla 1. Ubicación geográfica de las poblaciones americanas del género *Artemia* utilizadas en este estudio.

Morfología

Antena 2 de los machos

En los machos adultos del género *Artemia*, la antena 2 se encuentra notablemente modificada y presenta una forma particular que le permite actuar como un órgano de enganche para abrazar a la hembra durante la cópula. El artejo basal de esta antena presenta en posición medio-basal una protuberancia de forma redondeada llamada tubérculo frontal (*frontal knob*). Esta estructura suele presentar formas algo diferentes entre las diversas especies de *Artemia* (Mura, 1989). En nuestro trabajo pudimos comprobar que en las especies americanas el tubérculo es siempre redondeado, pero difiere en tamaño. Por lo tanto, para cuantificar estas diferencias, comparamos los valores del diámetro del tubérculo frontal de las 4 poblaciones antes mencionadas, mediante un análisis de la varianza (ANOVA) de un factor, utilizando la variable "población" como factor de separación, encontrando diferencias significativas ($p < 0.001$) en los valores medios. Como se muestra en la tabla 2, utilizando la prueba

estadística de Tukey de comparaciones de medias, la población CCh queda asociada a SGH, población de referencia de *A. persimilis*, y separada de la población MCh, que se asocia con GLS, población de referencia de *A. franciscana*. Las poblaciones de CCh y SGH se encuentran en un mismo grupo que presenta el tubérculo frontal más grande, característico de *Artemia persimilis* y las poblaciones de MCh y GLS forman otro grupo donde el diámetro del tubérculo frontal es menor, como puede observarse en la figura 12.

Población analizadas	Valor promedio medido en mm	Grupos
Colorada Chica (CCh)	0.218095	
Salinas Grandes Hidalgo (SGH)	0.217000	
Mar Chiquita (MCh)	0.126000	
Gran Lago Salado (GLS)	0.128000	

Tabla 2. Grupos de poblaciones formados al aplicar el test de Tukey de comparación de medias sobre la variable morfológica ancho máximo del tubérculo frontal. Las líneas verticales unen poblaciones de *Artemia* que no presentan diferencias significativas entre sí.

Este carácter morfológico no se ha utilizado habitualmente para discriminar entre las diferentes poblaciones de *Artemia*, dado que en la mayoría de los análisis morfológicos sólo se utilizan las medidas corporales de las hembras (Zúñiga *et al.*, 1999; Cohen, *et al.*, 1999). En consecuencia puede decirse que el tamaño del tubérculo frontal resulta muy útil como carácter morfológico y morfométrico para separar las poblaciones de *A. franciscana* de las de *A. persimilis* dado que entre ambas especies el tamaño de esta estructura es claramente diferente, como se observa en las figuras 12 y 13.

Puede observarse que la morfología del artejo distal de la antena 2 del macho, es diferente entre los adultos de las 4 poblaciones consideradas, siendo en las de CCh y SGH, falciforme (en forma de hoz) y en las de MCh y GLS, de forma triangular y más ancho (Fig. 13).

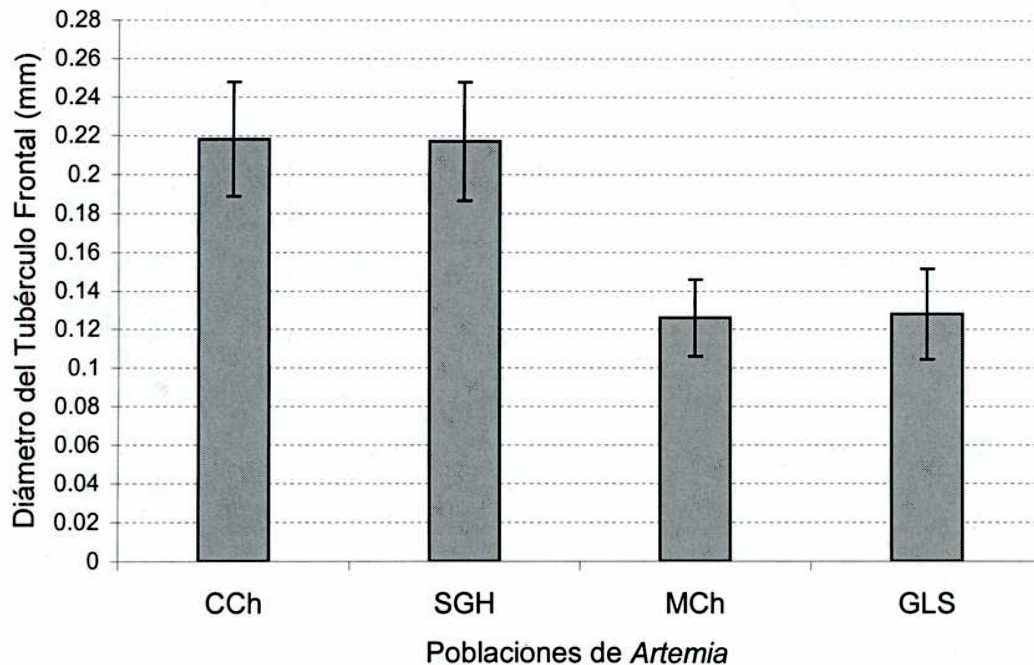


Figura 12. Representación gráfica de los valores promedios del diámetro del tubérculo frontal medido en cuatro poblaciones de *Artemia* americanas. Las diferencias en los valores de las medias son significativas a un $p < 0.001$. Para la identificación de las poblaciones ver tabla 1.

Segmentos genitales de las hembras

Con respecto a las diferencias morfológicas encontradas en las hembras de las 4 poblaciones analizadas, podemos destacar que la forma de los ovisacos es muy similar. Sin embargo, como puede verse en la figura 14 en la parte anterior del ovisaco de las poblaciones de MCh y GLS aquí consideradas, se observan unas proyecciones cuticulares laterales muy conspicuas, con forma de aleta, al nivel del límite entre el tórax y el abdomen. Estas estructuras ya fueron observadas por otros autores en poblaciones de *A. franciscana* y *A. parthenogenetica* pero no fueron utilizadas como caracteres discriminatorios (Pérez *et al.* 1994). En las poblaciones de SGH y CCh, estas proyecciones están presentes pero son mucho más pequeñas que en el otro grupo. Las hembras de CCh y SGH (*A. persimilis*) presentan un par de proyecciones cuticulares látero-dorsales que, junto con el tergo del segundo segmento abdominal forman una estructura en forma de “silla de montar”.

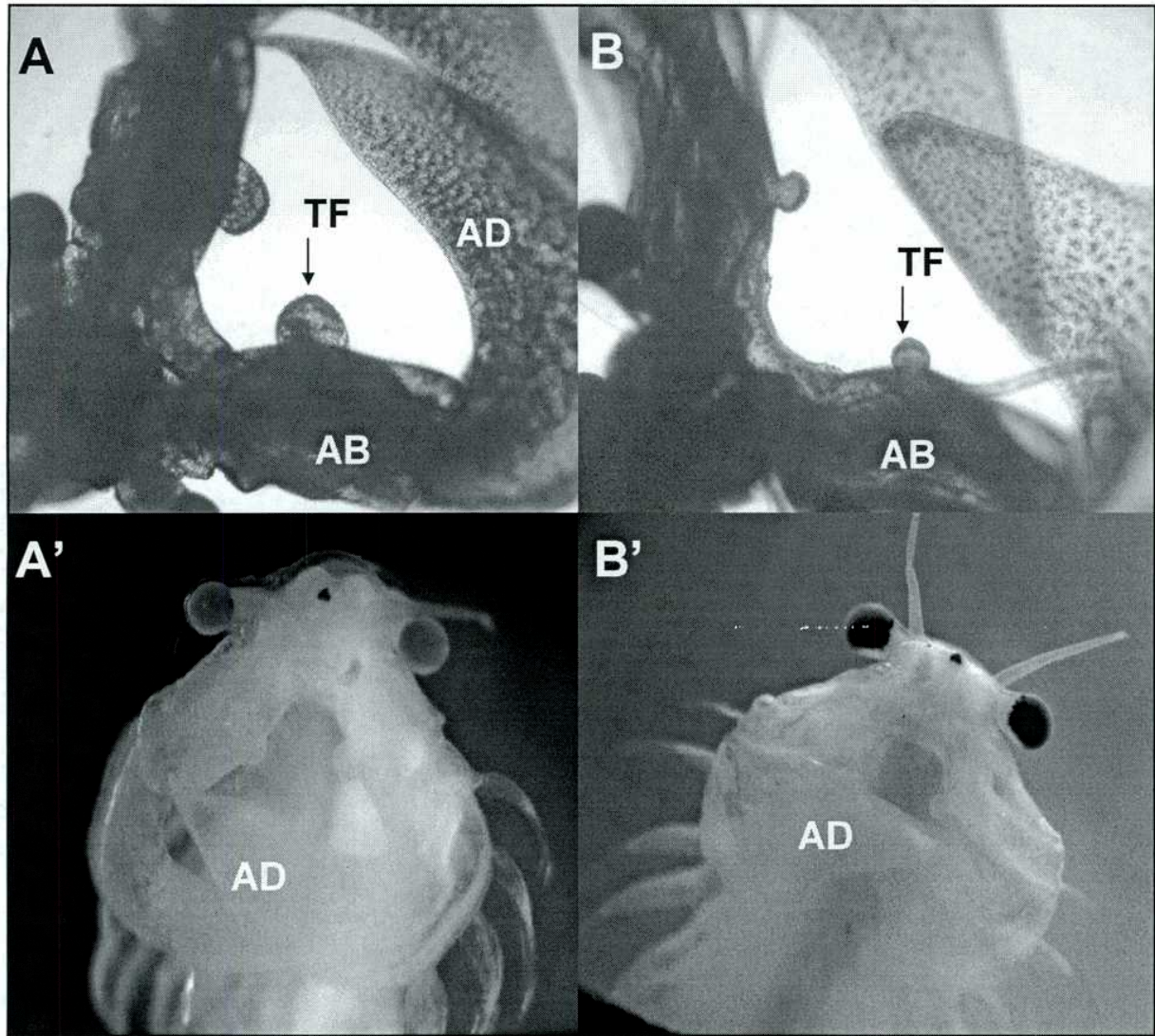


Figura 13. Diferencias en la antena dos de los machos de *Artemia* mostrando la ubicación del tubérculo frontal (TF) en el artejo basal del exopodito (AB) y artejo distal del exopodito (AD). A y A' especímenes pertenecientes a *A. persimilis*; B y B' pertenecen a *A. franciscana*. (Aumentos: A y B 50x; A' 32x; B' 25x).

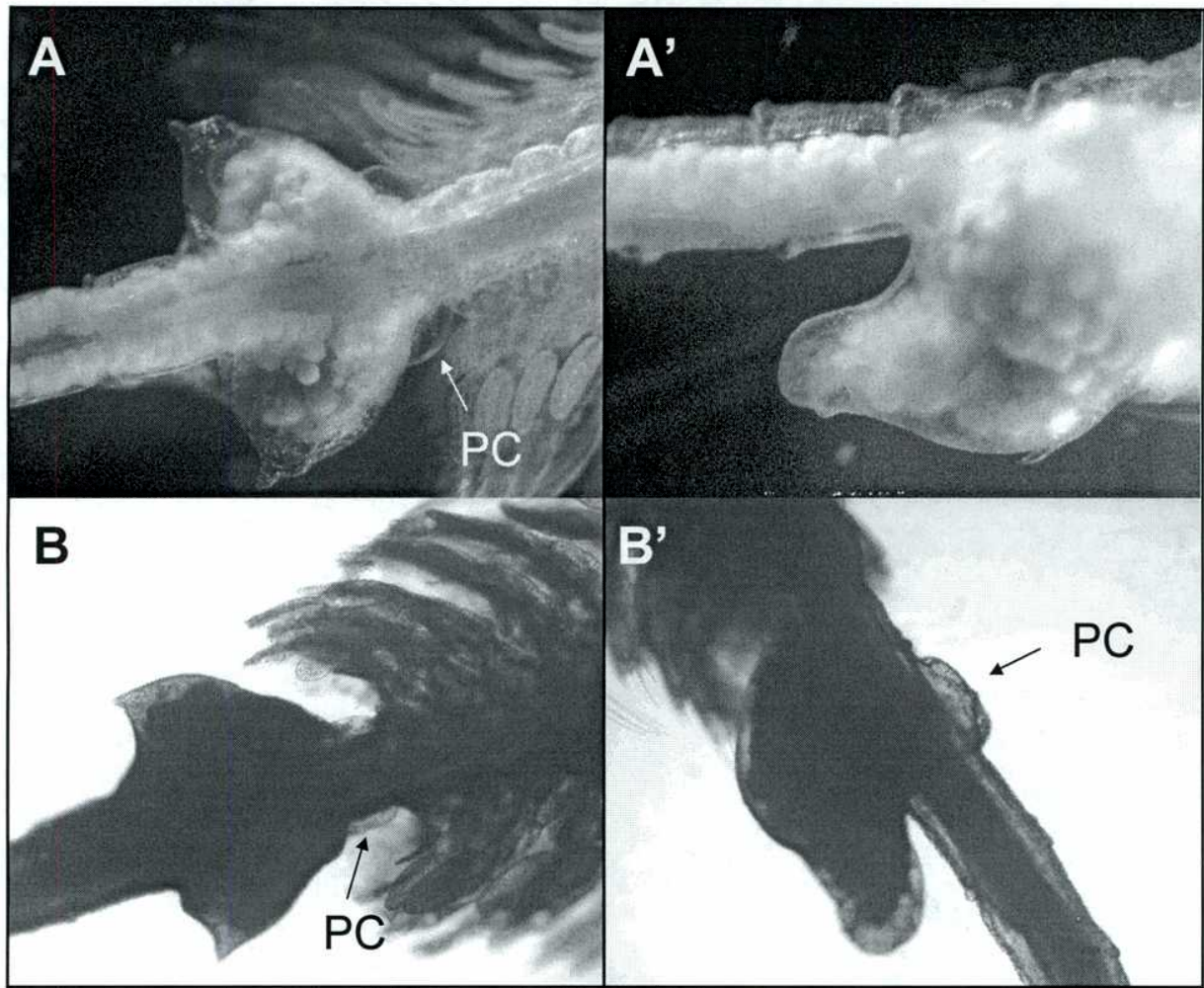


Figura 14. Segmentos genitales de hembras en vista dorsal (A y B) y lateral (A' y B') mostrándose la ubicación de las diferentes proyecciones cuticulares (PC). Las fotos A y A' corresponden a especímenes de *A. franciscana*; B y B' a *A. persimilis*. (Aumento 50x)

Esta estructura descrita con anterioridad para *A. persimilis* (Cohen *et al.*, 1999), no ha sido citada hasta el momento para ninguna otra especie de *Artemia*. Sin embargo, no se la ha utilizado hasta el momento con fines taxonómicos, aunque se ha sugerido su utilidad en este sentido (Papeschi *et al.*, 2000). Como puede verse en la figura 14 las proyecciones látero-dorsales de la zona genital están totalmente ausentes en las hembras de las poblaciones MCh y GLS (*A. franciscana*) (Fig. 14 A').

Morfometría

En la tabla 3 se muestran los valores de las medias y los desvíos estándares (DS), de las 14 variables morfométricas registradas en las cuatro poblaciones de *Artemia* americanas aquí consideradas. Como puede verse en la tabla 4, el análisis de las variables morfométricas en todas las poblaciones estudiadas, puso en evidencia la presencia de diferencias significativas entre los sexos ($p < 0.001$ y $p < 0.05$). En particular, las mediciones tomadas en la cabeza de los animales: **LA**, longitud de la antena 1; **DOC**, diámetro del ojo compuesto; **AC**, ancho de cabeza y **DEO**, distancia entre ojos compuestos, muestran diferencias significativas entre ambos sexos, reflejando un claro dimorfismo sexual en esta parte del cuerpo, que se agrega al dimorfismo que presentan las antenas 2. Del mismo modo se detectan diferencias en el ancho del abdomen, que corresponden en las hembras a un ensanchamiento del tercer segmento abdominal, posiblemente como consecuencia del desarrollo de los ovarios. Este análisis muestra la importancia de discriminar entre hembras y machos, cuando se utilizan variables morfométricas para separar diferentes poblaciones de *Artemia*.

Población	sexo		Variables Morfológicas													
			LT	LAB	LAB3	LAB8	LF	LA	DOC	AC	AA3	DEO	#SFD	#SFI	AO	ATF
Colorada Chica	H	$\bar{X}$	7.50	4.03	3.26	1.01	0.08	0.41	0.20	0.37	0.39	1.03	0.95	1.27	1.08	
		SD	(0.75)	(0.58)	(0.57)	(0.29)	(0.02)	(0.04)	(0.02)	(0.04)	(0.03)	(0.08)	(0.79)	(0.88)	(0.11)	
	M	$\bar{X}$	6.86	3.48	2.98	1.00	0.11	0.83	0.25	0.45	0.37	1.29	1.90	1.86		0.22
		SD	(0.56)	(0.40)	(0.37)	(0.13)	(0.02)	(0.11)	(0.03)	(0.05)	(0.04)	(0.14)	(1.04)	(0.96)		(0.03)
Salinas Grandes Hidalgo	H	$\bar{X}$	7.96	4.35	3.54	1.29	0.11	0.39	0.20	0.39	0.41	1.03	0.70	0.70	1.14	
		SD	(0.75)	(0.43)	(0.45)	(0.23)	(0.02)	(0.02)	(0.02)	(0.04)	(0.04)	(0.10)	(0.57)	(0.57)	(0.17)	
	M	$\bar{X}$	7.05	3.62	3.18	1.15	0.11	0.72	0.23	0.45	0.37	1.23	1.05	1.00		0.22
		SD	(0.52)	(0.33)	(0.35)	(0.15)	(0.01)	(0.11)	(0.03)	(0.04)	(0.02)	(0.12)	(0.76)	(0.65)		(0.03)
Mar Chiquita	H	$\bar{X}$	7.63	3.80	3.10	0.89	0.19	0.56	0.23	0.38	0.52	1.18	9.05	9.24	1.26	
		SD	(0.99)	(0.88)	(0.56)	(0.16)	(0.05)	(0.06)	(0.02)	(0.03)	(0.04)	(0.14)	(1.47)	(1.48)	(0.21)	
	M	$\bar{X}$	6.44	3.06	2.54	0.86	0.20	0.98	0.28	0.43	0.44	1.31	9.35	9.25		0.13
		SD	(0.65)	(0.38)	(0.41)	(0.10)	(0.03)	(0.12)	(0.03)	(0.05)	(0.05)	(0.15)	(1.79)	(2.27)		(0.02)
Gran Lago Salado	H	$\bar{X}$	8.37	4.10	3.32	0.90	0.20	0.61	0.22	0.39	0.49	1.2	8.45	8.00	1.14	
		SD	(0.52)	(0.32)	(0.30)	(0.15)	(0.04)	(0.04)	(0.02)	(0.04)	(0.04)	(0.08)	(2.04)	(1.92)	(0.18)	
	M	$\bar{X}$	7.10	3.24	2.68	0.81	0.19	0.87	0.25	0.42	0.43	1.26	8.00	8.15		0.13
		SD	(0.38)	(0.20)	(0.19)	(0.08)	(0.02)	(0.08)	(0.02)	(0.03)	(0.03)	(0.09)	(2.77)	(2.87)		(0.02)

Tabla 3. Valores medios y desvíos estándares (entre paréntesis) medidos en mm de las variables morfológicas analizadas en cuatro poblaciones de *Artemia* americanas. Los datos están discriminados para cada sexo. Abreviaturas: **LT**, longitud total; **LAB**, longitud abdominal; **LAB3** Longitud desde el 3^{er} segmento abdominal hasta el ano; **LAB8**, longitud del 8^{vo} segmento abdominal; **LF**, longitud de la furca; **LA**, longitud de la 1^{er} antena; **DOC**, diámetro del ojo compuesto; **AC**, ancho de cabeza; **AA3**, ancho del 3^{er} segmento abdominal; **DEO**, distancia entre ojos compuestos; **#SFI**, número de sedas en la rama furcal izquierda; **#SFD**, número de sedas en la rama furcal derecha; **AO**, ancho del ovisaco; **ATF**, ancho del tubérculo frontal.

En la figura 15 se observan las rectas que representan la correlación entre las variables morfométricas "largo total" y "largo abdominal". Las mismas presentan pendientes similares en las 4 poblaciones estudiadas, indicando que la relación entre estas dos variables es muy similar. Es interesante destacar que en todas las poblaciones consideradas los machos son de menor tamaño que las hembras. Como puede verse en la figura 15 los machos forman un grupo compacto, que se encuentra más próximo al cruce entre los dos ejes de coordenadas que el grupo de las hembras.

Variables morfológicas	Colorada Chica			Hidalgo			Mar Chiquita			Gran Lago Salado		
	♀	♂	p-valor	♀	♂	p-valor	♀	♂	p-valor	♀	♂	p-valor
LT	7.50	6.86	.0032	7.96	7.05	.0001	7.63	6.44	.0001	8.38	7.10	.0001
LAB	4.02	3.50	.0009	4.35	3.62	.0001	3.80	3.06	.0013	4.10	3.24	.0001
LAB3	3.26	2.97	.0598	3.54	3.18	.0071	3.10	2.54	.0008	3.32	2.68	.0001
LAB8	1.01	0.99	.8550	1.29	1.15	.0255	0.89	0.86	.4131	0.90	0.81	.0300
LF	0.08	0.11	.0002	0.11	0.11	.9889	0.19	0.20	.4647	0.20	0.19	.4824
LA	0.41	0.83	.0001	0.39	0.72	.0001	0.56	0.98	.0001	0.61	0.87	.0001
DOC	0.20	0.25	.0001	0.20	0.23	.0001	0.23	0.28	.0001	0.22	0.25	.0001
AC	0.37	0.45	.0001	0.39	0.45	.0001	0.38	0.43	.0002	0.39	0.42	.0277
DEO	1.03	1.30	.0001	1.03	1.23	.0001	1.18	1.31	.0072	1.20	1.26	.0486
AA3	0.40	0.37	.0482	0.41	0.37	.0014	0.52	0.44	.0001	0.49	0.43	.0001
#SFI	1.27	1.85	.0443	0.70	1.00	.1289	9.24	9.25	.9841	8.00	8.15	.8470
#SFD	0.95	1.90	.0016	0.70	1.05	.1077	9.05	9.35	.5559	8.45	8.00	.5621

Tabla 4. Comparación de los promedios (medidos en mm) de las variables morfológicas entre sexos de las diferentes poblaciones. Los "p-valor" en color rojo indican las variables que presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$ y $p < 0.001$). Las abreviaturas son las mismas utilizadas en la tabla 3.

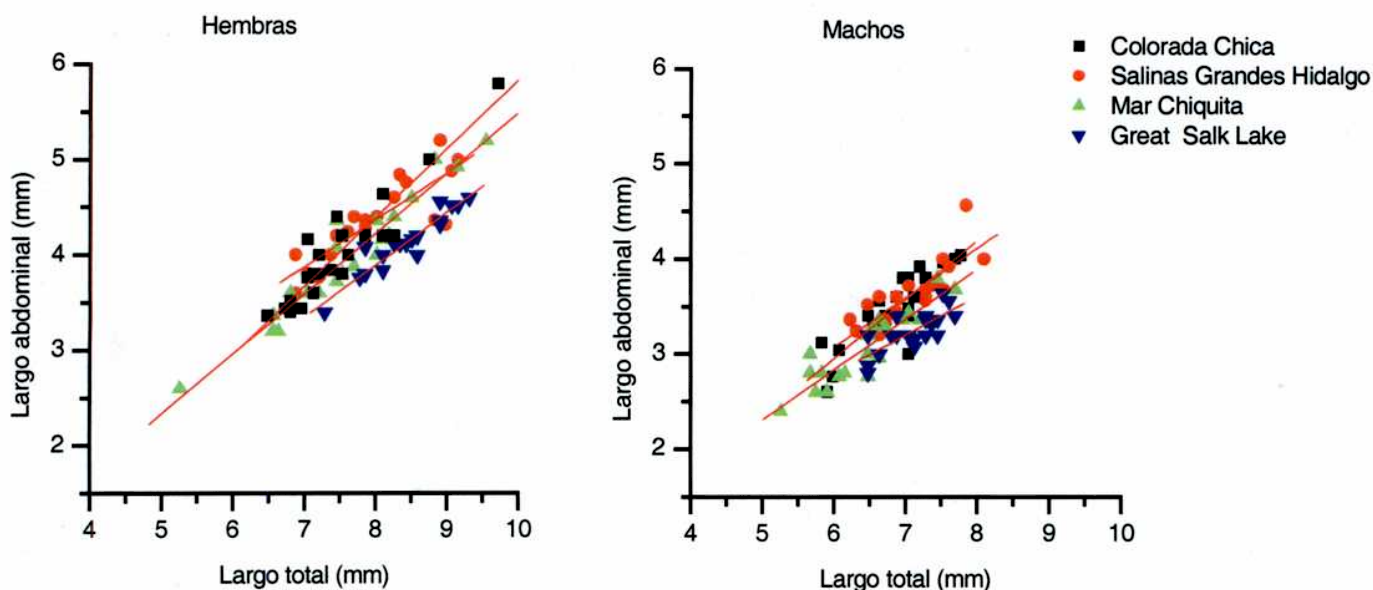


Figura 15. Representación gráfica de la relación entre las variables morfológicas “Largo total” vs. “Largo abdominal”.

En nuestro estudio, la separación morfológica de las cuatro poblaciones de *Artemia* de diferentes localidades fue realizada mediante el uso de un AD estándar utilizando como factor de separación la localización de las poblaciones. El análisis se realizó por separado para hembras y machos. Se obtuvo, para cada sexo, un conjunto de datos de N filas x P columnas, con G grupos, donde N es la cantidad de entidades = 2 especies (*A. persimilis* y *A. franciscana*), P es el número de variables morfométricas = 13, y G = las 4 poblaciones consideradas.

En consecuencia se obtuvieron $(G - 1) =$ tres, funciones discriminantes o canónicas. Los resultados de este análisis se muestran en la tabla 5 A y B. Como puede verse la primera función canónica presenta el *eigenvalor* más alto, mostrando que esta función es la que tiene mayor resolución para separar los grupos. Sin embargo, los coeficientes de correlación canónica y las pruebas estadísticas asociadas (chi-cuadrado) indican

que las tres funciones canónicas obtenidas para cada sexo, poseen significación estadística para separar a las poblaciones ($p < 0.001$).

Función canónica	Eigenvalor	Correlación canónica	Chi-cuadrado	p-valor
1	21.94214	0.977963	353.3248	0.0001
2	2.24453	0.831738	123.0512	0.0001
3	0.64410	0.625912	36.5439	0.0001

A: Resultado del análisis realizado sobre las hembras

Función canónica	Eigenvalor	Correlación canónica	Chi-cuadrado	p-valor
1	20.21123	0.976143	324.8062	0.0001
2	2.04546	0.819538	106.4073	0.0001
3	0.45435	0.558935	26.7810	0.001

B: Resultado del análisis realizado sobre los machos

Tabla 5. Significación estadística de las funciones canónicas obtenidas a partir del análisis de discriminante realizado con 13 variables morfológicas registradas en cuatro poblaciones de *Artemia* americanas.

En la tabla 6 A y B se muestran los valores medios que posee cada población en cada función canónica, representándose de esta forma, la ubicación de sus respectivos centroides en el espacio tridimensional que forman en conjunto las tres funciones.

Poblaciones	Función canónica 1	Función canónica 2	Función canónica 3
Colorada Chica	-3.87624	0.17035	1.11824
Salinas Grandes Hidalgo	-5.16787	-0.22530	-1.06424
Mar Chiquita	4.46001	2.03843	-0.18353
Gran Lago Salado	4.74874	-2.10244	0.02688

A: Resultado del análisis realizado sobre las hembras

Poblaciones	Función canónica 1	Función canónica 2	Función canónica 3
Colorada Chica	-3.45391	0.73608	0.919519
Salinas Grandes Hidalgo	-5.01013	-0.15867	-0.864559
Mar Chiquita	5.52031	1.57603	-0.283817
Gran Lago Salado	3.11642	-2.19023	0.182882

B: Resultado del análisis realizado sobre los machos

Tabla 6: Valores medios de cada población en cada una de las funciones canónicas obtenidas a partir del análisis de discriminante realizado con 13 variables morfológicas registradas en cuatro poblaciones de *Artemia* americanas.

El conjunto de datos multivariados podría representarse como una nube de puntos multidimensional donde cada dimensión o eje, en el conjunto de datos, está definido por una de las P variables discriminatorias originales. Cada entidad registrada tiene un lugar en cada eje y por lo tanto ocupa una posición particular en el espacio de las P dimensiones. De esta forma todo el conjunto, de manera colectiva, forma una nube en el espacio P- dimensional. Geométricamente, la función canónica puede visualizarse

como una proyección a través de la nube de puntos con una orientación que separa la distribución de los grupos de manera “máxima” a lo largo de ese eje canónico. Esencialmente, esto significa que la primera función canónica es dibujada de manera tal que la posición de los centroides de cada grupo sea lo más separada posible. La segunda función canónica y las subsiguientes serán construidas de forma ortogonal e independiente a las anteriores y cada una maximizará las restantes diferencias entre los grupos. Esto significa que, geométricamente, el segundo eje canónico es perpendicular al primero en la dirección que mejor se separan los grupos.

La ubicación de los individuos en el espacio bidimensional formado por las dos primeras funciones canónicas resultantes del AD está representada en la figura 16. En esta figura cada punto representa la posición de un animal perteneciente a cada una de las poblaciones de *Artemia* analizadas.

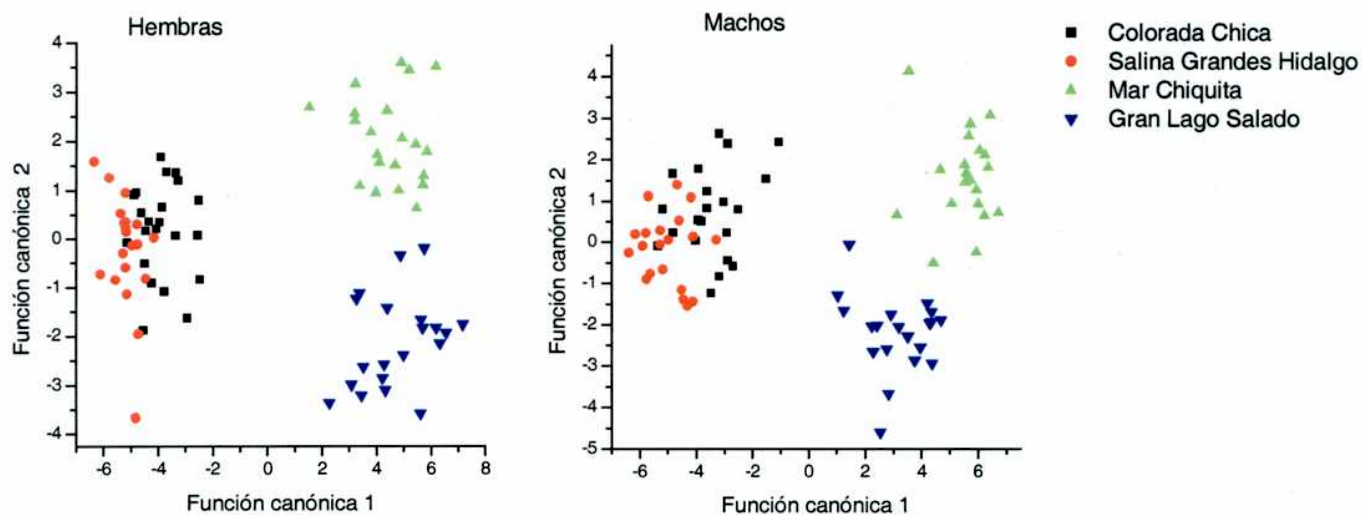


Figura 16. Representación grafica de la ubicación de los animales pertenecientes a las cuatro poblaciones de *Artemia* analizadas. El espacio bidimensional representado esta formado por las dos primeras funciones canónicas resultantes del análisis de discriminante.

Como puede verse en esta figura, la primera función canónica separa claramente en dos grupos a las cuatro poblaciones estudiadas. Un grupo está constituido por las poblaciones de Colorada Chica (CCh) y Salinas Grandes Hidalgo (SGH) que pertenecen a la especie *A. persimilis* y el otro grupo lo forman las poblaciones de Mar Chiquita (MCh) y Gran Lago Salado (GLS) que pertenecen a *A. franciscana*. La segunda función canónica, que esta representada en el eje "y", tiene la capacidad de separar a la población de MCh de la población de GLS pero no puede discriminar entre las poblaciones de CCh y SGH. Sin embargo, la separación de las cuatro poblaciones se logra al utilizar las tres funciones canónicas en conjunto. Dado el alto nivel de significación estadística que poseen las tres funciones canónicas resultantes del AD, en la figura 17 se representa la posición de los centroides (valor medio del grupo) de cada una de las poblaciones de *Artemia* analizadas. En esta figura el espacio tridimensional esta formado por las tres funciones canónicas. La utilización de los centroides proporciona una imagen más clara en un gráfico de tres dimensiones; además, debido al alto nivel de significación de las funciones canónicas obtenidas, los centroides pueden considerarse como representativos de la posición de cada grupo.

Para juzgar la importancia relativa de cada variable discriminatoria original, necesitamos mirar los coeficientes canónicos estandarizados. La contribución relativa de las variables discriminatorias en cada función canónica puede ser entonces calibrada o medida con la magnitud (en valor absoluto) relativa de los coeficientes estandarizados; cuanto mayor es ese valor, mayor es la contribución de esa variable. Como puede verse en la tabla 7 A y B los coeficientes estandarizados muestran que para el análisis hecho en las hembras, el largo de la antena 1 y la cantidad de sedas presentes en las ramas furcales son las variables discriminatorias de mayor importancia en la primera función canónica. Para el análisis realizado en los machos, las variables discriminatorias más importantes son: el ancho del tubérculo frontal, la longitud de la furca y la cantidad de sedas que presenta.

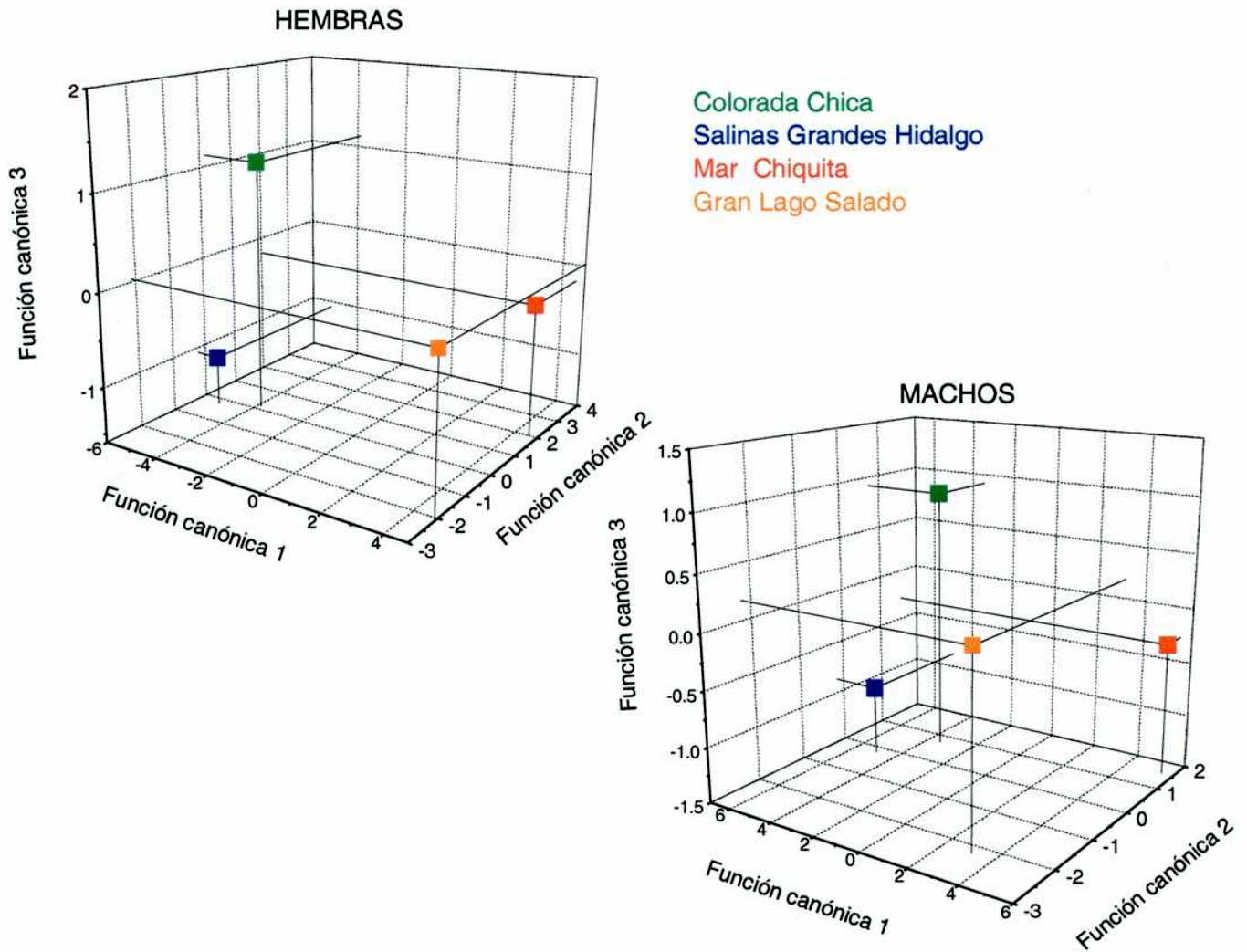


Figura 17. Ubicación de los 'centroides' de las cuatro poblaciones de *Artemia*, en el espacio tridimensional formado por las tres funciones canónicas resultantes del análisis de discriminante.

Variables	Función canónica 1	Función canónica 2	Función canónica 3
LT	0.0362	-0.2419	-0.2542
LAB	-0.0330	-0.0670	-0.2579
LAB3	-0.0463	-0.1270	-0.2139
LAB8	-0.1330	-0.0376	-0.4993
LF	0.3067	-0.0509	-0.5336
LA	0.4387	-0.2544	-0.0784
DOC	0.1480	0.2196	-0.0780
AC	0.0105	-0.1069	-0.2790
DEO	0.1742	-0.0381	-0.0879
AA3	0.3066	0.1480	-0.4374
#SFI	0.6341	0.2605	-0.2228
#SFD	0.6459	0.1368	-0.3198
AO	0.0540	0.1632	-0.2264

A: Resultado del análisis realizado sobre las hembras

Variables	Función canónica 1	Función canónica 2	Función canónica 3
LT	-0.0614	-0.2896	0.0010
LAB	-0.1427	-0.0553	-0.0668
LAB3	-0.1640	-0.0307	-0.1774
LAB8	-0.2230	0.1741	-0.5841
LF	0.4246	-0.1892	-0.3304
LA	0.1809	0.2102	0.3168
DOC	0.1133	0.2608	0.1012
AC	-0.0616	0.1173	-0.0359
DEO	0.0316	0.1113	0.1597
AA3	0.2081	-0.1228	-0.1570
#SFI	0.4355	-0.1327	-0.0618
#SFD	0.4693	-0.1066	-0.0841
ATF	-0.3826	0.2526	0.2304

B: Resultado del análisis realizado sobre los machos

Tabla 7. Coeficientes estandarizados obtenidos para las tres funciones canónicas resultantes del análisis de discriminante realizado con 13 variables morfológicas registradas en cuatro poblaciones de *Artemia* americanas (Abreviaturas: ver tabla 3).

Discusión y conclusiones

El presente estudio permitió ampliar el conocimiento de las diferencias morfológicas presentes en hembras y machos de diversas poblaciones de *Artemia*. Mediante la utilización de caracteres morfológicos y morfométricos de los adultos se pudo obtener una total discriminación entre las poblaciones de *Artemia* pertenecientes a *A. persimilis* y a *A. franciscana*. En particular, los resultados aquí obtenidos nos muestran que es posible separar por medio de observaciones morfológicas y morfometría las cuatro poblaciones de *Artemia* consideradas y confirmar la ubicación de la población pampeana de la laguna Colorada Chica, dentro de la especie *Artemia persimilis*. Del mismo modo, se confirma la asignación de la población cordobesa de Mar Chiquita a *A. franciscana*, junto con la población de referencia de la especie, del Gran Lago Salado de Utah. En el gráfico presente en la figura 16 puede verse que existe una gran superposición entre las poblaciones de CCh y la población de referencia de *A. persimilis*, SGH, lo que da una idea de su grado de semejanza morfológica. Además ambas poblaciones son muy cercanas geográficamente. En cambio, la población de MCh, aunque queda claramente separada del grupo de *A. persimilis*, y asociada sin duda con la población de referencia de *A. franciscana*, GSL, presenta suficientes diferencias morfológicas, evidenciadas por su superposición incompleta, con esta última población. La gran separación latitudinal de estas últimas poblaciones sería probablemente la causa de esta distribución de los datos, y reforzaría el criterio general de que *A. franciscana* es una especie con una alta tasa de cambio y con una gran capacidad de rápida adaptación a diversas condiciones locales del medio. Esto último daría soporte a la idea de Browne & Bowen (1991), de que *A. franciscana* está formada por un conjunto de subespecies que presentan pequeñas variaciones locales reflejadas en la morfometría general de los adultos, siendo estas diferencias menos importantes que las observadas entre las especies *A. franciscana* y *A. persimilis*. Esta capacidad de *A. franciscana* coincidiría con su gran expansión territorial a través de todo el continente americano, en contraste con *A. persimilis* que hasta el momento esta sólo registrada para el extremo sur de América.

Resultados y Discusión. Capítulo II

4.2 Caracterización reproductiva de la población de *A. persimilis* de la laguna Colorada Chica.

Introducción

Los estudios realizados sobre el comportamiento y patrones reproductivos de los anostracos comprenden a 10 de las 200 especies descritas hasta el momento y esas especies sólo representan a unos pocos géneros dentro del grupo (Belk, 1991).

Dentro de los anostracos, el género cosmopolita *Artemia* se caracteriza por habitar biotopos hipersalinos de escasa biodiversidad, que lo convierte en el principal componente animal de este tipo de ecosistemas acuáticos. Probablemente, para asegurar la supervivencia de las poblaciones en estos ambientes extremadamente exigentes, las tácticas reproductivas de sus habitantes hayan sufrido importantes modificaciones y adaptaciones especiales durante la evolución.

Las hembras de *Artemia* presentan un ciclo endógeno del huevo por el cual aún en ausencia de inseminación, los oocitos maduros se desplacen desde los oviductos hacia el ovisaco sin presentar ningún signo de reabsorción; allí luego del período usual de retención, los huevos no fertilizados son expulsados del ovisaco como puestas de huevos transparentes (Bowen, 1962). Según Belk (1991), la presencia de este ciclo endógeno, exclusivo de *Artemia*, serviría de base para la existencia de partenogénesis en este grupo. En estudios más recientes se ha reportado la presencia de ciclos reproductivos endógenos en otros anostracos, pero la partenogénesis continua siendo exclusiva de *Artemia* (Murugan et al., 1996). Hasta el momento, la presencia de partenogénesis en el género *Artemia* está descrita solamente en la especie *A. parthenogenetica*, distribuida en Europa, Asia y Australia. Sin embargo, algunos estudios sugieren que poblaciones de *A. franciscana* (endémica del continente americano) puedan presentar partenogénesis (Cuellar, 1990,1991; Torrentera & Dobson,1995).

Todas las poblaciones de *Artemia* muestran una notable flexibilidad reproductiva (estrategia mixta) que les permite adecuarse a las presiones de selección del medio, modificando el número de puestas o el número de huevos por cada puesta, esta flexibilidad es descrita por Browne,1980 como una estrategia reproductiva mixta. Además de esto, como ya hemos mencionado, las hembras de *Artemia* poseen la capacidad de variar el tipo de cigotas que son liberadas al medio (reproducción ovípara

u ovovivípara), sin que este muy claro que tipo de factores intervienen cuando se produce una u otra modalidad reproductiva (Gajardo & Beardmore, 1989; Amat 1985). La presencia de esta variabilidad en los patrones reproductivos del género *Artemia* explica la importancia de conocer las características reproductivas que posee cada población en particular. Para realizar el estudio reproductivo de la población adulta de *Artemia persimilis* en cría experimental, es de suma importancia conocer y caracterizar lo más precisamente posible el estadio del ciclo reproductivo y la fase del ciclo de puesta en que se encuentran las hembras, porque la modalidad y el estado reproductivos de las hembras son indicadores de la energía que la población está destinando a la reproducción. Es necesario para esto, diferenciar si la camada próxima a ser liberada desde el ovisaco será ovípara u ovovivípara (modalidad reproductiva) y determinar, la secuencia de los estadios del ciclo reproductivo (estado reproductivo).

Los experimentos que se presentan a continuación permiten establecer la secuencia de sucesos que se producen a lo largo de la vida reproductiva de las hembras de una población de *Artemia*. También, se determinan la duración de los estadios dentro del ciclo reproductivo y diversas variables reproductivas, características de la población de *A. persimilis* de Laguna Colorada Chica. Ciertas observaciones sobre el comportamiento de las hembras mantenidas aisladas de machos permiten determinar la presencia o no, de partenogénesis en esta población.

4.2.1- Morfología y secuencia de los estadios dentro del ciclo reproductivo

Metodología

Hembras y machos en estadio post-larval criados bajo condiciones estándar a una salinidad de 90 g l⁻¹ fueron colocados en dos recipientes separados para evitar el apareamiento, y asegurar la virginidad de las hembras. A partir de estos animales se formaron 36 parejas, las cuales se colocaron en recipientes individuales que poseían dos ventanas cubiertas con red de plancton de 200 µm de malla. Los recipientes en grupos de 12 fueron a su vez colocados en tres contenedores comunes (peceras) que poseían una solución salina a una concentración de 90 g l⁻¹. Los contenedores fueron sometidos a un régimen de aireación constante para permitir una oxigenación y distribución del alimento uniformes. Las ventanas con red de los recipientes individuales permitían que todas las parejas dispusieran de un medio común y homogéneo, y a su vez retenían todos los descendientes generados por cada hembra (quistes o larvas vivas). En un cuarto contenedor, y en las mismas condiciones experimentales, se colocaron 12 recipientes conteniendo cada una de ellos una hembra en estado virginal. Todas las hembras fueron evaluadas diariamente bajo microscopio estereoscópico, para registrar la ubicación de los oocitos en el sistema reproductor y así determinar la sucesión de etapas en el ciclo reproductivo. Los machos de las parejas que murieron durante la experiencia, fueron reemplazados por machos de la misma edad. La observación de cada recipiente individual concluyó con la muerte de las hembras, en pareja o aisladas. Un total de 16 hembras en pareja fueron seleccionadas al azar para medir en ellas la cantidad y tipo de descendencia (número de quistes o nauplios; descendencia ovípara u ovovivípara). Algunas hembras fueron narcotizadas con agua carbonatada y fotografiadas bajo el microscopio estereoscópico. Luego fueron recuperadas y reincorporadas al recipiente correspondiente.

Resultados

Descripción y secuencia de los estadios en el ciclo reproductivo

Para comprender la secuencia de acontecimientos que conforman el ciclo reproductivo de una hembra, es necesario conocer la morfología del sistema reproductor femenino. La figura 18 muestra la vista lateral de una hembra de *Artemia* s.p. (Fig. 18 A) y el detalle de los dos primeros segmentos abdominales (segmentos genitales) en *A. persimilis* (Fig. 18 B). Se puede observar el plan corporal típico de los anostracos: una cabeza bien diferenciada, un tórax formado por 11 segmentos y un abdomen, que comprende 8 segmentos (8+ telson, fusionados) y un par de ramas furcales. La transparencia que presenta la cutícula de estos animales permite observar los órganos del sistema reproductor (Fig. 18 B), formado por un par de ovarios, y un par de oviductos o bolsas laterales, que desembocan en un único útero, en el que se abren varios conjuntos de glándulas de la cáscara. El útero se aloja en el ovisaco o saco ovígero impar, y desemboca al exterior distalmente por medio de un único gonoporo que se abre entre los labios del ovisaco. Los ovarios son estructuras tubulares pares que se extienden desde el último segmento torácico, pasando a través de los segmentos genitales hasta aproximadamente el tercer segmento abdominal.

Mediante el uso del microscopio estereoscópico a bajo aumento, se observó diariamente el tracto reproductivo de las hembras, y se determinó la secuencia de estadios presentes en el ciclo reproductivo, desde la maduración de los oocitos en los ovarios, hasta la liberación de embriones criptobióticos (quistes) o nauplios al medio. Se determinó que un nuevo ciclo reproductivo comienza en los ovarios, cuando los oocitos del ciclo anterior aún no han sido liberados al medio. Por esta razón se observan en la hembra figuras o fases resultantes de la superposición de dos ciclos reproductivos consecutivos. Este hecho nos llevó a discriminar dos conceptos en nuestras observaciones:

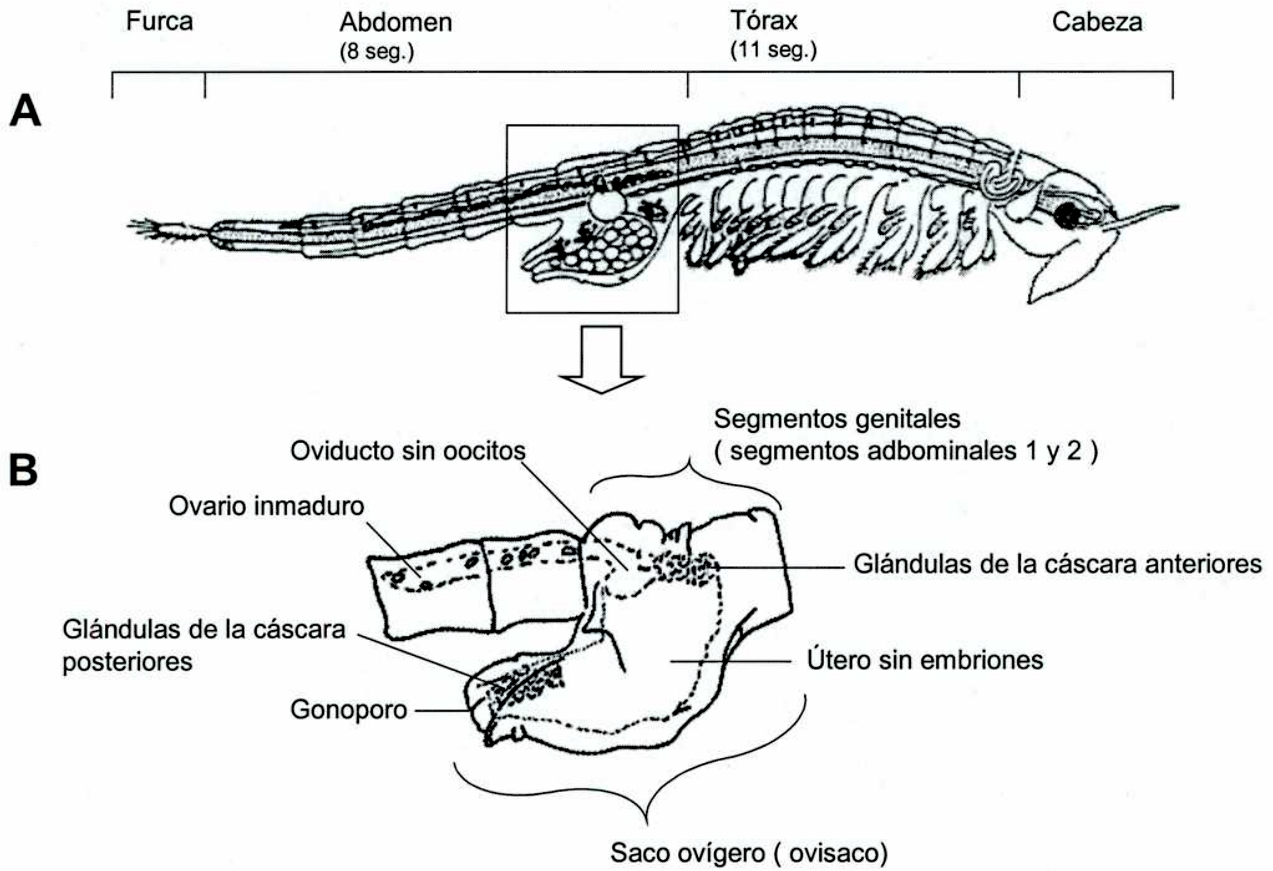


Figura 18. Aspecto general de la hembra de *Artemia* sp. A: Vista lateral. B: detalle de los segmentos genitales en *A. persimilis* (Modificado de Cohen et al., 1999).

Ciclo reproductivo: Es la serie de estadios por los que pasa una camada de oocitos particular desde el ovario hasta ser liberados al medio como quistes o nauplios (puesta)

Ciclo de puesta: Corresponde a los sucesos que se producen entre dos puestas sucesivas. Se observa como una serie de figuras o fases resultantes de la superposición de estadios de dos ciclos reproductivos sucesivos.

En la figura 19 se representa la sucesión de estadios en dos ciclos reproductivos ovíparos sucesivos y las fases del ciclo de puesta que resultan de la superposición de estos. En este esquema se han separado imaginariamente los dos ciclos reproductivos sucesivos para que pueda verse claramente cual es el aspecto real que muestra el sistema reproductor de la hembra, representado por las "Fases" del ciclo de puesta, como resultado de la superposición de los "Estadios" de ambos ciclos reproductivos.

Un ciclo reproductivo comienza con la maduración de los oocitos en los ovarios determinando el **Estadio 1**. Con el inicio de la vitelogénesis, los oocitos comienzan a hacerse visibles bajo el microscopio estereoscópico, gracias a que la cutícula de estos animales es muy delgada y las plaquetas vitelinas que se van acumulando poseen una coloración blanquecina. A medida que la maduración progresa, los oocitos pueden diferenciarse claramente unos de otros y comienzan a alinearse ocupando todo el largo del ovario.

En el **Estadio 2** los ovarios están maduros y los oocitos forman una hilera que se extiende posteriormente, pudiendo llegar, en casos excepcionales, hasta el cuarto segmento abdominal (Fig. 20 A y C).

Cuando se produce la ovulación los oocitos son movilizados y se alojan en los oviductos, de esta forma los ovarios dejan de ser visibles. Durante el **Estadio 3** los oocitos permanecen en los oviductos provocándoles una gran dilatación (Fig. 20 B). Luego de un tiempo, pasan hacia el útero dónde el macho, durante la cópula, deposita el esperma.

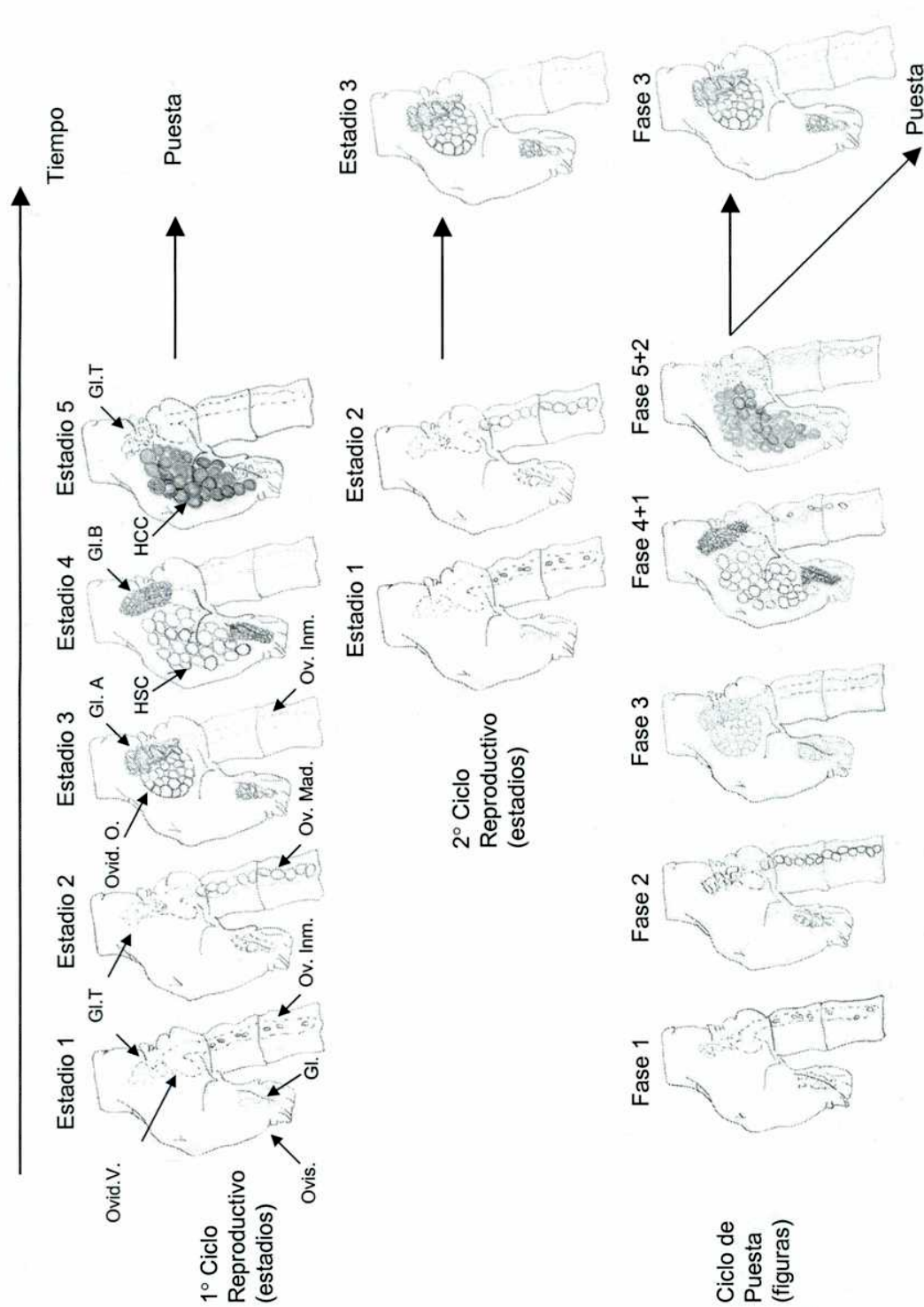


Figura 19: Esquema que separa imaginariamente dos ciclos reproductivos ovíparos sucesivos del ciclo de puesta. Referencias: (Ov. Inm.) ovario inmaduro, (Ov. Mad) ovario maduro, (Ovid. V.) oviducto vacío sin oocitos, (Ovid. O.) oviducto con oocitos, (Ovis.) ovisaco, (HSC) huevos sin cáscara, (HCC) huevos con cáscara, (Gl. T) glándula de la cáscara, (Gl. A) glándula transparente, (Gl. B) glándula anaranjada, (Gl. B) glándula bordó.

Durante el **Estadio 4** el útero está lleno de oocitos que serán fecundados. Estos pueden verse llenando casi todo el saco ovífero debido a la transparencia de la cutícula (Fig. 20 C). Las contracciones de las paredes del útero mantienen en movimiento a los oocitos para que se produzca homogéneamente la fecundación.

Luego de la fecundación los embriones que se encuentran en el ovisaco, en el **Estadio 5**, pueden entrar en diapausa y ser rodeados de cáscara (reproducción ovípara) o pueden desarrollarse hasta el estadio naupliar (reproducción ovovivípara). Hemos encontrado, que algunas hembras individuales tienen siempre puestas ovíparas, en tanto otras pueden comportarse como ovovivíparas u ovíparas a lo largo de su período reproductivo. Debido a estas dos modalidades reproductivas, se pueden discriminar dos estadios diferentes, según el tipo de descendencia presente en el ovisaco:

En el ciclo reproductivo ovíparo, durante el **Estadio 5** los embriones empiezan a segmentarse pero detienen su desarrollo debido a factores endógenos, y son rodeados de una envoltura terciaria (cáscara) formada a partir de las secreciones de las glándulas de la cáscara. Cuando finaliza la formación de la envoltura terciaria, los quistes resultantes (embriones rodeados de cáscara) son perfectamente esféricos y poseen una coloración marrón clara (Fig. 20 D).

En el ciclo reproductivo ovovivíparo, durante el **Estadio 5** comienza la segmentación del embrión. El desarrollo embrionario continúa dentro del ovisaco hasta el estadio naupliar. A través de las paredes del ovisaco, puede distinguirse el ojo nauplio, en las larvas que se desarrollan dentro del útero, antes de ser liberadas al medio.

La figura 20 muestra fotografías tomadas con el microscopio estereoscópico que ilustran algunas de las situaciones mencionadas. La utilización de animales narcotizados permitió obtener imágenes en las que se percibe la coloración y brillo de diferentes estructuras del sistema reproductor y de sus contenidos, que se perderían si se utilizasen animales fijados. En la figura pueden verse las regiones genitales de hembras de *A. persimillis*, criadas en laboratorio, en diferentes etapas del ciclo de puesta:

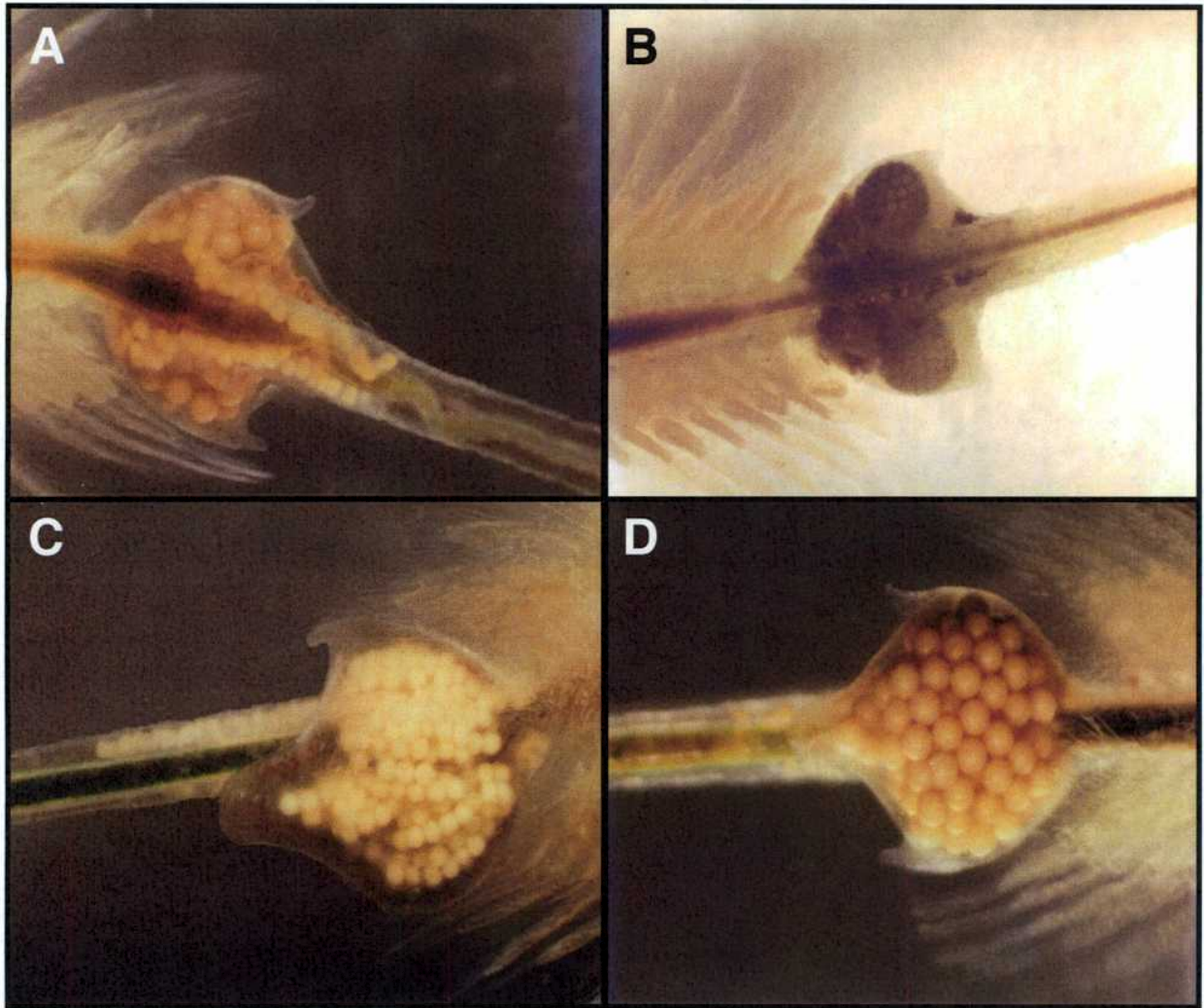


Figura 20: Diferentes estadios en el ciclo reproductivo. A, vista dorsal de la hembra. Se observan los ovarios con oocitos maduros, extendiéndose hasta el 3^{er} segmento abdominal. B, vista dorsal del ovisaco, se ven los oviductos llenos de oocitos. C, vista ventral del ovisaco con oocitos sin fecundar y ovarios maduros. D, vista ventral del ovisaco con quistes.

- a) En la figura 20 A se observa parte del tórax y el abdomen de una hembra colocada en posición dorsal. Pueden verse por transparencia los oocitos madurando en los ovarios, y en el ovisaco una camada de quistes que será liberada al medio.
- b) La figura 20 B es una vista dorsal de una hembra que transporta oocitos en los oviductos. Aquí los dos oviductos, habitualmente blanquecinos y colapsados, son claramente visibles por la acumulación de los oocitos que han descendido desde los ovarios, como consecuencia de la ovulación.
- c) En la figura 20 C se observa una vista ventral de una hembra que transporta en el útero, un gran número de oocitos, que aún no han sido fecundados. Pueden verse además, las glándulas de la cáscara, muy pigmentadas, y los ovarios, dónde una nueva camada de oocitos está madurando.
- d) La figura 20 D muestra una vista ventral del ovisaco de una hembra que transporta quistes (embriones en criptobiosis con cáscara). Los quistes poseen una forma bien redondeada y la cáscara les confiere un brillo y coloración característicos

Puestas ovíparas y ovovivíparas. Variables reproductivas

Durante esta experiencia las hembras mantenidas en pareja con machos presentaron distintas modalidades reproductivas. Un 60% se reprodujo solamente en forma ovípara, y 40% presentó una modalidad mixta, con puestas tanto ovíparas como ovovivíparas, a lo largo del período reproductivo.

En la tabla 8 se presentan los valores promedios de las variables reproductivas y del ciclo ontogenético, registrados en esta experiencia, en hembras y machos. Estos valores medios no fueron comparados estadísticamente, debido a que en el diseño experimental, los animales compartían un mismo ambiente (vasos con ventanas sumergidos en un medio a 90 g l^{-1} de concentración de salina) y por lo tanto no podían considerarse como unidades experimentales independientes.

Variables	Hembras en pareja	Hembras vírgenes	Machos
Longevidad (días)	25.1 $\pm$ 2.52 (n= 36)	35.6 $\pm$ 5.53 (n= 12)	22.7 $\pm$ 3.2 (n= 36)
Período pre-reproductivo (días)	17.8 $\pm$ 1.08 (n= 33)	19.1 $\pm$ 1.8 (n= 12)	
Período reproductivo (días)	7.3 $\pm$ 2.42 (n= 33)	13 $\pm$ 5.3 (n= 12)	
Tiempo entre puestas (días)	3 $\pm$ 0.72 (n= 33)	4.2 $\pm$ 1.2 (n= 12)	
Total de puestas por hembra	2.9 $\pm$ 0.86 (n= 33)	4.1 $\pm$ 1.16 (n= 12)	
Edad al 1 ^{er} amplexo (días)	14.9 $\pm$ 1.05 (n= 36)		
Cantidad de descendientes por puesta	37.8 $\pm$ 28.5 (n= 16)		
Total de descendientes por hembra	111.1 $\pm$ 49 (n= 16)		

Tabla 8. Variables reproductivas y del ciclo ontogenético registradas en hembras mantenidas en pareja con machos y en hembras aisladas. Se muestran los valores medios y los desvíos estándar. Se agrega la medida de longevidad de los machos.

Observaciones sobre las glándulas de la cáscara.

Con el objeto de determinar el modo cíclico de vaciado de las glándulas de la cáscara, se registró cada 24hs bajo microscopio estereoscópico el estado de las glándulas en hembras mantenidas en pareja.

Se determinó que en las puestas ovíparas, las glándulas se oscurecen gradualmente pasando de transparente a blanquecino, anaranjado claro, anaranjado intenso y finalmente a bordó, mientras los oocitos circulan por oviducto y ovisaco. Una vez allí, los oocitos permanecen un tiempo hasta que se produce la fecundación (estadio 4 de puestas ovíparas: ovisaco inmaduro, Fig. 20 C) y finalmente las glándulas descargan su secreción. Los embriones en desarrollo quedan cubiertos de cáscara, formándose los quistes que se observan en la figura 20 D.

En las puestas ovovivíparas en cambio, aunque las glándulas también se colorean gradualmente sin llegar al color bordó, la secreción glandular no es descargada y

comienza a reabsorberse (las glándulas se decoloran: aparecen transparentes o anaranjado claro), cuando los oocitos se encuentran en el útero. Las zigotas resultantes de la fecundación, no son cubiertas de cáscara y comienzan su desarrollo en el útero hasta llegar a larvas nauplio, que serán liberadas al medio.

Discusión y conclusiones

La maduración sexual de las hembras se alcanza cuando se observan, por primera vez, oocitos en los ovarios. Esta etapa se consideró el primer estadio dentro del ciclo reproductivo. Los oocitos se cargan de vitelo en los ovarios y al producirse la ovulación se desplazan hacia los oviductos y permanecen allí mientras se produce la cópula. Durante la misma, el macho descarga los espermatozoides, que no poseen movilidad propia, dentro del útero de la hembra. La fecundación de los oocitos se hace efectiva cuando éstos descienden desde los oviductos hasta el útero, poniéndose en contacto con los espermatozoides. Los siguientes ciclos reproductivos comienzan (maduración de los oocitos en los ovarios) antes que los embriones de la camada anterior sean liberados al medio. Por esta causa, podemos encontrar hembras que transportan oocitos en los ovarios junto con embriones en el ovisaco. Esta superposición de ciclos reproductivos determina las fases dentro de un ciclo de puesta (acontecimientos que se producen entre dos puestas sucesivas), que comienzan desde la primera ovulación. El solapamiento de ciclos reproductivos se observa en otros anostracos. Aunque, la superposición de estadios difiere en algunos casos, provocando distintas fases en el ciclo de puesta (Brendonck, 1991).

Las glándulas de la cáscara comienzan a cargarse de secreciones al inicio de cada ciclo reproductivo (Murugan *et al.*, 1996). El destino final de las secreciones glandulares, dependerá del tipo de descendencia que será liberada al medio (quistes o larvas vivas). Nuestros resultados indican una diferencia en el comportamiento de las glándulas de la cáscara, entre los ciclos reproductivos ovíparos y ovovivíparos. Al parecer, el tipo de descendientes que liberan las hembras de *Artemia* dependería, no sólo de la cantidad sino también de la naturaleza de las secreciones que son producidas (Anderson *et al.*, 1970).

4.2.2- Determinación de la variación horaria en la proporción de estadios dentro del ciclo reproductivo.

Metodología

Este experimento fue diseñado para saber si existen estadios dentro del ciclo reproductivo que se observan con más frecuencia en determinados momentos del día bajo condiciones experimentales de iluminación continua. Para obtener animales de diferentes edades y en distintas etapas del ciclo reproductivo se eclosionaron separadamente 5 lotes de quistes en 5 días sucesivos. Las larvas resultantes de las eclosiones, fueron criadas bajo condiciones estándar a una concentración salina de 90 g l⁻¹. Machos y hembras, sexados en la etapa post-larval, fueron transferidos a recipientes de 1000 ml en una proporción 1:1. Con fines comparativos, se armó un recipiente conteniendo solamente hembras. El muestreo se realizó en diversos horarios a lo largo del día (entre las 9 y las 20 hs), asignados al azar mediante el uso de números aleatorios. Se incluyeron dos horarios no convencionales (1 AM y 5 AM) en un total de 7 días consecutivos (173 horas en total), dando como resultado el siguiente cronograma de muestreo:

Día 1: 10 AM, 2 PM, 5 PM, 8 PM

Día 2: 9 AM, 11AM, 3 PM, 7 PM.

Día 3: 10 AM, 1 PM, 3 PM, 7 PM.

Día 4: 12 AM, 2 PM, 4 PM, 8 PM.

1 AM

Día 5: 9 AM, 12 AM, 6 PM, 8 PM.

Día 6: 12 AM, 3 PM, 5 PM, 7 PM.

Día 7: 10 AM, 1 PM, 4 PM, 8 PM.

5 AM

Las hembras separadas en cada muestreo fueron narcotizadas usando agua carbonatada y observadas bajo el microscopio estereoscópico. Se realizó un total de

660 registros de estados reproductivos en hembras que se encontraban en presencia de machos ("no-aisladas") y 545 en hembras vírgenes ("aisladas de machos"). Se registró la presencia o no de abrazo copulatorio (amplexo) en las hembras mantenidas con machos

Para el análisis de los datos se definieron dos períodos consecutivos dentro del ciclo reproductivo: un período ovárico (A) y un período oviducto-ovisaco (B). Dado que los productos sexuales (oocitos u embriones) en cada período pueden provenir de diferentes camadas, cada uno de ellos fue considerado en forma separada. Para realizar las pruebas estadísticas se consideró que cada período podría variar entre 0 y 1. En el período (A); el estado 0 representa al ovario vacío o inmaduro y 1 al ovario maduro. En el período (B); el estado 0 corresponde a oocitos en el oviducto junto con un ovisaco vacío y 1 a oocitos o embriones con o sin cáscara alojados en el ovisaco. Para calcular la frecuencia relativa de los estados (dentro de cada período) cada observación (hembra observada al microscopio) se transformó numericamente según el estado reproductivo de la hembra en cuestión. Como las frecuencias relativas de cada estado (0 a 1) dentro de cada período (A o B) son complementarias, para graficar y analizar las observaciones a lo largo de las 173 hs. que duró el experimento, se seleccionaron los resultados del estado 0 en el período A y del estado 1 en el período B. Dado que, la posible presencia de un momento del día preferido para la ocurrencia de algunos acontecimientos reproductivos podría invalidar las estimaciones de la duración de cada estado basados solamente en su abundancia relativa, se ajustó un modelo exponencial a los datos para poder obtener el análisis de los residuos. Adicionalmente se obtuvieron una regresión no-paramétrica y su primera derivada, seleccionando para cada estado reproductivo analizado, un ancho de banda óptimo mediante un método de validación cruzada (Härdle, 1990).

Resultados

Los resultados del análisis sobre la variación horaria en la proporción de los estadios dentro del ciclo reproductivo en hembras mantenidas con machos, pueden verse en las

figuras 21 y 22. Las mismas corresponden a los períodos: "A" estado 0 (ovario inmaduro) y "B" estado 1 (oocitos o embriones en el ovisaco) respectivamente.

Para llevar a cabo el análisis estadístico de las frecuencias relativas de cada estado analizado, se ajustaron dos modelos de regresión: 1) un modelo no paramétrico que utiliza la función de Epanenchikov Kernel con anchos de banda seleccionados mediante validación cruzada (Härdle, 1990) y, 2) un modelo exponencial paramétrico.

Dependiendo de la duración de cada estado reproductivo, se espera encontrar cambios en sus frecuencias relativas, desde un valor inicial hasta una posición estable. Si un fenómeno cíclico (con un período de 24 hs.) actuara sobre el proceso reproductivo, el efecto sería detectado por uno de los siguientes parámetros: la presencia de oscilaciones periódicas en la función no paramétrica, una variación periódica de su primera derivada o saltos en los residuos de la función exponencial paramétrica. Ninguno de estos indicadores proporcionaron resultados significativos cuando fueron puestos a prueba con el método de procesamiento aleatorizado (Manly, 1997) en el caso del modelo no paramétrico o por medio de la prueba de "rachas" en los residuos de la función exponencial en el modelo paramétrico (Sokal & Rohlf, 1995).

Los gráficos presentes en las figuras 21 y 22 representan la función ajustada a los datos, utilizando métodos de regresión no paramétrica con diferentes anchos de banda dependiendo de los estadios analizados (ovario u oviducto-ovisaco). Este ancho de banda "H" se determinó utilizando el método de validación cruzada y corresponde a la porción de eje "X" alrededor del punto que se usa para calcular la función y su derivada. La derivada de la función no paramétrica, que debe leerse en el eje secundario, está indicando la velocidad con la que crece o decrece la función y sólo tiene validez en el intervalo comprendido entre $(H, 1-H) * 173$. Por lo tanto, cuanto más nos acercamos a los bordes resulta menos confiable como indicador.

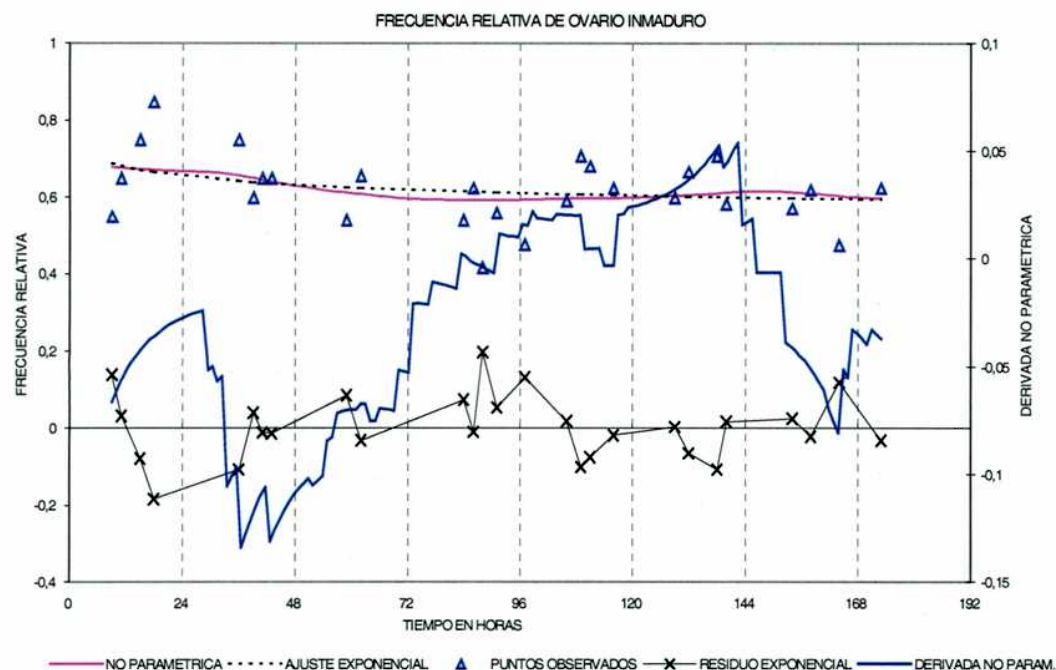


Figura 21: Frecuencia relativa de hembras de *A. persimilis* "no aisladas" de machos en período ovárico (A) estado 0 (ovario vacío o inmaduro) del ciclo reproductivo. Para el ajuste no paramétrico, el ancho de banda óptimo resultó $H=0.33$

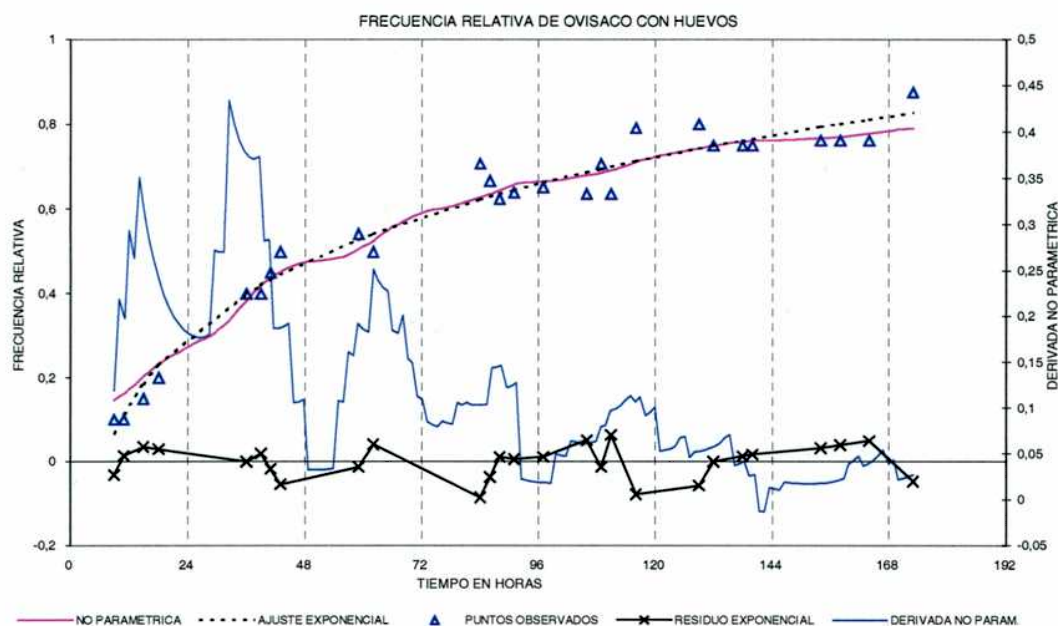


Figura 22: Frecuencia relativa de hembras de *A. persimilis* "no aisladas" de machos en período oviducto-ovisaco (B) estado 1 (oocitos o embriones en el ovisaco) del ciclo reproductivo. Para el ajuste no paramétrico el ancho de banda óptimo resultó $H=0.17$

Cuando las observaciones son restringidas a los cuatro primeros días de la experiencia, se observan picos diarios en la primera derivada de la función no paramétrica ajustada a la frecuencia relativa de estados 1 del período “B” (Fig. 21). El análisis de estos picos no arroja un resultado significativo y hacia el final de la experiencia estos saltos desaparecen y la función y su derivada se estabilizan. Este efecto fue considerado como una consecuencia de las diferentes edades que presentaban las hembras utilizadas en la experiencia.

Como la edad de maduración sexual es más o menos constante en *A. persimilis*, las hembras de diferentes edades maduraron en días sucesivos, en función de sus fechas de eclosión. Por esta causa, en los primeros días de la experiencia se observaron grupos de hembras, que estando en su primer ciclo reproductivo descendían los oocitos desde los ovarios hacia el ovisaco, aumentando la frecuencia de estados 1 dentro del período “B”.

Discusión y conclusiones

Cuando el interés está centrado en la duración de cada estadio dentro del ciclo reproductivo, es importante determinar cómo se realizará el seguimiento de los animales. En estudios realizados con otros anostracos, la duración de cada etapa en el ciclo reproductivo es estimada a partir de la frecuencia relativa que presenta cada estadio en un total de observaciones (Brendonck, 1991). Este parámetro (duración) podría estimarse mediante la observación y seguimiento de un número de animales a intervalos de tiempo definidos, obteniéndose un resultado más realista de la duración de cada estadio. Antes de elegir el tamaño de los intervalos de tiempo, es necesario descartar la existencia de sucesos, dentro del ciclo reproductivo, que ocurran solamente en determinados momentos del día. Con nuestros resultados, podemos concluir que al no observarse ninguna asociación significativa entre el tiempo y algún evento reproductivo (ovulación, oviposición, etc.), es posible llevar a cabo las observaciones sobre el estado reproductivo de las hembras cada 24 hs. en cualquier momento del día.

4.2.3- Duración de los estadios dentro del ciclo reproductivo en hembras mantenidas en pareja y hembras aisladas de machos. Comparación de características reproductivas.

Metodología

Animales sexados en etapa post-larval fueron sometidos a dos tratamientos:

- 1) “virgen”: 15 hembras colocadas individualmente en recipientes conteniendo 150 ml de medio de cría a 90 g l⁻¹ de concentración salina.
- 2) “en parejas”: 15 hembras y 15 machos colocados de a pares individuales en recipientes conteniendo 300 ml de medio de cría a 90 g l⁻¹ de concentración salina.

Las hembras fueron asignadas a cada tratamiento de manera azarosa mediante el uso de una tabla de números aleatorios. Los 15 recipientes (que no poseían ventanas) de cada tratamiento fueron colocados de a cinco en un total de tres peceras que actuaron solamente como baños térmicos (10 recipientes en cada pecera, 5 de cada tratamiento). Todos los recipientes fueron observados diariamente para registrar: mortalidad, presencia y tipo de puesta (quistes o larvas); además se registro la presencia de abrazo copulatorio en el tratamiento “parejas”. Los quistes, larvas u oocitos no fertilizados fueron cuidadosamente separados con pipeta “pasteur” y contados. En el tratamiento “parejas”, los machos que murieron fueron reemplazados por otros de la misma edad para asegurar una influencia masculina continua sobre la hembra. Los experimentos se continuaron hasta la muerte de cada una de las hembras. Sobre la base de todos los datos registrados se calcularon las siguientes variables reproductivas y del ciclo ontogenético:

- Longevidad de las hembras
- Longevidad de los machos
- Período pre-reproductivo
- Período reproductivo
- Tiempo transcurrido entre puestas sucesivas

- Edad de la primera maduración ovárica
- Edad del 1er amplexo
- Cantidad de descendientes por puesta
- Cantidad de descendientes por hembra
- Cantidad de puestas por hembra
- Relación oviparismo-ovoviviparismo

Siguiendo el criterio de Browne *et al.* (1984), el período pre-reproductivo fue considerado como el tiempo que transcurre desde el día de la eclosión hasta el día en que se produce la primera puesta. Pero a diferencia de este autor, el período reproductivo fue considerado desde el día de la primera puesta hasta que ocurre la muerte y no hasta el momento en que se produce la última puesta. La utilización de este criterio se ajusta mejor a lo que se observa en *A. persimilis*, donde muchas hembras mueren al poco tiempo de producir la última puesta y en algunos casos mueren reteniendo parte de la puesta en el ovisaco.

Todas las hembras fueron evaluadas diariamente bajo microscopio estereoscópico, registrándose la ubicación de los oocitos y /o embriones en el sistema reproductor femenino. Cada una de las 15 hembras sometidas a uno de los dos tratamientos fue considerada como una réplica independiente dado que no existió ningún tipo de conexión entre ellas.

Los valores medios calculados para las variables reproductivas fueron probados estadísticamente utilizando un ANOVA de 2 factores (tratamiento por bloque) o un test no paramétricos como el de Kruskal Wallis cuando se detectaron anomalías en la distribución de los datos (falta de ajuste a la distribución normal o heterogeneidad de las varianzas). El diseño experimental fue tratado como bloques completamente aleatorizados, donde cada baño térmico correspondió a un bloque; de esta manera se puede probar la presencia de diferencias entre los baños térmicos (Zar, 1999).

Resultados

Duración de los estadios en el ciclo reproductivo

La duración de cada estadio dentro del ciclo reproductivo, se determinó mediante la observación diaria de las hembras sometidas a los dos tratamientos. Las figuras 23 y 24 representan los diferentes estadios en el ciclo reproductivo (desde el oocito en el ovario hasta el quiste o nauplio liberado al medio) en función del tiempo, en hembras mantenidas en pareja y hembras aisladas continuamente de machos. El ciclo reproductivo dura aproximadamente seis días en ambos tratamientos y puede dividirse en:

- a) una primera etapa, con los oocitos en los ovarios (primeros tres días).
- b) una segunda etapa con los oocitos en los oviductos o en el ovisaco (últimos tres días).

Normalmente no se encuentra una superposición de dos camadas de oocitos en un mismo órgano del tracto reproductivo. Sin embargo, en algunos casos se observaron hembras que contenían dos camadas de oocitos retenidas en el oviducto que luego eran descargados al ovisaco. El fenómeno fue detectado por la diferencia de coloración que presentaban las distintas camadas de oocitos y a través del seguimiento diario y diferencial de los animales. Este fenómeno estaría relacionado con la retención de los oocitos en los oviductos como una consecuencia de la falta de cópula, porque fue encontrado solamente en hembras mantenidas aisladas de machos.

Tan rápidamente como los oocitos descienden hacia los oviductos, en los ovarios comienza un nuevo ciclo reproductivo. Por lo tanto, la maduración de una camada de oocitos en los ovarios puede ser un evento independiente del destino final de estos. Como puede verse en las figuras 23 y 24, el pasaje de los oocitos desde los oviductos hacia el ovisaco es un evento que puede durar más de 24 hs. en las hembras virginales, mientras que en las hembras mantenidas en pareja, este mismo fenómeno tiene una duración menor a las 24 hs.

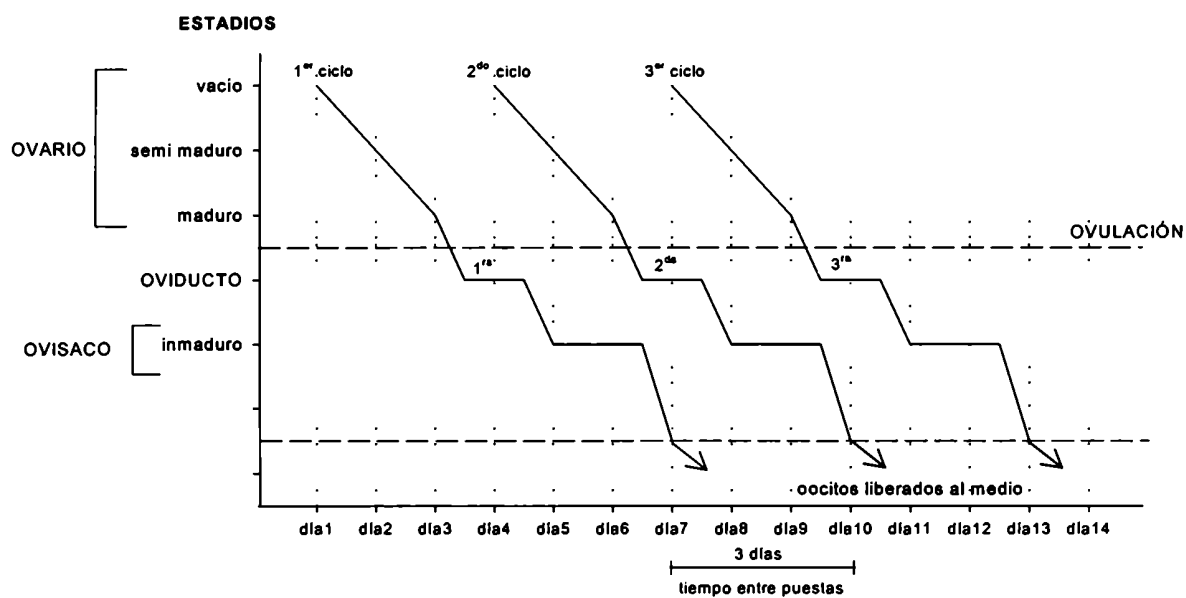


Figura 23: Duración de los diferentes estadios del ciclo reproductivo y de puesta en hembras de *A. persimilis* mantenidas aisladas de machos.

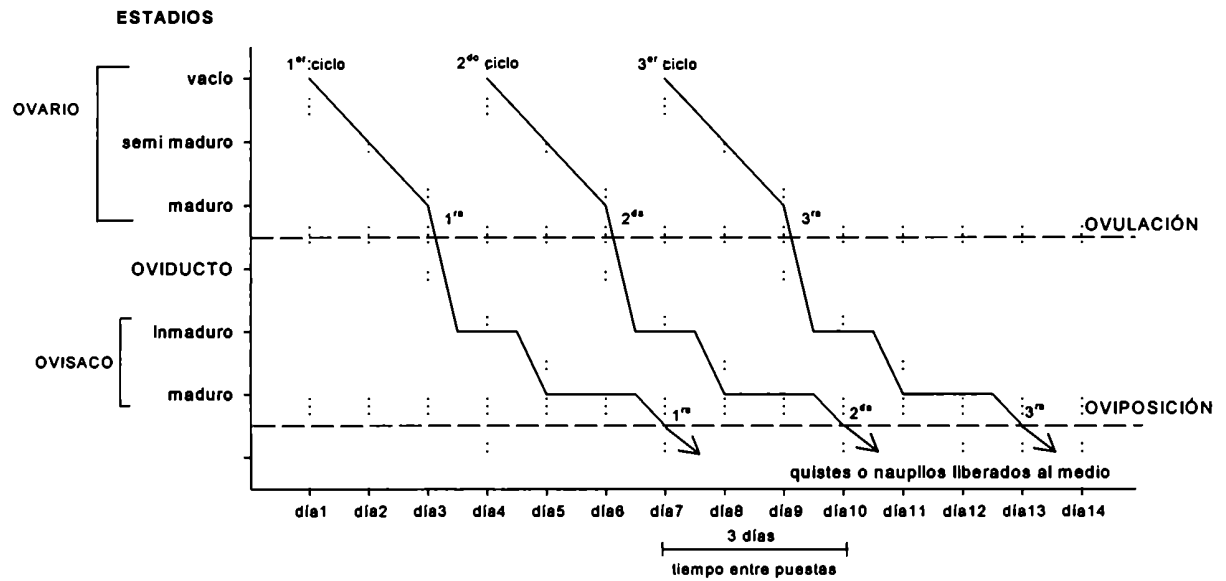


Figura 24: Duración de los diferentes estadios del ciclo reproductivo y de puesta en hembras de *A. persimilis* mantenidas en pareja.

Comparación del rendimiento reproductivo entre hembras mantenidas en pareja y hembras vírgenes.

Los valores medios y los desvíos estándar de las variables reproductivas y del ciclo ontogenético, registradas en los tratamientos "virgen" y "en parejas" están representados en la tabla 9. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre los dos grupos ni entre los bloques. Por lo tanto, se descartó cualquier influencia que pudiera haberse derivado de mantener las réplicas separadas en diferentes baños térmicos

Variables	Hembras en pareja	Hembras vírgenes	Machos
Longevidad (días)	34.1 ± 9.3 (n = 15)	29.7 ± 7.9 (n = 15)	36.4 ± 8.5 (n = 15)
Período pre-reproductivo (días)	23.1 ± 1.2 (n = 14)	23.5 ± 2.2 (n = 11)	
Período reproductivo (días)	11.9 ± 9.1 (n = 14)	9.6 ± 7.7 (n = 11)	
Tiempo entre puestas (días)	2.28 ± 0.3 (n = 14)	2.25 ± 0.2 (n = 11)	
Total de puestas por hembra	4.35 ± 2.6 (n = 14)	3.4 ± 2.01 (n = 11)	
Cantidad de descendientes por puesta	66.24 ± 27.7 (n = 14)	67.8 ± 33.6 (n = 11)	
Total de descendientes por hembra	293.3 ± 182.1 (n = 14)	227.4 ± 167.5 (n = 11)	
Edad a la 1 ^{er} maduración ovárica (días)	17.9 ± 0.9 (n = 14)	18.1 ± 1.2 (n = 11)	
Edad al primer amplexo (días)	19.1 ± 1.1 (n = 15)		

Tabla 9. Variables reproductivas y del ciclo ontogenético registradas en hembras mantenidas en pareja con machos y en hembras aisladas. Se indican los valores medios y los desvíos estándar. Se agrega la medida de longevidad de los machos.

La figura 25 representa gráficamente el número de descendientes promedio en cada puesta entre los dos grupos comparados. Aquí, las líneas llenas que unen puntos dentro de cada grupo, indican que más de 50% de las hembras que comenzaron la experiencia permanecen aún con vida. Las líneas punteadas indican que el porcentaje de hembras que permanecen con vida en esa puesta, es menor a 50% de los animales

que comenzaron la experiencia. Cuando se comparan gráficamente estos resultados, puede verse que las hembras vírgines presentan un número inferior de puestas que las hembras apareadas. La muestra original de hembras aisladas de machos se reduce a menos de 50 % a partir de la puesta número 4, mientras que en el grupo de hembras apareadas esta reducción ocurre a partir de la puesta número 5. Sin embargo, estas diferencias no son estadísticamente significativas.

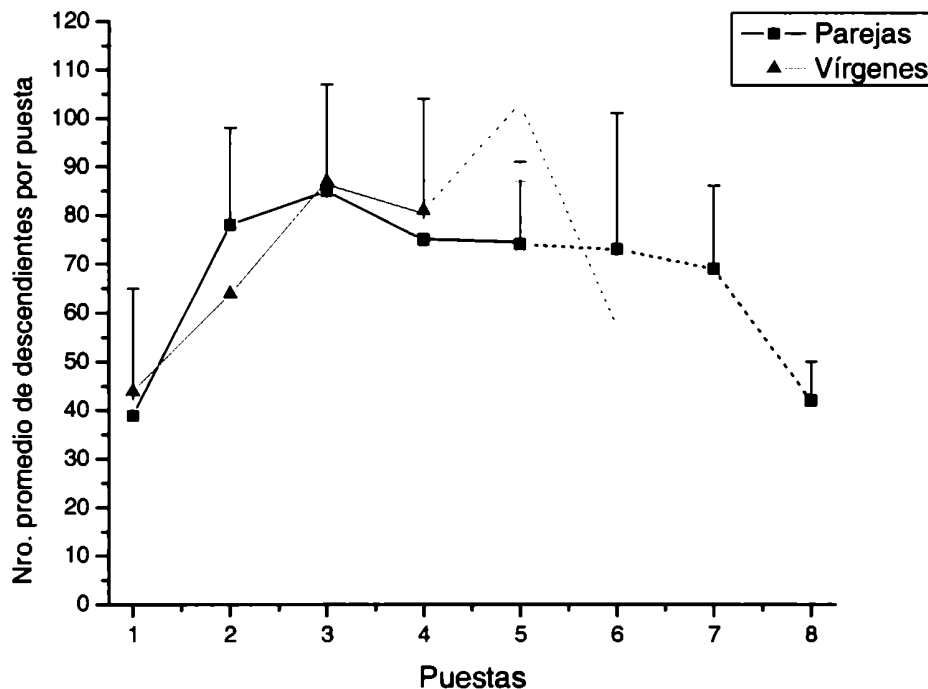


Figura 25: Comparación del número promedio de descendientes por puesta entre hembras vírgenes y hembras en pareja de *Artemia persimilis*. Las líneas sólidas indican que hasta esa puesta, más de 50% de la muestra permanece viva; las líneas punteadas, que menos de 50% de la muestra permanece viva.

Durante esta experiencia 57 % de las hembras mantenidas en pareja con machos se reprodujo en forma exclusivamente ovípara y 43% lo hizo de manera ovípara u ovovivípara en sucesivas puestas (modalidad reproductiva mixta). No se registraron hembras que presentaran exclusivamente la modalidad reproductiva ovovivípara a lo largo de todo su período reproductivo.

Características reproductivas que presentan las hembras virginales.

Hemos llamado “hembras vírgenes” a todas aquellas hembras que fueron mantenidas aisladas de machos desde la etapa post-larval hasta la muerte. Las observaciones sobre el comportamiento reproductivo de estas hembras nos permitieron estimar la influencia de los machos en el ciclo reproductivo.

- a) Se verificó en las hembras de *Artemia persimilis* de la Laguna Colorada Chica la ausencia de reabsorción de gametos no fecundados. Las hembras vírgenes completaron el descenso de oocitos desde los oviductos hasta el útero, y liberaron al medio camadas de oocitos que pudieron ser separados y contados. Estos oocitos se encuentran, en algunos casos, rodeados por una envoltura transparente y presentan una coloración que puede variar desde el beige hasta el anaranjado.
- b) Se descartó la presencia de partenogénesis en esta población de *A. persimilis*, dado que no se encontraron larvas nacidas a partir de hembras aisladas de machos. Tampoco se detectaron nacimientos luego de deshidratar, rehidratar y poner a eclosionar los oocitos no fecundados liberados por estas hembras.
- c) Se observó un estado característico que denominamos “ovisaco en masa” en el cual los oocitos dentro del útero están rodeados por una sustancia blancuzca. Esta sustancia impide distinguir a los oocitos y toda “la masa” se mueve de manera compacta cuando se producen las contracciones de las paredes uterinas. Las hembras vírgenes que mostraron “ovisaco en masa” después de un par de días, liberaron oocitos al medio.
- d) Las glándulas de la cáscara parecen perder el ciclo de vaciado normal. En las puestas vírgenes, generalmente se encuentran glándulas muy pigmentadas que presentan colores castaños cercanos al borra vino, a diferencia de lo que se encuentra en las hembras apareadas, donde la tonalidad de las glándulas es menos intensa y rojiza. Algunas hembras vírgenes, luego de esta sobrecarga de sus glándulas, reabsorben la secreción; otras, en cambio, quedan hiperpigmentadas por varios días, incluso hasta la muerte.

Discusión y conclusiones

A excepción de lo que ocurre con la primera camada de oocitos, la ovulación en *A. persimilis* estaría condicionada por la oviposición, ya que nunca se encontraron hembras que presentaran al mismo tiempo oocitos o embriones en el ovisaco pertenecientes a una 1^{ra} camada y oocitos en el oviducto de la camada siguiente (fases del ciclo de puesta (3+4), (3+5)), como es posible observar en *Streptocephalus* (Brendonck, 1991).

De acuerdo a otros estudios, el tiempo que transcurren los oocitos en los oviductos en *A. franciscana* puede variar de una a cuarenta horas (Bowen, 1962). En el transcurso de nuestro estudio pudimos observar parejas de animales abrazados, en las cuales la hembra transportaba oocitos aun infértiles en los oviductos. En una de ellas, diez minutos después de la observación los oocitos estaban descendiendo hacia el ovisaco. En otra observación, pudo verse al macho introduciendo la porción retráctil del pene en el gonoporo de la hembra que poseía oocitos en los oviductos. La cópula duró aproximadamente un minuto, durante el cual el macho permaneció con su abdomen rodeando el abdomen de la hembra, mientras descargaba el paquete de espermatozoides. Luego de treinta minutos de transcurrida la cópula, los oocitos ya se encontraban en el ovisaco donde eran mantenidos en movimiento mediante las contracciones de las paredes del útero.

Según algunos autores las hembras de *A. franciscana* presentan un ciclo endógeno del huevo por el cual en ausencia de cópula los oocitos no fecundados pasan desde los oviductos hasta el útero sin observarse reabsorción de gametos (Bowen, 1962; Belk, 1991). Nuestros resultados reflejan que *A. persimilis* presenta el mismo comportamiento. Sin embargo, Browne (1982) no detecta la presencia de ningún oocito liberado al medio en las experiencias donde se analizan hembras de *A. franciscana* mantenidas en aislamiento continuo. En otros anostracos existen diferentes opiniones en cuanto a la necesidad de la cópula como estímulo para que se produzca el descenso de los oocitos desde los oviductos hasta el ovisaco. Según Belk (1991) en *Eubbranchipus serratus* no existe descenso de oocitos en ausencia de cópula y el mismo comportamiento se observa en *Streptocephalus sealli* (Prophet, 1963). Tampoco

existiría liberación al medio de oocitos no fecundados en *S. dichotomus* y *S. proboscideus* (Munuswamy & Subramoniam, 1985; Brendonck, 1991). En contraste con lo anterior, hembras de *Streptocephalus vitreus* y *S. rubricaudatus* liberaron oocitos sin cáscara, en ausencia de machos (Hildrew, 1985). Garreau de Loubresse (1980) estudió el efecto del aislamiento en las hembras de *Tanyastix*, notando que 65-70% de las hembras movilizaban los oocitos espontáneamente hacia el ovisaco, una vez allí eran cubiertos con material de la glándula de la cáscara. Las diferencias observadas entre hembras vírgenes de diversas especies sobre la liberación al medio de oocitos no fecundados o su reabsorción, parecen tener raíz en la frecuencia con la que fueron realizadas las observaciones sobre las hembras no apareadas. Murugan *et al.* (1996) demuestra la liberación de oocitos infértiles en hembras de *S. dichotomus*, *S. proboscideus* y *S. torvicornis* no apareadas. Estos oocitos, que son rápidamente degradados, pudieron ser detectados gracias a una alta frecuencia de observaciones a intervalos de tiempo menores de una hora. En nuestra investigación, los productos liberados al medio por las hembras vírgenes no sólo fueron detectados, sino también contados, deshidratados, rehidratados y puestos a eclosionar (con resultado negativo). Quizás estos oocitos podrían estar cubiertos de algún tipo de envoltura que los protege de la degradación, pero para confirmar este supuesto debería hacerse un estudio microscópico.

Nuestros resultados nos permiten concluir que en *A. persimilis*:

- a) La ovulación estaría determinada por la liberación al medio de quistes, nauplios o productos infértiles desde el ovisaco (oviposición) y por lo tanto, no sería necesaria la cópula como estímulo.
- b) Existe liberación al medio de oocitos infértiles o no fecundados, que no se degradan
- c) En la población de *A. persimilis* de la laguna Colorada Chica no se observa partenogénesis como modalidad reproductiva.
- d) No se detectaron diferencias significativas, en las variables reproductivas, entre las hembras del grupo “virgen” y el grupo “en pareja”. Las hembras mantenidas en aislamiento (vírgenes), continuaron con sus ciclos reproductivos aún en ausencia de macho.

4.2.4- Características de las principales fases dentro del ciclo reproductivo y el ciclo de puesta.

Metodología

Sobre la base del análisis de los datos registrados en las experiencias detalladas en este capítulo (determinación de la variación horaria en la proporción de estadios en el ciclo reproductivo (ítem 4.2.2); duración efectiva de estadios comparada entre hembras vírgenes y hembras en pareja y cálculo del rendimiento reproductivo (ítem 4.2.3), es posible extraer algunas conclusiones sobre los principales sucesos dentro del ciclo reproductivo y el ciclo de puesta.

Para comprender mejor este análisis es necesario tener presentes los diferentes diseños experimentales utilizados en cada una de estas experiencias. Las diferencias más importantes entre estos dos tipos de experimentos radican en el tipo de muestreo realizado, el ambiente en el cual se encontraban las hembras muestreadas y en la duración total de cada una de las experiencias. En las diferentes experiencias las hembras fueron, en algunos casos, mantenidas continuamente en presencia de un macho sin tener la posibilidad de elegir otra pareja; en otros casos se las mantuvo en recipientes donde estaban presentes varias hembras y machos al mismo tiempo y finalmente también, se observaron hembras que estuvieron aisladas totalmente de machos. Llamaremos **VHPE** al diseño experimental utilizado para calcular la variación horaria en la proporción de estadios en el ciclo reproductivo y **DECRR** a la experiencia donde se calculó la duración de cada estadio y se comparó el rendimiento reproductivo entre hembras vírgenes y en pareja.

Debido al objetivo y al tipo de diseño experimental utilizado en la experiencia **VHPE**, no fue posible diferenciar entre los estadios del ciclo reproductivo 4 y 5 entre hembras que tenían una puesta vivípara y las que tenían una puesta ovípara. Aquí, cada hembra fue muestreada en forma aleatoria de un recipiente en el cual estaban presentes varias hembras y machos, al no existir un seguimiento diferencial de cada hembra individual fue imposible determinar cuál sería el futuro de los embriones que se encontraban en el ovisaco (quistes o nauplios). Con el tipo de observación realizada no fue posible

distinguir entre, los oocitos que habían bajado recientemente al ovisaco y de los embriones que no presentaban cáscara y se desarrollarían hasta larva nauplio. Por lo tanto, cuando se hicieron las observaciones y no pudiendo discriminar entre los dos estadios (4 y 5), los datos registrados se colocaron juntos bajo la denominación de "ovisaco con productos" (sin discriminar entre embriones recién fecundados y quistes o nauplios listos para ser liberados al medio); y solamente la fase 4 del ciclo de puesta fue discriminada para confeccionar las tablas 10 a 12. En cambio, en la experiencia **DECRR**, donde las hembras fueron sometidas individualmente a los tratamientos "virgen" o "en pareja", y fueron evaluadas una vez al día hasta la muerte de cada una, el modo reproductivo pudo ser claramente determinado por la observación directa de la descendencia producida por cada hembra. Por esta razón los estadios 4 "Oocitos en el ovisaco" y 5 "Quistes o nauplios en el ovisaco" son discriminados con valores separados en las tablas 13 y 14.

Para confeccionar las tablas 12 a 14 el ciclo reproductivo fue dividido en dos períodos consecutivos: un período A "ovárico" (los ovarios están vacíos o poseen oocitos en diferentes estados de maduración) y un período B "oviducto-ovisaco" (los oocitos están en los oviductos, en el ovisaco o han sido fecundados, pasando a ser embriones). Cada período está compuesto por tres estados que reflejan diferencias en la maduración de los oocitos o en la posición que ocupan estos dentro del sistema reproductor. Dado que los productos sexuales (oocitos o embriones) en cada período A o B pueden provenir de diferentes camadas (cuando se produce la ovulación de los oocitos del primer ciclo reproductivo comienza la maduración de una nueva camada en el ovario) cada uno de ellos fue considerado en forma separada. De esta forma con todas las observaciones, se calcularon las frecuencias relativas de cada estado, dentro de cada período.

Las tablas 10 y 11 fueron confeccionadas con las frecuencias absolutas de las observaciones realizadas en la experiencia **VHPE** en hembras mantenidas en presencia de machos y en hembras aisladas, para el total de días que duró la experiencia (7 días). La tabla 12 representa los porcentajes de registros para cada estado dentro de los períodos A y B obtenidos de la misma experiencia. Aquí, se han discriminado los valores para dos grupos de hembras que se encontraban con machos:

las hembras totales mantenidas en presencia de machos y el subconjunto de estas hembras que estaban además en amplexo al momento de realizar el muestreo.

Para realizar comparaciones en las frecuencias de los estadios, se utilizaron solamente los datos obtenidos en los primeros 8 días de la experiencia **DECRR**, dado que la experiencia **VHPE** solo duró 7 días. Este intervalo de tiempo (7-8 días) es suficiente para que se complete un ciclo reproductivo y comience la maduración de los oocitos del siguiente ciclo en los ovarios.

Resultados y Conclusiones

Fases con oocitos en los ovarios:

En los datos obtenidos a partir de la experiencia **VHPE** (Tabla 12 a) 31.9% de los registros pertenecen a hembras con diferentes grados de maduración ovárica asociados con ovisacos vacíos. El estadio correspondiente a ovisaco sin ningún tipo de producto es característico de hembras jóvenes cuya primera camada no ha descendido aún al ovisaco o puede verse en hembras que han liberado muy recientemente su primera camada al medio. En este último caso, si existiera copula, la duración del estadio "ovisaco vacío" es muy corta porque los oocitos descienden rápidamente desde los oviductos hacia el ovisaco. Es importante destacar que la suma de los registros de fases ováricas son mayores en la experiencia **VHPE** (tablas 10, 12 a) que en la experiencia **DECRR** (tablas 13 a, 14 a). La diferencia esta representada, casi exclusivamente, por el total de observaciones registradas en estadios 0+0 (ovario y ovisaco vacíos). Esto se debería a que, en la experiencia **DECRR**, los registros comenzaron cuando más de 50% de las hembras presentaron algún signo de maduración sexual, por lo tanto la fase 0+0 tiene una baja frecuencia. En cambio, en la experiencia **VHPE**, donde la frecuencia del estadio 0+0 es más alta, se estaría reflejando una muy reciente maduración sexual de las hembras, al momento de empezar a realizar las observaciones y registrar los datos.

Día	Fases									Σ
	0+0	1+0	2+0	3+0	3+1	3+2	4+0	4+1	4+2	
1°	23 (1)	32 (17)	9 (7)	5 (3)	0 (0)	0 (0)	10 (2)	1 (0)	0 (0)	80 (30)
2°	14 (0)	12 (9)	13 (10)	6 (0)	0 (0)	0 (0)	25 (2)	9 (2)	1 (0)	80 (23)
3°	19 (3)	7 (2)	8 (8)	6 (1)	3 (0)	0 (0)	15 (4)	25 (12)	5 (2)	88 (32)
4°	11 (0)	4 (1)	11 (7)	13 (3)	3 (0)	0 (0)	35 (4)	26 (8)	19 (13)	122 (36)
5°	6 (0)	2 (0)	12 (4)	15 (0)	1 (0)	0 (0)	35 (6)	20 (9)	24 (20)	115 (39)
6°	8 (0)	3 (3)	4 (3)	8 (1)	0 (0)	0 (0)	30 (5)	26 (5)	18 (14)	97 (31)
7°	6 (0)	3 (0)	4 (3)	4 (0)	0 (0)	0 (0)	23 (4)	15 (4)	23 (8)	78 (19)
Total	87 (4)	63 (32)	61 (42)	57 (8)	7 (0)	0 (0)	173 (27)	122 (40)	90 (57)	660 (210)
(%)*	(4.6)	(50.8)	(68.9)	(14)	(0)	(0)	(15.6)	(32.8)	(63.3)	(31.8)

* Porcentaje de hembras en amplexo del total de hembras registradas para cada fase.

Tabla 10. Frecuencias absolutas de las diferentes fases en el ciclo de puesta registradas en hembras "no-aisladas" de machos, a tiempos seleccionados al azar durante un período de siete días (experiencia **VHPE**). Los valores entre paréntesis corresponden a las hembras encontradas en amplexo en cada fase.

Día	Fases									Σ
	0+0	1+0	2+0	3+0	3+1	3+2	4+0	4+1	4+2	
1°	44	16	2	9	1	0	0	0	0	72
2°	22	13	2	17	5	0	2	3	0	64
3°	20	13	8	2	0	0	0	4	2	49
4°	4	31	21	30	1	3	9	1	0	100
5°	5	3	10	43	5	3	23	8	0	100
6°	0	3	1	13	19	16	2	18	14	86
7°	0	0	1	24	1	26	7	4	11	74
Total	95	79	45	138	32	48	43	38	27	545

Tabla 11. Frecuencias absolutas de las diferentes fases en el ciclo de puesta, registradas en hembras "aisladas" de machos, a tiempos seleccionados al azar durante un período de siete días (experiencia **VHPE**).

Porcentaje de amplexos

El porcentaje de hembras con fase ovárica que además están abrazadas por un macho es de 20% para la experiencia en que las hembras están en pareja y pueden elegir a un solo macho para abrazarse (**DECRR**) y de 37% cuando las hembras fueron muestreadas al azar de un *pool* de hembras y machos que compartían el mismo ambiente (**VHPE**). Cuando se observan los datos de las hembras no aisladas de machos obtenidos de la experiencia **VHPE** durante los siete días que duró la misma (tablas 10; 12 a y b), del total de 660 hembras muestreadas al azar en diferentes horarios del día, 210 estaban abrazadas por un macho (31.8%). De este subtotal de hembras en amplexo, solamente cuatro eran sexualmente inmaduras (no presentaban

oocitos en ningún sitio del tracto reproductivo). En los últimos días de esta experiencia donde el total de hembras inmaduras muestreadas disminuyó de 56 a 31, el porcentaje de hembras inmaduras abrazadas por machos descendió hasta un valor cero. Este resultado sugiere que los machos pueden abrazarse a cualquier hembra independientemente del estado de maduración sexual que ella presente. Sin embargo, en presencia de hembras con algún signo de desarrollo ovárico, los machos seleccionan preferentemente este tipo de hembras para abrazarse y poder copular. Además de esto, nunca se registraron amplexos en hembras con fases reproductivas 0+0 en las observaciones realizadas en la experiencia **DECRR** sobre las hembras mantenidas en pareja, como puede verse en la tabla 13.

Fases con oocitos en los oviductos:

Las fases del ciclo de puesta (3+1) y (3+2), que corresponden a la presencia de oocitos en los oviductos y oocitos en los ovarios provenientes de una siguiente camada, fueron encontrados con muy baja frecuencia o directamente no se observaron en las hembras que se encontraban en presencia de machos (Tablas 10; 12 a; 13 a y 14 a). El porcentaje de hembras con oocitos en los oviductos es casi el doble en la experiencia **VHPE** que en la experiencia donde las hembras son mantenidas en pareja con machos (**DECRR**) como puede verse al comparar los valores registrados en las tablas 12 a y 14 a.

Cuando se comparan los datos de las tablas 12 a con los de 12 c, así como los de las tablas 14 a y 14 c puede verse que; el total de fases con oocitos en los oviductos observadas en las hembras mantenidas en presencia de machos (en pareja o rodeadas de machos y hembras) es mucho menor que los porcentajes encontrados en las hembras mantenidas aisladas de machos en estado "virginal". Estos resultados reflejan la existencia de una retención de los oocitos en los oviductos cuando la cópula se retrasa o no existe, como ocurre en las hembras virginales. Podríamos suponer que, si un grupo de hembras y machos están presentes en un mismo cuerpo de agua, como ocurre en el diseño experimental **VHPE**, cada macho compite con los demás por encontrar una pareja entre un grupo de hembras en diferentes estadios del ciclo

reproductivo. Por otra parte, cada hembra debe encontrar (o ser encontrada) un macho antes que sus oocitos desciendan naturalmente desde los oviductos hacia el ovisaco (como ocurre en las hembras “vírgenes”) y la fertilización ya no tenga efecto. Es esperable que estas hembras mantengan los oocitos en los oviductos el mayor tiempo posible a la espera de que ocurra el encuentro con un macho. En la experiencia **DECRR**, la pareja de cada hembra estaba asegurada sin ningún tipo de competencia, por la presencia de un macho en un pequeño volumen de medio salino. Por esta razón cuando la hembra estaba receptiva el acoplamiento con el macho ocurría casi inmediatamente. Nuestros resultados sugieren, que el tiempo de retención de los oocitos en los oviductos puede variar desde un valor mínimo, cuando cada hembra receptiva posee un macho disponible (experiencia donde las parejas estaban aisladas en recipientes de poco volumen **DECRR**); un valor medio, cuando existe competencia entre varias hembras y machos por encontrarse en un cuerpo de agua (experiencia en la que varias hembras y machos compartían un mismo ambiente **VHPE**); y un valor máximo que corresponde a la espera de la cópula y fertilización, antes que los oocitos no fertilizados pasen inevitablemente al ovisaco (como ocurre en las hembras que están aisladas de machos en ambas experiencias **DECRR** y **VHPE**).

Durante el amplexo, la cópula sería el estímulo para el rápido pasaje de los oocitos desde los oviductos hacia el ovisaco donde se encuentra el esperma del macho. Por esta razón es muy poco frecuente encontrar hembras en amplexo que transporten oocitos en los oviductos.

Período A	Período B			Total
	Ovisaco vacío	Oocitos en el oviducto	Ovisaco con productos	
Ovario vacío	13.2	8.6	26.2	48.0
Ovario semi-maduro	9.5	1.1	18.5	29.1
Ovario maduro	9.2	0.0	13.7	22.9
Total	31.9	9.7	58.4	100

a) Porcentaje de hembras en cada fase, respecto del total de hembras “no-aisladas” de machos (N = 660)

Período A	Período B			Total
	Ovisaco vacío	Oocitos en el oviducto	Ovisaco con productos	
Ovario vacío	1.9	3.8	12.9	18.6
Ovario semi-maduro	15.2	0.0	19.0	34.3
Ovario maduro	20.0	0.0	27.1	47.1
Total	37.1	3.8	59.0	100.0

b) Porcentaje de hembras encontradas en amplexo en cada fase, respecto del total de hembras “no-aisladas” (N = 210).

Período A	Período B			Total
	Ovisaco vacío	Oocitos en el oviducto	Ovisaco con productos	
Ovario vacío	17.4	25.3	7.9	50.6
Ovario semi-maduro	14.5	5.9	7.0	27.4
Ovario maduro	8.3	8.8	5.0	22.1
Total	40.2	40	19.9	100.1

c) Porcentaje de hembras virginales en cada fase, respecto del total de hembras “aisladas” de machos (N = 545)

Tabla 12. Ubicación de los oocitos y embriones, dentro del sistema reproductor femenino, en hembras de diferentes edades y a tiempos seleccionados al azar durante un periodo de siete días. Datos obtenidos de la experiencia **VHPE**.

Período A	Período B				Total
	Ovisaco vacío	Oocitos en el oviducto	Oocitos en el ovisaco	Quistes o nauplios en el ovisaco	
Ovario vacío	2 (0)	4 (2)	22 (1)	11 (4)	39 (7)
Ovario semi-maduro	12 (3)	1 (1)	8 (3)	19 (15)	40 (22)
Ovario maduro	10 (10)	0 (0)	4 (0)	26 (26)	40 (36)
Total	24 (13)	5 (3)	34 (4)	56 (45)	119 (65)

a) Hembras individualizadas, mantenidas durante toda la experiencia, en pareja. Los valores entre paréntesis indican el subgrupo de hembras que se encuentran en amplexo en cada fase (total de observaciones, N =119).

Período A	Período B			Total
	Ovisaco vacío	Oocitos en el oviducto	Ovisaco con productos	
Ovario vacío	6	21	7	34
Ovario semi-maduro	12	11	24	47
Ovario maduro	10	3	17	30
Total	28	35	48	111

b) Hembras individualizadas, mantenidas durante toda la experiencia aisladas de machos (total de observaciones, N =111)

Tabla 13. Ubicación de los oocitos y embriones, dentro del sistema reproductor femenino, en hembras individualizadas, mantenidas en los tratamientos “en pareja” o “virgen”. Las frecuencias absolutas obtenidas corresponden a los primeros 8 días del total de la experiencia DECRR.

Fases con oocitos u embriones en el ovisaco:

Los resultados obtenidos de la experiencia **VHPE** (Tabla 12 a) muestran que 58.4% de las hembras poseen al mismo tiempo oocitos en los ovarios con diferentes grados de maduración, y oocitos, quistes o nauplios en el ovisaco (fases (4+0), (4+1), (4+2) del ciclo de puesta). Dado el tipo de diseño utilizado en esta experiencia los diferentes productos reproductivos encontrados en el ovisaco no pudieron ser discriminados y fueron considerados como un estadio único llamado "ovisaco con productos". Como se muestra en la tabla 10 un 32% de estas hembras se encontraban además abrazadas por un macho (amplexo). En la experiencia **DECRR**, las fases en el ovisaco fueron clasificadas de acuerdo con el tipo de producto encontrado en "oocitos" o "quistes y nauplios" (fases (4+0), (4+1), (4+2), (5+0), (5+1), (5+2) del ciclo de puesta). El total de hembras que se encontraron en estas fases del ciclo de puesta alcanzó un valor de 75.6% (Tabla 14 a), con 55% de ellas en amplexo. Este resultado se obtiene al sumar los totales correspondientes a "Oocitos en el ovisaco" y "Quistes o nauplios en el ovisaco" que se encuentran en la tabla 13 a. En esta experiencia se pudo observar que la mayoría de las hembras se encontraban en amplexo el día anterior a la oviposición; 24 hs. más tarde las parejas se encontraron separadas, la descendencia había sido liberada y una nueva camada de oocitos ya estaba en el ovisaco. Por lo tanto, la cópula y consiguiente fertilización de la segunda camada de oocitos se produjeron en un período de tiempo inferior a las 24 hs.

Como se muestra en la tabla 16, del total de hembras registradas en la experiencia **VHPE**, un 26.2% (173 hembras) poseía productos reproductivos en el ovisaco y el ovario vacío pero sólo 15.6% de estas hembras (27 hembras) se encontraban en amplexo. Los resultados de la experiencia **DECRR** muestran que 27.7% de las hembras (33 hembras) se encontraron en fase (4+0) y (5+0), pero solamente 15.2% de éstas (5 hembras) estaban abrazadas por un macho (como puede verse en las tablas 19 a y 20 a al sumar los valores encontrados en los casilleros "Oocitos en el ovisaco" y "Quistes o nauplios en el ovisaco" en combinación con ovario vacío).

Período A	Período B				Total
	Ovisaco vacío	Oocitos en el oviducto	Oocitos en el ovisaco	Quistes o nauplios en el ovisaco	
Ovario vacío	1.7	3.4	18.5	9.2	32.8
Ovario semi-maduro	10.1	0.8	6.7	16.0	33.6
Ovario maduro	8.4	0.0	3.4	21.8	33.6
Total	20.2	4.2	28.6	47.0	100

a) Porcentaje de hembras en cada fase del ciclo reproductivo, respecto del total de hembras mantenidas en pareja (N =119).

Período A	Período B				Total
	Ovisaco vacío	Oocitos en el oviducto	Oocitos en el ovisaco	Quistes o nauplios en el ovisaco	
Ovario vacío	0.0	3.1	1.5	6.2	10.8
Ovario semi-maduro	4.6	1.5	4.6	23.1	33.8
Ovario maduro	15.4	0.0	0.0	40.0	55.4
Total	20.0	4.6	6.2	69.2	100.0

b) Porcentaje de hembras en amplexo en cada fase del ciclo reproductivo, respecto del total de hembras mantenidas en pareja (N =65).

Período A	Período B			Total
	Ovisaco vacío	Oocitos en el oviducto	Ovisaco con productos	
Ovario vacío	5.4	18.9	6.3	30.6
Ovario semi-maduro	10.8	9.9	21.6	42.3
Ovario maduro	9.0	2.7	15.3	27.0
Total	25.2	31.5	43.2	100.0

c) Porcentaje de hembras virginales en cada fase del ciclo reproductivo, respecto del total de hembras aisladas de machos (N =111).

Tabla 14. Ubicación de los oocitos y embriones, dentro del sistema reproductor femenino, en hembras individualizadas, mantenidas en los tratamientos "en pareja" o "virgen" en la experiencia DECRR. Porcentajes calculados a partir de los registros correspondientes a los primeros 8 días del total de la experiencia.

Lo que se observa al comparar las tablas 12 a y 14 a, es que para un mismo estado de los oocitos o embriones en el ovisaco, el porcentaje de amplexos aumenta a medida que aumenta la maduración de los oocitos en los ovarios.

Características del abrazo copulatorio

La hembra alcanza la madurez sexual cuando una camada de oocitos comienza a madurar en los ovarios y por lo tanto, está receptiva por primera vez. Si la hembra encuentra un macho durante este período, el cortejo, cópula y fertilización pueden ocurrir. Si no, la hembra permanece receptiva mientras los oocitos descienden desde los ovarios hasta los oviductos (ovulación).

El porcentaje de hembras en amplexo del total de hembras observadas presenta una misma tendencia en ambas experiencias. Como se muestra en la figura 26, existe un primer pico en el porcentaje de amplexos en las fases (2+0) y un segundo pico en las fases (4+2) del primer ciclo de puesta. Esto sugiere que, durante el primer ciclo reproductivo, las hembras van siendo cada vez más receptivas a medida que los ovarios van madurando gradualmente. Más tarde en el ciclo de puesta, cuando una camada de oocitos ya se encuentra en el ovisaco y una nueva camada comienza otro ciclo reproductivo en los ovarios, la hembra está nuevamente receptiva. La receptividad de las hembras aumenta nuevamente y en forma gradual a medida que las gonadas (ovarios) van madurando. Cuando un macho abraza a una hembra que se encuentra por ejemplo en fase (4+2) del ciclo de puesta, debe esperar la liberación de una camada de oocitos para poder fertilizarla. Una vez producida la puesta fecundada por un macho (o una cópula) anterior, el ovisaco está vacío y la nueva camada de oocitos desciende hacia los oviductos; entonces el macho en amplexo fertiliza a la hembra y la pareja se separa. De esta forma el macho se asegura una futura cópula con la hembra receptiva que ha logrado encontrar. Es importante destacar que la fase del ciclo de puesta (3+2) que representa a una hembra transportando oocitos en los oviductos y oocitos en los ovarios de una camada posterior, no es una fase que sea observada frecuentemente en hembras que se encuentran en pareja. Este tipo de superposición

de estadios de dos ciclos reproductivos esta reflejando una retención de los oocitos en los oviductos a consecuencia de la ausencia de cópula.

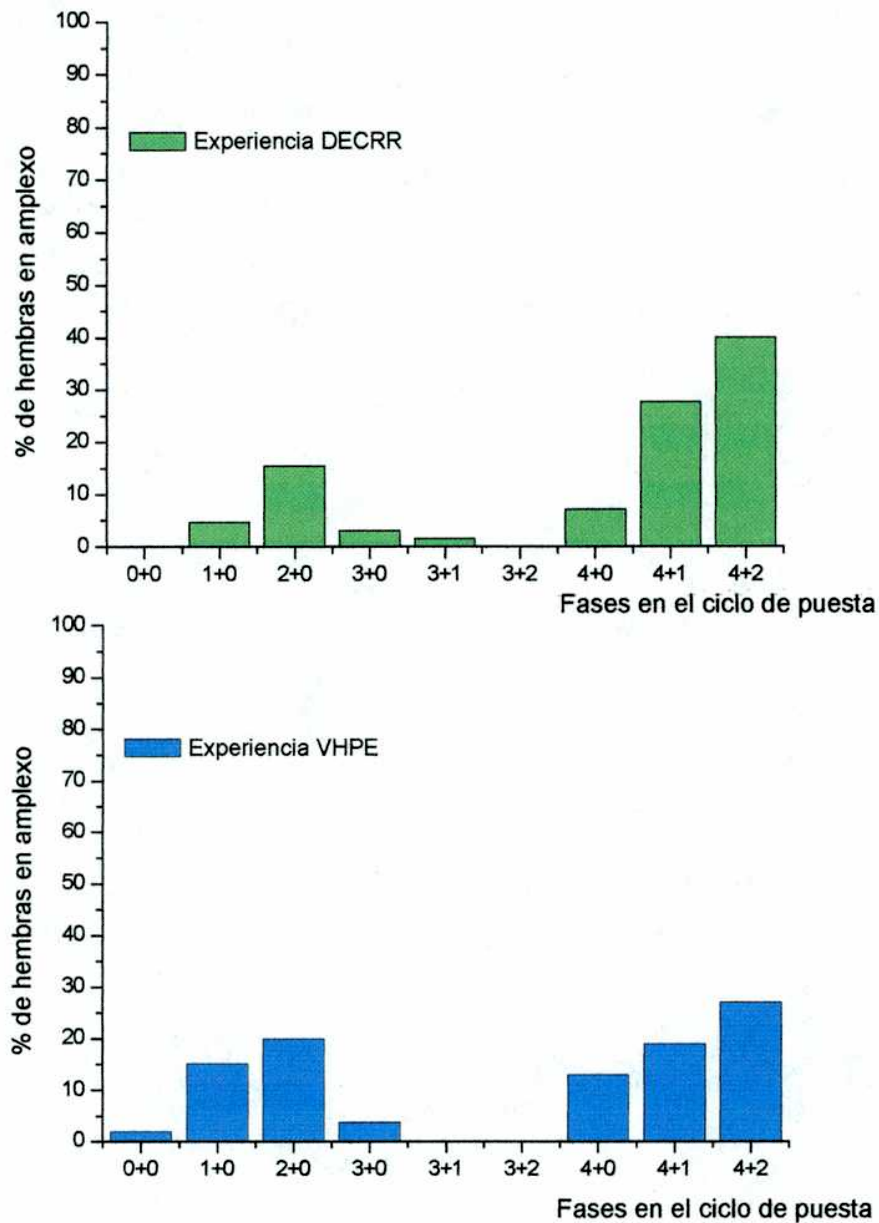


Figura 26: Distribución de los porcentajes de hembras de *Artemia persimilis* en amplexo en las diferentes fases del ciclo de puesta, respecto del total de hembras en amplexo, sobre la base de los datos registrados en las experiencias VHPE y DECRR.

4.3 Respuesta de las variables reproductivas y del ciclo de vida a diferentes tratamientos salinos, registrada en animales de *A. persimilis* de la laguna Colorada Chica

Introducción

Se ha planteado que las diferencias en las características reproductivas y del ciclo ontogenético representarían una adaptación fenotípica de las poblaciones a los distintos ambientes en los que se encuentran (Stearns, 1977). En este sentido, la estabilidad y predecibilidad del ambiente serían los parámetros principales que afectarían la evolución de las tácticas reproductivas. Por tal motivo, si una población de *Artemia* evoluciona en un ambiente físico inestable e impredecible desviará una gran parte de la energía disponible en adaptaciones a elementos abióticos, mientras otras poblaciones que habitan ambientes físicos benignos serían capaces de dirigir más energía hacia interacciones bióticas como la reproducción (Polis & Farley, 1980).

Los anostracos del género *Artemia* se han adaptado a vivir en ambientes salados a hipersalinos, costeros o continentales, con composiciones de salmueras muy diversas y regímenes climáticos muy variados. Como una consecuencia de la gran distribución mundial de *Artemia* (Fig. 8), puede esperarse que el aislamiento geográfico de las poblaciones que habitan biotopos específicos con diferentes condiciones de salinidad y temperatura, haya conducido a generar poblaciones con diferentes tolerancias a los factores abióticos.

Existe una gran interacción entre la salinidad y la temperatura en lo que se refiere a la respuesta reproductiva de *Artemia* y más aun, esta interacción varía significativamente entre las diferentes especies estudiadas (Browne & Wanigasekera, 2000). A pesar de que la resistencia a las diferentes salinidades es alta y generalizada para el género, pudiendo variar desde los 3 a los 300 g l⁻¹, este espectro de tolerancia no es válido para todas las especies y en especial cuando se trata de salinidades bajas (Triantaphyllidis *et al.*, 1995). Los anostracos del género *Artemia* son capaces de adaptarse a grandes cambios en la salinidad de su medio externo, mediante procesos homeostáticos que mantienen la presión osmótica de la hemolinfa independiente de los cambios externos (Croghan, 1958a). Esta regulación osmótica es llevada a cabo por el órgano nual, en el estadio naupliar y a través de las branquias en el adulto (Conte *et al.*, 1972; Croghan, 1958b). *Artemia* se mantiene hiperosmótica respecto al medio a salinidades entre 3 y 10 g l⁻¹, bombeando iones activamente hacia el medio interno y

excretando abundante agua. A salinidades de 10 ‰ se comporta como osmoconformador: la presión osmótica del medio interno es similar a la del medio externo; a salinidades mayores de 10 ‰, *Artemia* osmorregula hipotónicamente, expulsando activamente iones de la hemolinfa al medio externo y eliminando una orina hipertónica (Barnes, 1994). El continuo transporte de iones en contra de un gradiente requiere de altas cantidades de energía que se incrementan a medida que aumenta la concentración salina del medio exterior. Al parecer, *Artemia* produce una partición de la energía disponible entre el transporte de iones y la síntesis de proteínas en lugar de incrementar la producción de energía (Conte *et al.*, 1973). De tal forma, los procesos dependientes de energía como son el crecimiento y la reproducción, serán posiblemente menores en altas concentraciones salinas, dado que una mayor cantidad de energía es necesaria para mantener la homeostasis osmótica.

En el nuevo mundo el modo reproductivo del género *Artemia* es exclusivamente bisexual, describiéndose para Sudamérica las especies *Artemia persimilis* y *A. franciscana*. Las especies bisexuales exhiben acervos genéticos altamente diversos y una fuerte tendencia a la diferenciación interpoblacional, producto de la heterogeneidad de su hábitat, lo que se manifiesta en la gran variabilidad de los parámetros reproductivos (Gajardo *et al.*, 1998). Las hembras de *Artemia* son iteróparas y presentan la posibilidad de combinar, en diferentes ciclos reproductivos, un tipo de reproducción ovípara, con la producción de quistes (embriones en diapausa) que son liberados al medio, y un tipo de reproducción ovovivípara, con la producción de cigotas que se desarrollan dentro del ovisaco hasta larvas nauplio, estadio en el que abandonan el ovisaco de la hembra. A consecuencia de esta gran plasticidad del grupo, podemos esperar que cada población se adapte al clima de la región en la que se encuentra su cuerpo de agua, y a las condiciones particulares químicas y físicas de su biotopo. Como resultado, cada población presentará variables reproductivas y de su ciclo de vida que estarán en equilibrio con las condiciones ambientales locales.

Si bien las investigaciones efectuadas en el género durante la última década son numerosas los antecedentes reproductivos para poblaciones sudamericanas son aún escasos. Experimentos realizados con poblaciones de *Artemia* sudamericanas, todas pertenecientes a la especie *A. franciscana*, revelan la presencia de diferencias en los

parámetros reproductivos que estarían asociadas a las características de los cuerpos de agua, el origen geográfico de las poblaciones y /o a las características genéticas de cada población analizada (Crespo, 1999). Por tal motivo es muy importante conocer la variabilidad en los patrones reproductivos que se presentan en cada población, aun cuando exista alguna información sobre la misma especie de *Artemia* en particular.

En varios trabajos se ha puesto a prueba el efecto de la variación de los factores abióticos sobre el rendimiento reproductivo y la supervivencia de diferentes especies de *Artemia* (Browne, 1980 a y b y 1992; Vanhaecke *et al.*, 1984; Wear & Haslett, 1986; Wear *et al.*, 1986; Barata *et al.*, 1995; Triantaphyllidis *et al.*, 1995; Barata *et al.* 1996 a y b; Correa & Tapia 1998; Browne *et al.*, 1984 y 2002) pero sólo en unos pocos, se hace referencia al comportamiento de las variables reproductivas en *A. persimilis* y en estos se considera exclusivamente a la población de Salinas Grandes de Hidalgo (Rep. Argentina), utilizada como población de referencia de la especie (Browne *et al.*, 1984; Browne & Wanigasekera, 2000)

Los experimentos que se muestran a continuación tienen como objetivo determinar el efecto de criar animales pertenecientes a la población de *A. persimilis* de la laguna Colorada Chica en medios de diferente concentración salina y de someter a las larvas nauplio a *shocks* salinos, sobre el rendimiento reproductivo y la longevidad.

4.3.1- Efecto de un *shock* salino o un cambio gradual de salinidad en los primeros estadios larvales, medido en el rendimiento reproductivo de las hembras adultas.

Se analizaron las diferencias en las variables reproductivas registradas en hembras adultas, cuando las mismas fueron criadas en diferentes condiciones experimentales. Por un lado, larvas nauplio fueron sometidas a una aclimatación gradual desde la salinidad de eclosión (15 g l^{-1}) hasta la salinidad final de cría, y por otro, fueron sometidas a un pasaje brusco desde la salinidad de eclosión hasta la de cría. El mismo diseño experimental se aplicó separadamente para dos salinidades finales de cría (90 y 150 g l^{-1}).

Metodología

25 larvas nauplio de 24-48 hs fueron colocadas en 12 recipientes de cría de 300 ml a una densidad de 1 individuo/ 10 ml y sometidas a 2 tratamientos alternativos:

- ❖ Un pasaje gradual (“aclimatación”) desde la salinidad de eclosión (15 g l^{-1}) hasta la salinidad de cría (90 ó 150 g l^{-1}).
- ❖ Un pasaje brusco (“*shock*”) desde la salinidad de eclosión hasta la salinidad de cría (90 ó 150 g l^{-1}).

Salinidad final a 90 g l^{-1}

En el tratamiento “aclimatación”, la salinidad del medio fue aumentada gradualmente según el siguiente cronograma hasta alcanzar la salinidad final de 90 g l^{-1} :

Eclosión	1 ^{er} día	2 ^{do} día	3 ^{er} día
15 g l^{-1}	40 g l^{-1}	65 g l^{-1}	90 g l^{-1}

En el tratamiento “*shock* salino”, se produjo un cambio brusco desde la salinidad de eclosión hasta la salinidad final:

Eclosión	1 ^{er} día	2 ^{do} día	3 ^{er} día
15 g l^{-1}	90 g l^{-1}	90 g l^{-1}	90 g l^{-1}

Salinidad final de cría 150 g l⁻¹

En el tratamiento “aclimatación”, la salinidad del medio fue aumentada gradualmente según el siguiente cronograma, hasta alcanzar la salinidad final de 150 g l⁻¹:

Eclosión	1 ^{er} día	2 ^{do} día	3 ^{er} día	4 ^{to} día	5 ^{to} día
15 g l ⁻¹	40 g l ⁻¹	65 g l ⁻¹	90 g l ⁻¹	120 g l ⁻¹	150 g l ⁻¹

En el tratamiento “*shock* salino”, se produjo un cambio brusco desde la salinidad de eclosión hasta la salinidad final:

Eclosión	1 ^{er} día	2 ^{do} día	3 ^{er} día	4 ^{to} día	5 ^{to} día
15 g l ⁻¹	150 g l ⁻¹	150 g l ⁻¹	150 g l ⁻¹	150 g l ⁻¹	150 g l ⁻¹

Los demás parámetros experimentales de los cultivos (temperatura, densidad, iluminación, alimentación, etc.) fueron fijados en los mismos valores utilizados para las cría de los animales (ver punto 3.4 Materiales y Métodos).

Una vez alcanzada la madurez sexual de los animales criados en las diferentes condiciones experimentales, parejas de hembras y machos fueron separadas y colocadas en recipientes individuales, conteniendo 20 ml de medio de cultivo. Todas las parejas estudiadas fueron evaluadas diariamente registrándose, la presencia y tipo de puestas y la muerte del macho o la hembra. Los registros continuaron a lo largo de la vida de la hembra y los machos encontrados muertos fueron reemplazados por machos de la misma edad. Los quistes o larvas encontrados en los recipientes fueron cuidadosamente separados con pipeta “pasteur” y contados. Sobre la base de todos los datos registrados se calcularon las siguientes variables reproductivas y del ciclo ontogenético, que permiten poner a prueba las diferencias en el rendimiento reproductivo de las hembras adultas:

- Longevidad de las hembras
- Longevidad de los machos
- Período pre-reproductivo
- Período reproductivo

- Tiempo transcurrido entre las sucesivas puestas
- Edad del 1er amplexo
- Cantidad de descendientes por puesta
- Cantidad de descendientes por hembra
- Cantidad de puestas por hembra
- % de hembras ovíparas puras
- % de hembras mixtas

Siguiendo el criterio de Browne *et al.* (1984), el período pre-reproductivo fue considerado como el tiempo que transcurre desde el día de la eclosión hasta el día en que se produce la primera puesta. A diferencia de este autor, el período reproductivo fue considerado desde el día de la primera puesta hasta que ocurre la muerte y no hasta el momento en que se produce la última puesta. Este criterio fue utilizado porque muchas hembras mueren al día siguiente de producir su última puesta y en algunos casos, mueren reteniendo una parte de la última puesta en el ovisaco.

Los resultados fueron puestos a prueba utilizando el análisis estadístico de T para dos muestras ("Shock salino" Vs. "Aclimatación gradual") o la prueba no paramétrica de "Man Whitney" cuando se detectaron problemas en la normalidad de los datos (Sokal & Rohlf, 1981). Las dos experiencias a las salinidades finales de cría de 90 y 150 g l⁻¹ fueron realizadas por separado, por lo tanto, los resultados de cada una de ellas son puestos a prueba de manera independiente. Todas las pruebas estadísticas fueron realizadas utilizando el programa *STATISTICA* versión 5.0. Es importante destacar que el objetivo de este diseño experimental es probar la influencia de los tratamientos "Aclimatación gradual" Vs. "Shock salino". No debe confundirse el objetivo tratando de comparar las salinidades de cría de 90 g l⁻¹ contra las de 150 g l⁻¹.

Resultados

Las tablas 15 y 16 resumen los resultados obtenidos al registrar las variables reproductivas en los animales sometidos a los tratamientos de "Aumento gradual de salinidad" Vs. "Shock de salinidad" en las dos experiencias realizadas separadamente a

las concentraciones salinas finales de 90 g l⁻¹ y 150 g l⁻¹. Se colocaron los valores medios junto con los desvíos estándar y el número de ejemplares analizados en cada tratamiento.

Cuando se realizan las comparaciones estadísticas de los valores medios, no se encuentran diferencias significativas entre los tratamientos, para ninguna de las variables registradas. Esto puede verse en los altos valores que presenta la columna "p-valor", indicando la falta de diferencias entre los promedios analizados.

Variables	Tratamientos		p- valor
	Shock salino 90 g l ⁻¹	Aclimatación gradual 90 g l ⁻¹	
Longevidad de machos (días)	35.6 ± 14.1 (n= 12)	32.42 ± 7.6 (n= 12)	0.50
Longevidad de hembras (días)	38.6 ± 16.7 (n= 12)	33.5 ± 15.5 (n= 12)	0.42
Período pre-reproductivo (días)	17.7 ± 2.5 (n= 12)	16.8 ± 1.4 (n= 12)	0.34
Período reproductivo (días)	20.9 ± 15.7 (n= 12)	19.6 ± 14.5 (n= 10)	0.84
Tiempo entre puestas (días)	4.4 ± 1.6 (n= 52)	4.7 ± 1.7 (n= 39)	0.85
Total de puestas por hembra	5.2 ± 3.4 (n= 12)	4.9 ± 3.2 (n= 10)	0.81
Cantidad de descendientes por puesta	22.6 ± 12.9 (n= 61)	21.8 ± 12.3 (n= 50)	0.76
Total de descendientes por hembra	118.4 ± 96.1 (n= 12)	107.1 ± 91.1 (n= 10)	0.78
Edad al primer amplexo (días)	9.9 ± 0.6 (n= 12)	10.3 ± 1.2 (n= 10)	0.45
% de hembras ovíparas puras	83% (n= 12)	80% (n= 10)	
% de hembras mixtas	17% (n= 12)	20% (n= 10)	---

Tabla 15. Variables reproductivas y del ciclo ontogenético registradas en hembras sometidas a los tratamientos de aclimatación gradual y *shock* salino a una salinidad final de cría de 90 g l⁻¹. Se muestran los valores medios y los desvíos estándar. Se agrega la medida de longevidad de los machos.

Variables	Tratamientos		p- valor
	<i>Shock</i> salino 150 g l ⁻¹	Aclimatación gradual 150 g l ⁻¹	
Longevidad de machos (días)	46.6 ± 9.2 (n= 12)	50.1 ± 14.5 (n= 10)	0.50
Longevidad de hembras (días)	46.7 ± 15.3 (n= 12)	53.4 ± 11.9 (n= 10)	0.27
Período pre-reproductivo (días)	20.1 ± 5.3 (n= 10)	21.8 ± 4.1 (n= 10)	0.43
Período reproductivo (días)	31.5 ± 9.2 (n= 10)	31.6 ± 12.5 (n= 10)	0.98
Tiempo entre puestas (días)	8.4 ± 5.3 (n= 16)	7.7 ± 4.1 (n= 27)	0.46
Total de puestas por hembra	2.6 ± 1.3 (n= 10)	3.7 ± 1.5 (n= 10)	0.10
Cantidad de descendientes por puesta	13.1 ± 7.4 (n= 10)	14.3 ± 6.8 (n= 10)	0.86
Total de descendientes por hembra	33.8 ± 18.9 (n= 26)	52.1 ± 23.5 (n= 37)	0.07
Edad al primer amplexo (días)	13.6 ± 2.1 (n= 12)	15.3 ± 1.6 (n= 10)	0.51
% de hembras ovíparas puras	90% (n= 10)	90% (n= 10)	
% de hembras mixtas	10% (n= 10)	10% (n= 10)	

Tabla 16. Variables reproductivas y del ciclo ontogenético registradas en hembras sometidas a los tratamientos de aclimatación gradual y *shock* salino a una salinidad final de cría de 150 g l⁻¹. Se muestran los valores medios y los desvíos estándar. Se agrega la medida de longevidad de los machos

En los dos experimentos no se observan diferencias en el porcentaje de camadas liberadas al medio en forma de quistes o como larvas vivas entre los dos tratamientos, y a ninguna de las dos salinidades finales. En las dos concentraciones salinas finales analizadas, así como en los dos tratamientos, existe un porcentaje mayor de camadas ovíparas que ovovivíparas y no se encontraron hembras ovovivíparas puras (Tablas 15 y 16).

La figura 27 muestra el promedio de los descendientes obtenidos para cada puesta y el momento en que la cantidad de hembras muestreadas desciende a un valor menor de 50% de las que comenzaron la experiencia. Al comienzo de la experiencia (líneas sólidas) realizada para analizar la concentración salina final de 90 g l^{-1} los tratamientos *shock* y gradual no difieren en el patrón que presentan.

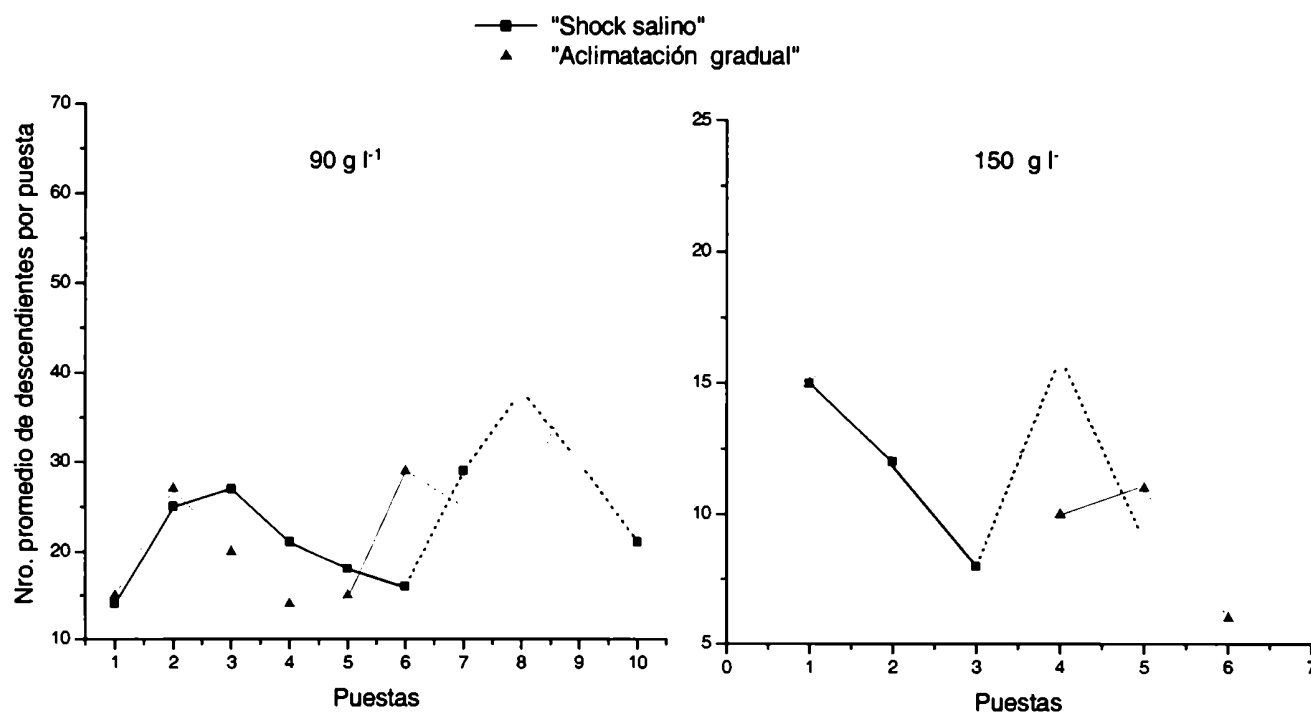


Figura 27. Comparación del número promedio de descendientes por puesta entre hembras sometidas a los tratamientos de "Aclimatación gradual" y "Shock de salinidad" para las concentraciones salinas finales de 90 g l^{-1} y 150 g l^{-1} . Las líneas sólidas indican que hasta esa puesta, más de 50% de la muestra permanece viva; las líneas punteadas, que menos de 50% de la muestra permanece viva.

En las puestas 1 y 2 las dos curvas son casi coincidentes y aún cuando en la tercer y sexta puesta los tratamientos se cruzan, la diferencia es de unos pocos individuos. Hacia el final de la experiencia (líneas punteadas) los valores obtenidos en el tratamiento "Aumento gradual de la salinidad" (aclimatación) son mayores y la tendencia es positiva. Sin embargo, es importante destacar que a estos promedios (puestas 9 y 10) sólo contribuyen dos hembras en los dos tratamientos.

En la experiencia realizada a salinidad final de 150 g l⁻¹ tampoco se observan diferencias en las tendencias generales de ambos tratamientos. Al principio se observa una pequeña diferencia en el patrón de distribución de la descendencia. Aquí las hembras sometidas a un aumento gradual de la salinidad pondrían más descendientes en las puestas 2 y 3. Además serían un poco más longevas, porque el porcentaje de supervivencia es menor a 50% en la quinta puesta (cuando cambian las líneas sólidas por las punteadas), mientras que en el tratamiento *shock* salino este cambio se produce en la tercera puesta. Estas mínimas diferencias pueden verse en los valores medios que se presentan en la tabla 16, pero no son estadísticamente significativas.

Discusión y conclusiones

Salvo recientes estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio (Arbasetti, 2002), existen pocos trabajos donde se compare el efecto de someter a los animales, en el período naupliar a un aumento gradual o brusco de la salinidad, desde la salinidad de eclosión hasta la salinidad final del medio de cría. En estos trabajos las comparaciones son realizadas analizando la supervivencia de las larvas, pero no se realizan observaciones sobre el rendimiento reproductivo de las hembras adultas (Dana *et al.*, 1993; Triantaphyllidis, *et al.*, 1995). Sería de esperar que la supervivencia fuera mayor en los animales que no sufren un cambio repentino de salinidad, debido a que podrían regular más lentamente ante los cambios graduales del medio. Sin embargo, en las experiencias realizadas por Dana *et al.* (1993) en *A. monica* la supervivencia resulta mayor en los animales que son transferidos en estados naupliar directamente a una salinidad elevada en contraste con los que son aclimatados durante toda su vida. Los beneficios de la aclimatación podrían estar contrarrestados por los efectos

acumulativos del aumento concurrente de la salinidad durante toda la vida (Dana *et al.*, 1993). Quizás, la aclimatación a la salinidad tenga una influencia positiva en algunas especies de *Artemia*, como se observa en *A. franciscana* de la bahía de San Francisco, que muestra una mejor adaptación a altas salinidades cuando el aumento se produce gradualmente. Sin embargo este efecto no se observa en la población de Tangu de *A. parthenogenetica* (Triantaphyllidis, *et al.*, 1995).

Los resultados obtenidos previamente por nuestro laboratorio no muestran diferencias significativas en la supervivencia ni en la longevidad de la población de *A. persimilis* de Colorada Chica entre los tratamientos súbito y gradual a salinidades finales de 90 y 150 g l⁻¹. En nuestros resultados tampoco se evidencia para esta misma población un beneficio en la aclimatación con respecto a un *shock* salino temprano (en nauplios de 24-48 hs), dado que no se registraron diferencias significativas entre los tratamientos en ninguna de las variables reproductivas y del ciclo de vida (longevidad en ambos sexos) registradas a ninguna de las 2 salinidades finales consideradas (Tablas 15 y 16).

Los resultados obtenidos nos permiten concluir que para *A. persimilis* de la laguna Colorada Chica no existiría una influencia en la longevidad ni en el rendimiento reproductivo de las hembras adultas, al someter a las larvas a un *shock* salino al día siguiente del nacimiento. Al parecer, los animales no reaccionan al cambio brusco de salinidad del medio, en los primeros estadios larvales, modificando sus patrones reproductivos luego de alcanzar el estado adulto.

4.3.2- Efecto de diferentes *shocks* salinos sobre el rendimiento reproductivo de las hembras adultas.

El diseño experimental que se describe a continuación nos permite probar estadísticamente las diferencias en el rendimiento reproductivo de las hembras adultas criadas a diferentes concentraciones salinas. Teniendo en cuenta los resultados del experimento anterior, en el cual no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos salinos graduales y bruscos sobre estadios naupliares, hasta 2 salinidades finales diferentes, y considerando la gran dispersión observada en las variables reproductivas, en el presente experimento se plantea:

- a) someter a larvas de 24-48 hs a un pasaje brusco desde la salinidad de eclosión hasta 3 salinidades finales: 40, 90 y 150 g l⁻¹.
- b) repetir toda la experiencia 3 veces consecutivas a lo largo de un período de siete meses, manteniendo las mismas condiciones experimentales.

Metodología

25 larvas nauplio de 24-48 hs fueron colocadas en 12 recipientes de cría de 300 ml a una densidad de 1 individuo/ 10 ml y sometidas a tres tratamientos alternativos.

- ❖ Un pasaje brusco desde la salinidad de eclosión (15 g l⁻¹) hasta una salinidad de cría de 40 g l⁻¹.
- ❖ Un pasaje brusco desde la salinidad de eclosión (15 g l⁻¹) hasta una salinidad de cría de 90 g l⁻¹.
- ❖ Un pasaje brusco desde la salinidad de eclosión (15 g l⁻¹) hasta una salinidad de cría de 150 g l⁻¹.

Cuando los animales criados en los diferentes tratamientos alcanzaron la madurez sexual, parejas de hembras y machos fueron separadas y colocadas en recipientes individuales, conteniendo 20 ml de medio de cultivo correspondiente. Todas las parejas estudiadas fueron evaluadas diariamente. Los registros continuaron todo a lo largo de

la vida de la hembra y los machos encontrados muertos fueron reemplazados por machos de la misma edad. Los quistes o larvas encontrados en los recipientes fueron cuidadosamente separados con pipeta "pasteur" y contados.

Para medir el efecto de diferentes concentraciones salinas sobre el rendimiento reproductivo de las hembras adultas se calcularon las mismas variables reproductivas y del ciclo ontogenético utilizadas en la experiencia 4.3.1 y se utilizaron los mismos criterios para medir los períodos reproductivos (Pág.114).

Manteniendo las mismas condiciones experimentales (tres concentraciones salinas, aplicadas bruscamente desde el día del nacimiento de las larvas), la experiencia se repitió tres veces (repeticiones) a lo largo de un período de siete meses.

Cada repetición fue probada estadísticamente aplicando, en forma individual, un análisis de la varianza paramétrico (ANOVA) o la prueba de Kruskal Wallis (Zar, 1999). Cuando se detectaron diferencias entre los tratamientos, se aplicó una prueba para identificar los grupos homogéneos definidos en función a las diferencias o similitudes que presentan los valores medios (Games & Howell, 1976).

Para probar estadísticamente las diferencias entre las tres repeticiones del experimento y calcular la interacción entre las repeticiones y los tratamientos salinos, se aplicó a todos los resultados en conjunto, un modelo de ANOVA mixto con dos factores (Sokal & Rohlf, 1995). Los diferentes tratamientos salinos fueron tomados como un factor fijo y las tres repeticiones fueron consideradas como un factor aleatorio.

Se calcularon los coeficientes de correlación entre las variables reproductivas y la longevidad utilizando el método de *Pearson correlations* (Sokal & Rohlf, 1995). Sin embargo, cuando no se encontró homogeneidad en las varianzas se utilizó el método de *Sperman Rank Correlations* para los pares que resultaron significativos con el método paramétrico. Todas las pruebas estadísticas fueron realizadas utilizando el programa *STATISTICA* versión 5.0.

La representación de los valores de longevidad en hembras y machos, se realizó mediante un gráfico de cajas o *box-plot*. En estos gráficos, la dispersión que presentan los resultados esta representada por el tamaño de las cajas, dado que los límites inferior y superior de las mismas están determinados por restar y sumar al promedio el

valor del error estándar. También, se encuentra indicada la dispersión producida al sumar y restar al promedio el valor del desvío estándar (líneas que se prolongan verticalmente en cada caja).

Resultados

Las tablas 17 a 19 reportan los valores medios y los desvíos estándar de las variables reproductivas y del ciclo ontogenético tomadas en tres condiciones de salinidad diferentes en cada una de las tres repeticiones del experimento. Como las variables reproductivas sólo pueden ser calculadas en las hembras que pusieron al menos una puesta durante toda su vida, las diversas variables registradas en las tablas tienen un número diferente de datos que contribuyen al valor medio. De esta forma cuando se suman los promedios (en días) en las variables período pre-reproductivo y reproductivo, no se llega a obtener el mismo valor que el promedio de la longevidad, porque a estos promedios contribuyen un número diferente de animales (ver en cada medición el “n” correspondiente). Las comparaciones realizadas dentro de cada repetición, con la prueba de Kruskal Wallis, revelan la presencia de diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos en diferentes variables registradas. Las variables que presentan diferencias significativas están indicadas con un asterisco dentro de las tablas 17 a 19. Los resultados obtenidos a partir del análisis a posteriori de la prueba de Kruskal Wallis, realizado sobre las variables que presentaron diferencias significativas, se indican en la tabla 20 (Games & Howell, 1976). Este análisis nos brinda la posibilidad de ver cómo están formados los grupos homogéneos. En algunos casos, aún cuando existen diferencias significativas ($p < 0.05$) los grupos homogéneos se solapan y como consecuencia, también se solapan las diferencias entre los tratamientos. Esto ocurre, por ejemplo, en la variable “Longevidad de machos” en la experiencia 1, aquí los tratamientos 40 g l⁻¹ y 90 g l⁻¹ forman un grupo, pero el otro grupo lo forman 90 g l⁻¹ y 150 g l⁻¹, por lo tanto las diferencias se solapan y sólo resultan realmente diferentes entre sí los tratamientos 40 g l⁻¹ y 150 g l⁻¹ formando parte de un gradiente.

Por el contrario, en la variable "Período pre-reproductivo" (repeticiones 2 y 3), el tratamiento 90 g l⁻¹ está solo y separado de 40 g l⁻¹ y 150 g l⁻¹ que forman un grupo homogéneo.

Variables (Primera repetición)	Tratamientos (Concentraciones salinas)		
	40 g l ⁻¹	90 g l ⁻¹	150 g l ⁻¹
Longevidad de machos (días) *	70.5 ± 32.7 (n= 12)	54.5 ± 23.3 (n= 10)	31.2 ± 16.8 (n= 5)
Longevidad de hembras (días)	42.6 ± 19.9 (n= 12)	45.3 ± 15.2 (n= 10)	39.6 ± 19.1 (n= 5)
Período pre-reproductivo (días)	27.6 ± 12.8 (n= 11)	21.7 ± 1.2 (n= 10)	22.2 ± 2.3 (n= 5)
Período reproductivo (días)	17.1 ± 15.6 (n= 11)	23.6 ± 15.1 (n= 10)	16.6 ± 21.1 (n= 5)
Tiempo entre puestas (días)	7.7 ± 5.3 (n= 10)	7.7 ± 4.1 (n= 24)	9.5 ± 2.1 (n= 2)
Total de puestas por hembra	2.1 ± 0.8 (n= 11)	3.7 ± 2.7 (n= 10)	1.4 ± 0.9 (n= 5)
Cantidad de descendientes por puesta	14.2 ± 9.2 (n= 23)	16.1 ± 6.7 (n= 35)	15.1 ± 8.8 (n= 7)
Total de descendientes por hembra	29.7 ± 26.1 (n= 11)	59.7 ± 44.8 (n= 10)	21.1 ± 6.2 (n= 5)
% de hembras ovíparas puras	82%	100%	100%
% de hembras mixtas	18%		

Tabla 17. Variables reproductivas y del ciclo de vida registradas en machos y hembras sometidos a las salinidades de 40, 90 y 150 g l⁻¹. Se muestran los valores medios y los desvíos estándar. El asterisco señala la presencia de diferencias significativas entre los tratamientos (Kruskal Wallis p <0.05)

Variables (Segunda repetición)	Tratamientos (Concentraciones salinas)		
	40 g l ⁻¹	90 g l ⁻¹	150 g l ⁻¹
Longevidad de machos (días) *	34.2 ± 9.1 (n= 9)	25.5 ± 4.1 (n= 12)	56.5 ± 9.30 (n= 10)
Longevidad de hembras (días) *	27.1 ± 7.2 (n= 11)	26.5 ± 8.3 (n= 12)	39.2 ± 12.6 (n= 10)
Período pre-reproductivo (días) *	22.5 ± 2.2 (n= 9)	18.4 ± 2.5 (n= 11)	22.5 ± 3.1 (n= 9)
Período reproductivo (días) *	7.1 ± 4.1 (n= 9)	8.9 ± 7.6 (n= 11)	18.5 ± 9.9 (n= 9)
Tiempo entre puestas (días)	4.8 ± 2.7 (n= 9)	3.5 ± 1.6 (n= 20)	4.4 ± 1.7 (n= 32)
Total de puestas por hembra *	2.1 ± 0.9 (n= 9)	2.9 ± 2.2 (n= 11)	4.7 ± 2.4 (n= 9)
Cantidad de descendientes por puesta	16.3 ± 7.2 (n= 16)	24.6 ± 13.7 (n= 31)	18.1 ± 13.4 (n= 40)
Total de descendientes por hembra	33.4 ± 22.1 (n= 9)	71.7 ± 76.8 (n= 11)	84.5 ± 56.1 (n= 9)
% de hembras ovíparas puras	100%	100%	89%
% de hembras mixtas	---		11%

Tabla 18. Variables reproductivas y del ciclo de vida registradas en machos y hembras sometidos a las salinidades de 40, 90 y 150 g l⁻¹. Se muestran los valores medios y los desvíos estándar. Los asteriscos señalan la presencia de diferencias significativas entre los tratamientos (Kruskal Wallis p <0.05)

Variables (Tercera repetición)	Tratamientos (Concentraciones salinas)		
	40 g l ⁻¹	90 g l ⁻¹	150 g l ⁻¹
Longevidad de machos (días)	36.9 ± 3.7 (n= 10)	50.3 ± 22.9 (n= 12)	33.5 ± 9.1 (n= 10)
Longevidad de hembras (días)	27.1 ± 7.6 (n= 10)	48.7 ± 35.4 (n= 12)	38.6 ± 17.5 (n= 10)
Período pre-reproductivo (días) *	21.8 ± 4.3 (n= 6)	15.4 ± 1.2 (n= 12)	26.1 ± 14.7 (n=7)
Período reproductivo (días)	9.1 ± 7.3 (n= 6)	33.2 ± 34.9 (n= 12)	20.8 ± 13.9 (n= 7)
Tiempo entre puestas (días)	5.1 ± 1.7 (n= 5)	6.4 ± 3.6 (n= 58)	6.2 ± 3.5 (n= 17)
Total de puestas por hembra	1.8 ± 1.2 (n= 6)	5.8 ± 5.1 (n= 12)	3.4 ± 1.8 (n= 7)
Cantidad de descendientes por puesta	13.5 ± 7.3 (n= 11)	15.3 ± 6.4 (n= 70)	11.9 ± 4.8 (n= 22)
Total de descendientes por hembra	24.8 ± 13.5 (n= 6)	89.2 ± 79.2 (n= 12)	37.3 ± 27.4 (n= 7)
% de hembras ovíparas puras	100%	92%	100%
% de hembras mixtas		8%	

Tabla 19. Variables reproductivas y del ciclo de vida registradas en machos y hembras sometidos a las salinidades de 40, 90 y 150 g l⁻¹. Se muestran los valores medios y los desvíos estándar. El asterisco señala la presencia de diferencias significativas entre los tratamientos (Kruskal Wallis p <0.05)

Variables (Repetición 1)	Tratamientos	Valor medio	Grupos homogéneos
Longevidad de machos	40 g l ⁻¹	70.5	
	90 g l ⁻¹	54.5	
	150 g l ⁻¹	31.2	
Variables (Repetición 2)	Tratamientos	Valor medio	Grupos homogéneos
Longevidad de machos	150 g l ⁻¹	56.5	
	40 g l ⁻¹	34.2	
	90 g l ⁻¹	25.5	
Longevidad de hembras	150 g l ⁻¹	39.2	
	40 g l ⁻¹	27.1	
	90 g l ⁻¹	26.5	
Período pre-reproductivo	150 g l ⁻¹	22.6	
	40 g l ⁻¹	22.5	
	90 g l ⁻¹	18.4	
Período reproductivo	150 g l ⁻¹	18.6	
	90 g l ⁻¹	8.9	
	40 g l ⁻¹	7.1	
Total de puestas por hembras	150 g l ⁻¹	4.7	
	90 g l ⁻¹	2.9	
	40 g l ⁻¹	2.1	
Variables (Repetición 3)	Tratamientos	Valor medio	Grupos homogéneos
Período pre-reproductivo	150 g l ⁻¹	26.1	
	40 g l ⁻¹	21.8	
	90 g l ⁻¹	15.4	

Tabla 20. Comparación de los valores medios de las variables que presentan diferencias significativas en las tres experiencias de *shocks* salinos. Las líneas verticales unen tratamientos en los cuales las diferencias entre los valores medios no son significativas (grupos homogéneos). Es importante destacar que el orden de los tratamientos no es el mismo en todas las variables analizadas.

En la figura 28 están representados los componentes del ciclo de vida de las hembras (período pre-reproductivo y reproductivo) en las tres experiencias. Puede verse que las hembras criadas a 90 g l⁻¹ comienzan a reproducirse siempre antes que las pertenecientes a otros tratamientos, aun cuando en la experiencia 2 los valores de longevidad de las hembras de 90 g l⁻¹ son muy bajos.

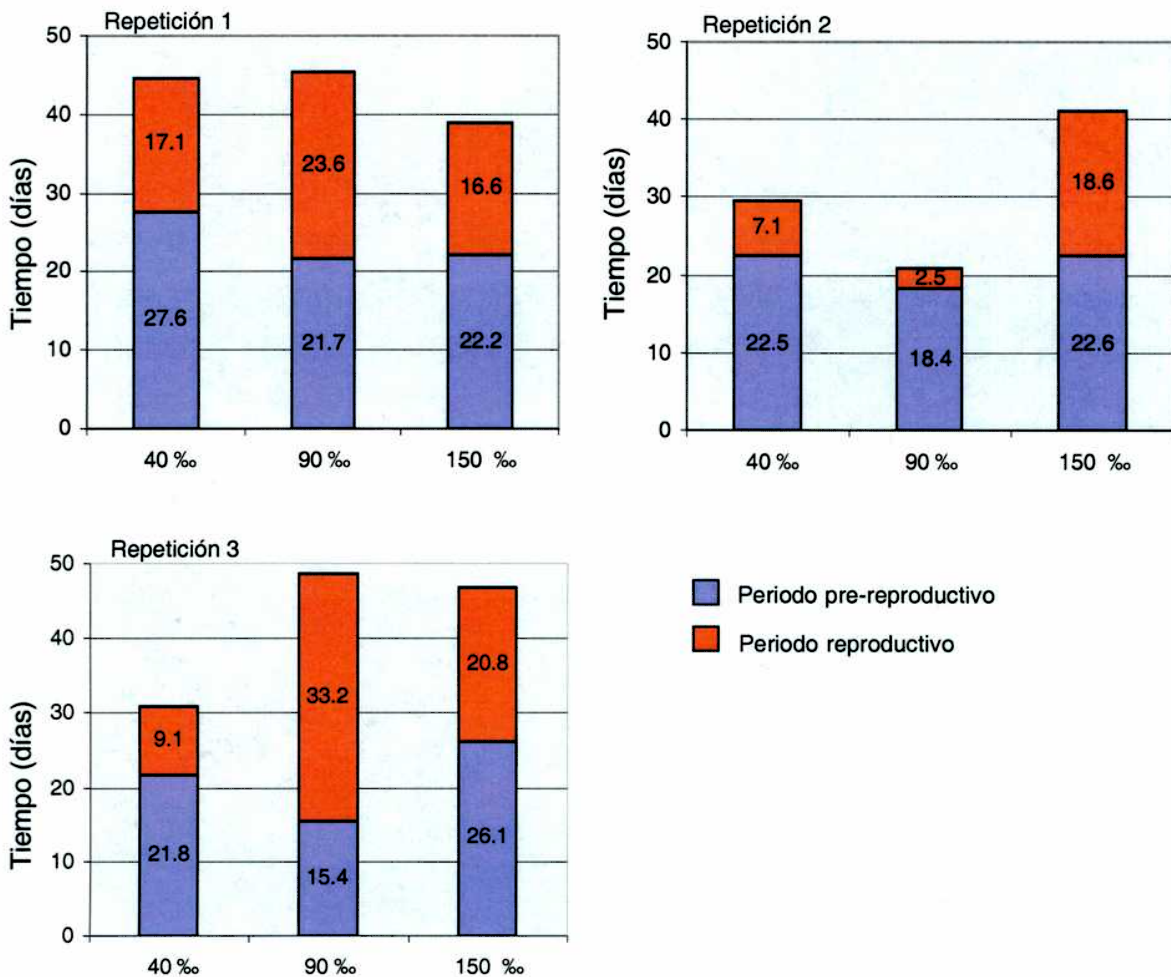


Figura 28. Componentes del ciclo de vida de las hembras de *A. persimilis* en diferentes condiciones de salinidad. Duración (días) de las etapas pre-reproductiva y reproductiva dentro del ciclo de vida. Se representan los valores medios para cada período dentro de los tratamientos en las tres repeticiones.

La figura 29 muestra el número de descendientes promedio para cada puesta en los tres tratamientos salinos, discriminados para cada repetición de la experiencia. En estos gráficos, las líneas sólidas que unen puntos dentro de cada grupo, indican que más de 50% de las hembras que comenzaron la experiencia permanecen aún con vida. Las líneas punteadas indican que el porcentaje de hembras vivas, es menor a 50% de las que comenzaron la experiencia. Al comparar gráficamente el número de descendientes (en promedio) liberados al medio en cada puesta, podemos ver que en las repeticiones 1 y 3 las hembras criadas en 90 g l⁻¹ tienen una mayor cantidad de puestas que el resto de los tratamientos. En la repetición 2, aun cuando existen diferencias significativas en la variable "Total de puestas por hembra", estas diferencias separan al tratamiento 40 g l⁻¹ de 150 g l⁻¹ pero no existe diferencia entre 90 g l⁻¹ y 150 g l⁻¹ (Tabla 20). Esto ocurre porque, a diferencia de lo que se observa en las otras repeticiones, en la repetición 2 las hembras criadas a 150 g l⁻¹ fueron más longevas que las demás.

Todas las experiencias muestran un mayor porcentaje de modalidad reproductiva ovípara y en algunos casos se encontraron hembras con una modalidad mixta, pero en ningún momento se observó la modalidad reproductiva ovovivípara en forma exclusiva. Al analizarse las diferencias entre la longevidad de los machos y las hembras en los distintos tratamientos y experiencias se encontró que, en seis de las nueve situaciones (tres tratamientos x tres repeticiones) los machos vivieron más que las hembras. Sin embargo, esta diferencia sólo resultó estadísticamente significativa (pruebas de "t" o la prueba no paramétrica de Man Whitney) para el tratamiento 40 g l⁻¹ en las repeticiones 1 y 3 y para el tratamiento 150 g l⁻¹ en la repetición 2. En la figura 30 se encuentran los diagramas de cajas realizados con las variables "Longevidad de machos" y "Longevidad de hembras" en las tres concentraciones salinas (tres tratamientos) discriminados para cada repetición del experimento. Allí podemos ver que, en las situaciones donde las diferencias resultaron estadísticamente significativas (tratamiento 40 g l⁻¹ experiencias 1 y 3; tratamiento 150 g l⁻¹ experiencia 2), los límites inferior y superior de las cajas correspondientes a cada sexo, no se solapan.

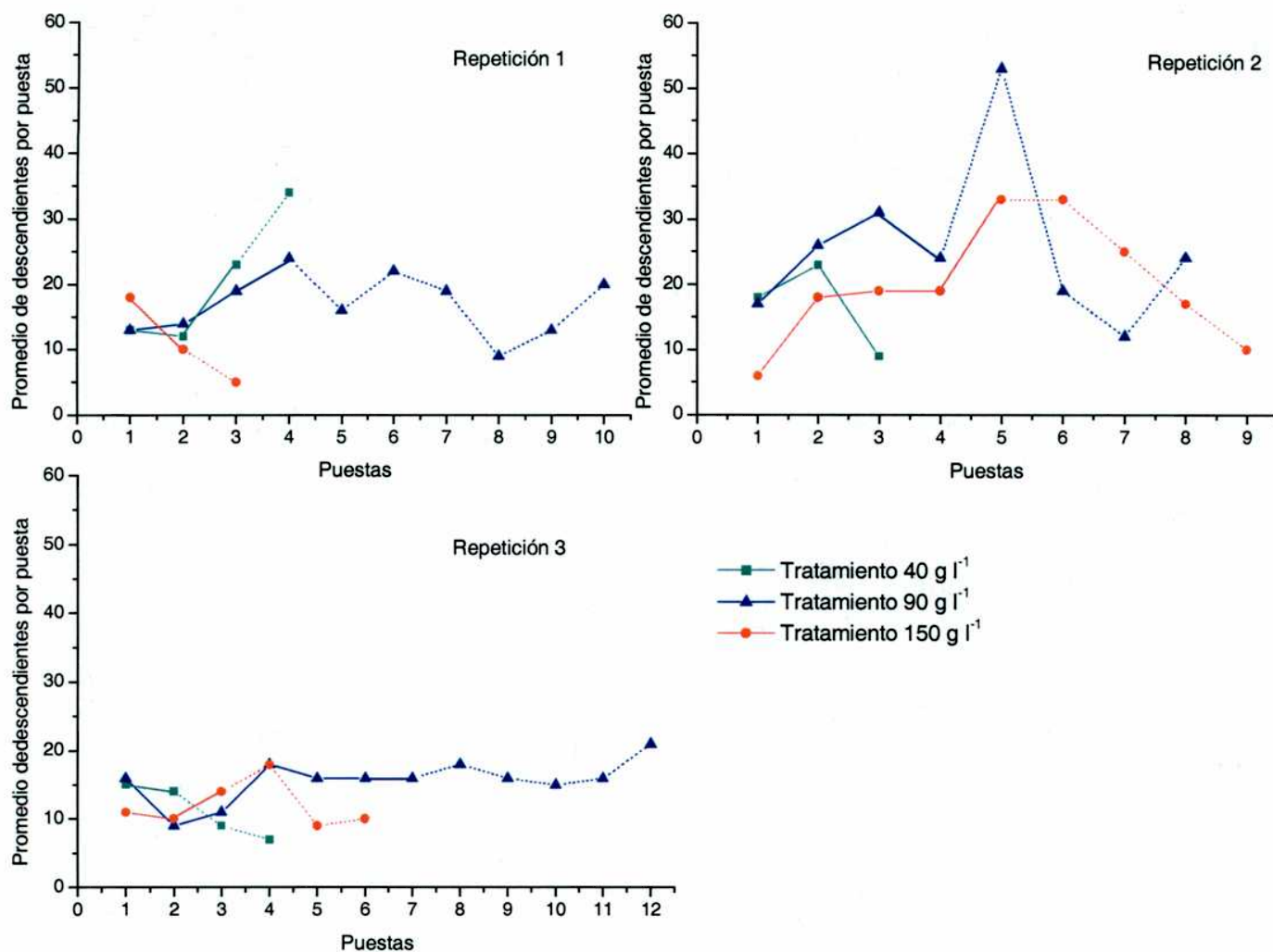


Figura 29. Comparación del número promedio de descendientes en cada puesta en los tratamientos de *shock* salino a las concentraciones de 40 g l⁻¹, 90 g l⁻¹ y 150 g l⁻¹. Las líneas sólidas indican que más de 50% de la muestra permanece con vida, las líneas punteadas que menos de 50% de la muestra permanece con vida al momento de esa puesta

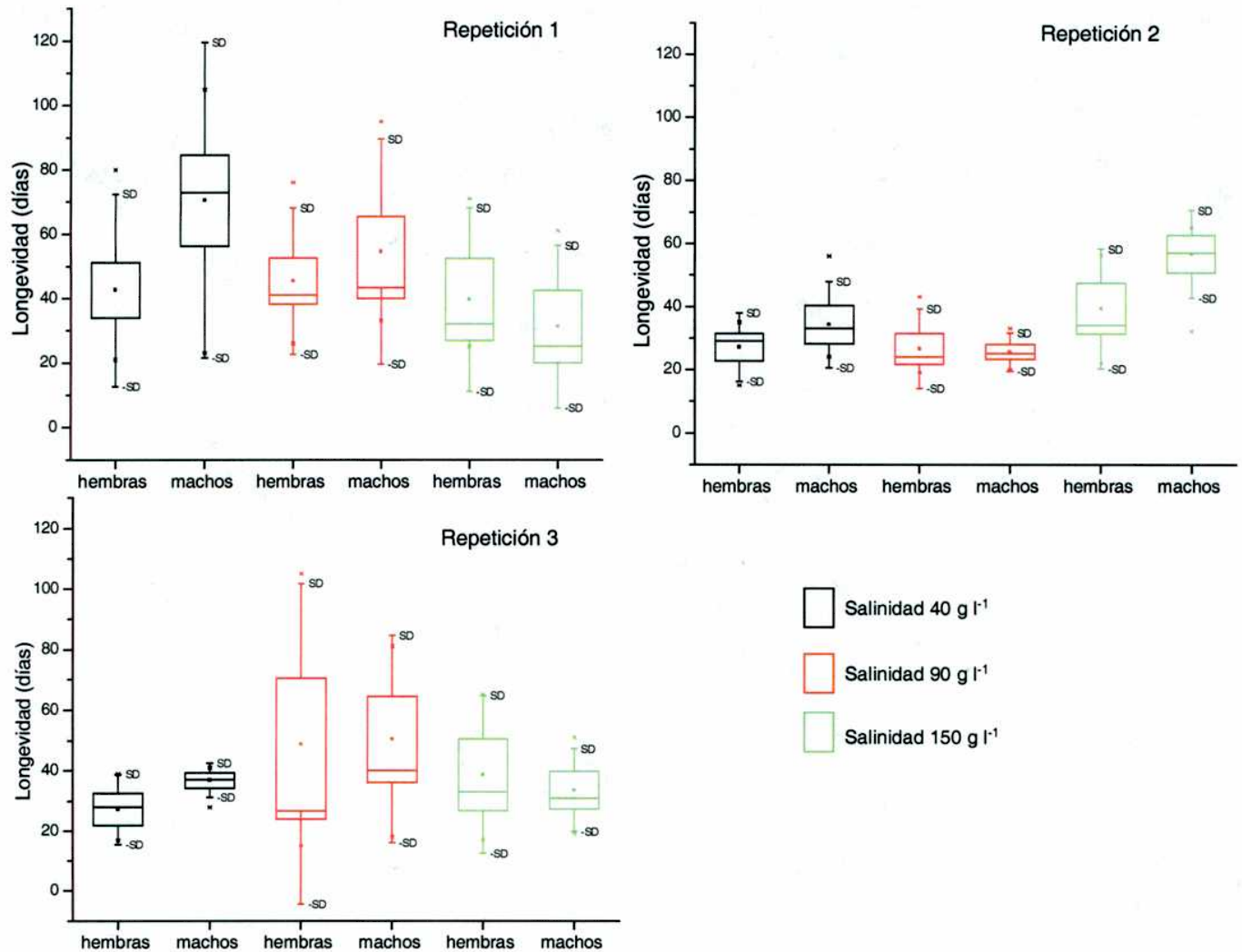


Figura 30. Diagramas de cajas producidos con la variable “Longevidad” en hembras y machos. Están representados los tres tratamientos utilizados en las tres experiencias de *shock* salino. SD = desvío estándar.

Los valores medios y los desvíos estándar de las variables analizadas de manera conjunta (en todas las repeticiones y tratamientos), con el modelo de ANOVA mixto se registran en la tabla 21. De este análisis surge que, la variable "Longevidad de machos" es la única que presenta una interacción significativa ($p < 0.001$) entre los dos factores (tratamiento y repeticiones). La presencia de interacción nos indica que el efecto de los tratamientos no puede analizarse independientemente de las repeticiones. Las variables "Período pre-reproductivo"; "Total de puestas por hembra" y "Total de descendientes por puesta" presentan diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$) y no poseen interacción significativa entre los dos factores analizados, por lo tanto podemos decir que existe una diferencia en los valores medios en función de los tratamientos independientemente de la repetición de que se trate. Las variables "Longevidad de hembras" y "Período reproductivo" no presentan diferencias significativa. Los valores medios de las variables "Longevidad de hembras"; "Período pre-reproductivo"; "Total de puestas por hembra" y "Total de descendientes por hembra" en función de los tratamientos salinos están representados en la figura 31. Puede verse que a excepción de la experiencia 2, el rendimiento reproductivo de las hembras medido en función del número de descendientes y de puestas producidas, es más alto en el tratamiento de *shock* salino de 90 g l⁻¹, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

		Tratamientos (Concentraciones salinas)								
		40 g l ⁻¹			90 g l ⁻¹			150 g l ⁻¹		
		Repeticiones			Repeticiones			Repeticiones		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
Longevidad machos (días)	X	70.50	34.22	36.90	54.50	25.50	50.33	31.20	56.50	33.50
	DS	(32.74)	(9.08)	(3.73)	(23.34)	(4.06)	(22.89)	(16.80)	(9.30)	(9.14)
Longevidad hembras (días)	X	42.58	27.07	27.10	45.30	26.50	48.67	39.60	39.20	38.60
	DS	(19.93)	(7.21)	(7.64)	(15.18)	(8.34)	(35.36)	(19.11)	(12.66)	(17.48)
Período pre-reproductivo (días)	X	27.63	22.55	21.83	21.70	18.36	15.42	22.20	22.55	26.14
	DS	(12.79)	(2.18)	(4.26)	(1.16)	(2.50)	(1.16)	(2.28)	(3.08)	(14.69)
Período reproductivo (días)	X	17.09	7.08	9.06	23.60	8.91	33.25	16.60	18.55	20.86
	DS	(15.63)	(4.12)	(7.32)	(15.13)	(7.58)	(34.88)	(21.06)	(9.93)	(13.99)
Total de puestas por hembra	X	2.09	2.07	1.83	3.70	2.91	5.83	1.40	4.66	3.43
	DS	(0.83)	(0.87)	(1.17)	(2.75)	(2.25)	(5.11)	(0.89)	(2.44)	(1.81)
Total de descendientes por hembra	X	29.73	33.44	24.83	59.70	71.73	89.25	21.01	84.55	37.28
	DS	(26.04)	(22.07)	(13.47)	(44.76)	(76.81)	(79.22)	(6.16)	(56.01)	(27.42)

Tabla 21. Variables reproductivas y del ciclo de vida en las tres experiencias de *shock* salino a las concentraciones de 40, 90 y 150 g l⁻¹. Se muestran los valores medios y los desvíos estándar entre paréntesis.

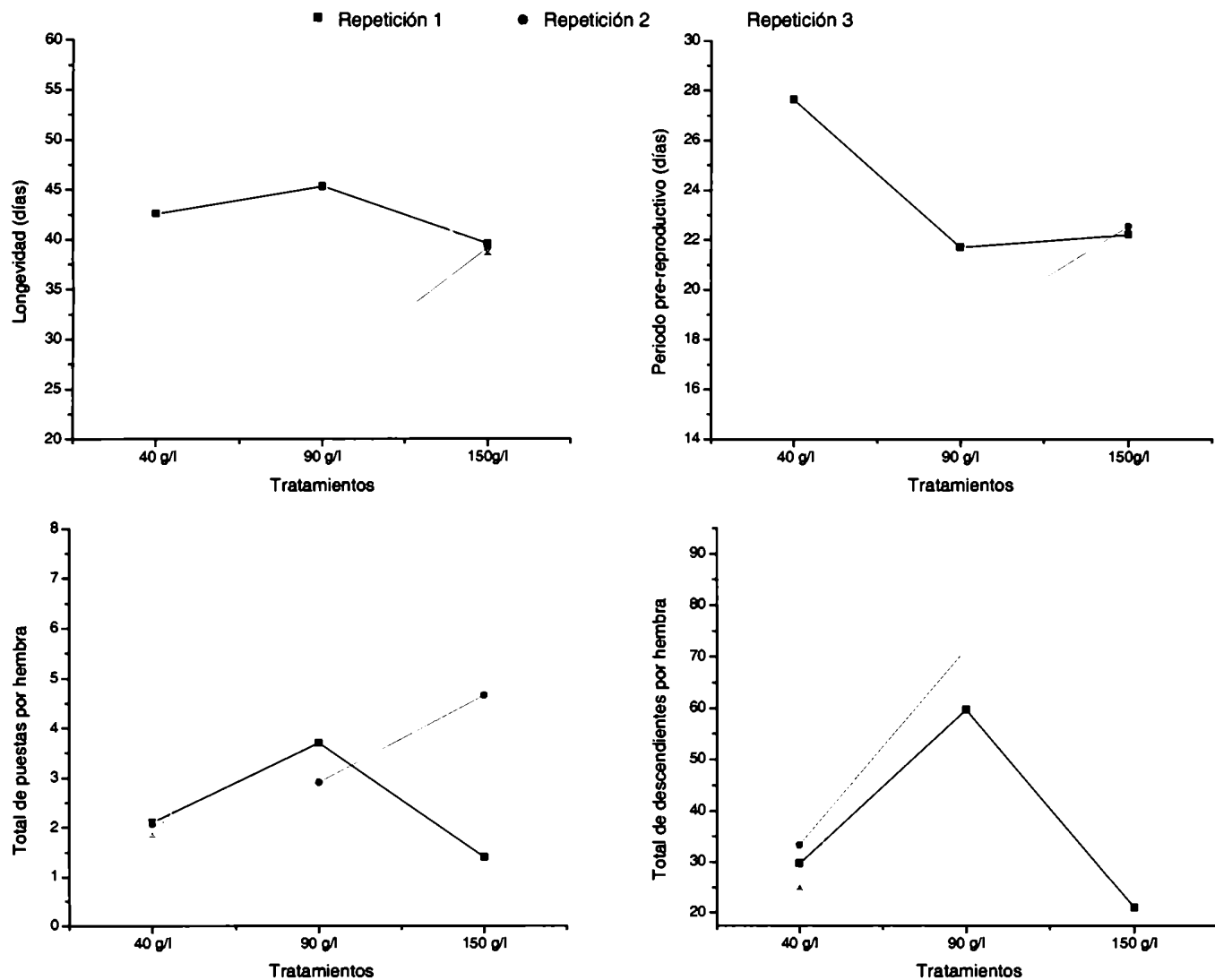


Figura 31. Longevidad de las hembras, Período pre-reproductivo, Total de puestas y Total de descendientes por hembra para las tres repeticiones de la experiencia de *shock* salino en función de los tratamientos. En todos los gráficos están representados los valores medios.

Los valores obtenidos al analizar la correlación entre las variables reproductivas y la longevidad de las hembras están listados en la tabla 22. Se reporta el valor del coeficiente de correlación obtenido junto con el nivel de significación correspondiente. En este tipo de experimentos la relación entre las variables no es de dependencia, por lo tanto, la magnitud de una variable puede cambiar junto con otra, pero no es razonable pensar que exista una variable dependiente y otra independiente. Por este motivo se habla de correlación entre las variables y no de regresión. Podemos ver que la variable "período pre-reproductivo" no está relacionada con ninguna de las demás variables analizadas y que "Longevidad de hembras" esta correlacionada positivamente con las variables que miden el rendimiento reproductivo ("Período reproductivo", "Total de puestas por hembra" y "Total de descendientes por hembra"). Como una consecuencia de la correlación entre las variables podemos ver en la figura 31 que el patrón de las variables "Total de puestas por hembras" y "Total de descendientes por hembra" es similar.

	Longevidad de hembras	Período pre-reproductivo	Período reproductivo	Total de puestas por hembra
Período pre-reproductivo	0.251 ($p>0.05$)			
Período reproductivo	0.924 ($p<0.001$)	-0.136 ($p>0.05$)		
Total de puestas por hembra	0.746 ($p<0.001$)	-0.148 ($p>0.05$)	0.821 ($p<0.001$)	
Total de descendientes por hembra	0.633 ($p<0.001$)	-0.146 ($p>0.05$)	0.705 ($p<0.001$)	0.897 ($p<0.001$)

Tabla 22. Coeficientes de correlación entre las variables reproductivas y la longevidad de las hembras. Entre paréntesis se coloca el p-valor

Discusión y conclusiones

En condiciones naturales cada población de *Artemia* se desarrollaría de manera óptima (mayor crecimiento individual, mayor fecundidad y supervivencia) dentro de cierto intervalo de concentraciones salinas (Wear *et al.*, 1986). Existen discrepancias sobre cual sería el nivel óptimo de salinidad en el desarrollo de *A. persimilis*. Por un lado existiría una mejor adaptación a las salinidades cercanas a los 70 g l⁻¹ reflejado en una mayor supervivencia (Vanhaecke *et al.*, 1984) y por otro lado se desarrollaría bien cuando es criada a una concentración salina de 35 g l⁻¹ medido en relación a un mayor crecimiento individual de los adultos (De los Rios, 2001). Estudios realizados con otras especies de *Artemia*, como por ejemplo *A. monica*, muestran que el tamaño de los individuos criados en diferentes condiciones es menor a medida que aumenta la concentración salina y esta disminución estaría correlacionada con un menor rendimiento reproductivo, dado que a mayor salinidad se observan retrasos en la reproducción, menores tamaños de puesta y mayores intervalos entre las sucesivas puestas (Dana *et al.*, 1993). Esta relación negativa entre el rendimiento reproductivo y el aumento de la salinidad, estaría reflejando una disminución en la cantidad de energía disponible para la reproducción a medida que más energía es necesaria para llevar a cabo procesos homeostáticos. Por lo que se desprende de nuestros resultados, la población de *A. persimilis* de la laguna Colorada Chica presenta un mayor rendimiento reproductivo a una concentración salina de 90 g l⁻¹, medido en función del total de descendientes liberados al medio y del total puestas que pone cada hembra. Al no haberse registrado los tamaños finales de los animales adultos, no podemos concluir si existe una relación entre el rendimiento reproductivo y el crecimiento individual de las hembras.

Al comparar los resultados obtenidos en las tres repeticiones de la experiencia no podemos pasar por alto que, en la segunda repetición las hembras criadas en 90 g l⁻¹ resultaron ser menos longevas en comparación con la misma concentración salina en las demás repeticiones. Además de esto, presentaron una menor cantidad de puestas y menor número total de descendientes por hembra, en comparación con el tratamiento 150 g l⁻¹ (Fig. 31). Sin embargo, las diferencias en el rendimiento reproductivo solo

fueron significativas para la variable “Total de puestas por hembra” (Tabla 20) y en este caso las hembras de 90 g l⁻¹ quedaron formando un grupo homogéneo junto con las de 150 g l⁻¹ que pusieron el máximo de puestas en esa repetición en particular. Como puede verse en las tablas 3 a 5, las variables que se utilizan en este estudio presentan gran dispersión (altos valores en los desvíos estándar). Al analizar trabajos realizados en *Artemia* donde se incluye *A. persimilis* de la población Hidalgo, siempre se observan valores de dispersión altos en todas las variables reproductivas y del ciclo de vida (Browne *et al.*, 1984; Browne & Wanigasekera, 2000). Lo mismo ocurre en otros trabajos donde se analiza el rendimiento reproductivo de diferentes especies de *Artemia* y esto conduce a discrepancias en los resultados obtenidos por diferentes autores al analizar las mismas especies (Triantaphyllidis *et al.*, 1995; Browne & Wanigasekera, 2000). Estas discrepancias en los resultados son explicadas en función a diferencias en las condiciones de cultivo utilizadas o diferencias en la ubicación geográfica de las especies, pero podrían ser el resultado de una gran variabilidad asociada a este tipo de parámetros. Por tal motivo, la repetición de las experiencias permite tener un panorama más claro, sobre la existencia de patrones en el rendimiento reproductivo de una determinada población de *Artemia* en función de la salinidad, mas aun cuando se observan dispersiones tan altas asociadas a los valores medios. Un problema similar surge al sacar conclusiones sobre las diferencias en la longevidad entre machos y hembras. Dado que, diferentes publicaciones de un mismo autor, hacen referencia a este tema de manera contradictoria (Browne, *et al.*, 1984; Browne & Wanigasekera, 2000). Nuestras experiencias indican que los machos serían mas longevos que las hembras, pero no se observa un patrón constante al respecto de la variación de salinidad y las diferencias encontradas no son estadísticamente significativas en todos los casos analizados.

Los patrones que presentan las variables reproductivas de los organismos son usualmente considerados desde un punto de vista evolutivo. Dicho de otra forma, variaciones en características tales como tasa de reproducción, longitud del período reproductivo y edad a la que ocurre la primera puesta tienen usualmente un efecto directo en la aptitud y la competitividad de las poblaciones. Una afirmación básica, que se encuentra en muchos estudios ecológicos indica que, al ser los recursos limitados

para un organismo, el desvío de estos hacia la reproducción provocaría una disminución en los recursos disponibles para el crecimiento y el mantenimiento del organismo. Por tal motivo, una consecuencia de la reproducción sería una disminución en la supervivencia (Bell, 1980). Las evidencias bibliográficas sugieren que existiría un costo real asociado a la reproducción, pero no se ha demostrado que la reproducción afecte directamente la probabilidad de supervivencia (Snell & King, 1977). En trabajos realizados con rotíferos se encuentran diferentes patrones reproductivos que están asociados con la longevidad, encontrándose animales longevos que se reproducen varias veces y en distintas clases de edades. En contraste, los animales poco longevos pasan su vida reproductiva concentrando la reproducción en unas pocas clases de edades y con una tasa muy elevada. Si esta afirmación se cumpliera en *A. persimilis*, deberíamos encontrar diferentes patrones reproductivos en relación con la longevidad de las hembras. Como las hembras de *Artemia* producen múltiples camadas a lo largo de su vida reproductiva, es posible que pudieran balancear el esfuerzo reproductivo con la propia supervivencia (Crespo, 1999). De esta forma la longitud del período reproductivo sería un factor que influiría en el desempeño de las poblaciones de *Artemia* (Browne, 1980;1982; Browne *et al.*, 1984). Las hembras con períodos reproductivos cortos concentrarían su esfuerzo reproductivo en camadas abundantes y continuas, mientras que aquellas que viven más tiempo distribuirían el esfuerzo reproductivo durante toda su vida (Lenz, 1987). En nuestro estudio se revela una correlación positiva entre el período reproductivo y la cantidad total de descendientes que pone una hembra. Esta relación indicaría que las hembras de *A. persimilis* no podrían desviar los recursos destinados en la reproducción hacia aumentar su propia supervivencia, dado que no se observan hembras longevas que pongan pocos descendientes a lo largo de su vida reproductiva. Debemos recalcar que las asociaciones entre las variables reproductivas y del ciclo de vida que estamos estudiando no son de efecto y consecuencia (regresión) y solo podemos decir que una variable cambia positiva o negativamente cuando la otra cambia (correlación), pero no podemos decir que una de las dos sea dependiente de la otra.

Consideraciones Ecológicas

El estudio de las parejas individuales en condiciones estandarizadas de laboratorio permite analizar diversos fenotipos reproductivos y sacar conclusiones sobre el posible comportamiento de las poblaciones naturales, pero estas conclusiones no son suficientes para determinar los requerimientos y tolerancia de *Artemia*, más aun, cuando su ocurrencia en la naturaleza esta restringida a niveles de salinidad lo suficientemente altos para impedir la coexistencia de sus predadores (Vanhaecke *et al.*, 1984, Dana *et al.*, 1993).

Numerosos autores han propuesto que la salinidad, por si sola, no es el factor abiótico más importante en controlar la abundancia de especies en un determinado cuerpo de agua. Al estudiar los ecosistemas acuáticos se deben tener en cuenta factores abióticos que incluyen la interacción entre factores físicos y químicos (temperatura, salinidad, química del agua) y factores bióticos como la depredación y la competencia (Williams, *et al.* 1990). En los ecosistemas que habita *Artemia*, cuando la salinidad es elevada, la competencia y la depredación por parte de otros organismos zooplanctónicos no parecen ser un factor importante dado que no existen muchos organismos que estén adaptados a las altas concentraciones salinas. Sin embargo, cuando los niveles de salinidad son bajos estos factores bióticos deben ser tenidos en cuenta. Existe una hipótesis por la cual la productividad de las especies individuales alcanzaría un valor máximo en salinidades intermedias, dado que en altas concentraciones los organismos se encontrarían fisiológicamente limitados, y en bajas concentraciones la depredación y la competencia con otras especies limitarían el crecimiento de la población (Herbst, 1988). Si este fuera el caso para *A. persimilis* de la laguna Colorada Chica podríamos explicar, como resultado de nuestras experiencias, el mayor rendimiento reproductivo de esta población en la salinidad intermedia de 90 g l⁻¹.

Para algunos autores, la edad a la que se produce la primera puesta sería el factor mas importante en la determinación de la tasa de crecimiento de una población (Cole, 1954). En nuestro trabajo, la edad a la primera reproducción fue definida como el período pre-reproductivo y su valor fue siempre menor en las hembras que crecieron a

una concentración salina de 90 g l⁻¹. Este resultado estaría indicando que las hembras de *A. presimilis* de la población de Colorada Chica se desarrollarían mejor en concentraciones salinas intermedias en lugar de a salinidades extremas, tanto bajas (40 g l⁻¹) como elevadas (150 g l⁻¹).

Resultados y Discusión. Capítulo IV

4.4 Comportamiento reproductivo en *Artemia persimilis*. Estudio de la morfología del abrazo copulatorio en *A. franciscana* y *A. persimilis*.

Introducción

La primera descripción sobre el comportamiento de cópula de los anostracos data de 1850 (Baird, 1850 en Belk, 1991). Más tarde, Kuenen (1939) y Lochhead (1941), presentaron importante información sobre la biología reproductiva y el comportamiento de cópula en *Artemia*. El principal interrogante sobre el patrón de comportamiento durante el apareamiento está centrado en una pregunta. ¿Si existiera una selección, previa al apareamiento, por parte de alguno de los integrantes de la pareja, cuál de ellos sería el responsable de realizarla?. En estudios realizados sobre *Eubbranchipus serratus*, se encontró que las hembras de esta especie ejercían una selección de los machos, basada aparentemente, en la morfología. Por otro lado, las hembras de *Eubbranchipus moorei* evitaban frecuentemente ser abrazadas por los machos mediante unos cortos y vigorosos movimientos en los cuales se retorcían juntando la cabeza con el abdomen (Moore & Ogren, 1962; Belk, 1984b). Para el género *Artemia* la situación sería diferente. Como puntualiza Kuenen (1939) en la discusión de su trabajo, aun cuando la hembra de *Artemia* que está abrazada por un macho se mueve vigorosamente, no es capaz de liberarse de él. Esta aparente diferencia entre las hembras de *Artemia* y las de *Eubbranchipus*, en la habilidad para liberarse del abrazo del macho, implicaría que los machos de *Artemia* tendrían más control sobre la cópula que los de otras especies de anostracos (Belk, 1991). Si este fuera el caso, esto explicaría porqué existen diferencias tan pequeñas en la morfología de la segunda antena del macho entre las diferentes especies de *Artemia* en comparación con lo que ocurre dentro de otros géneros de anostracos.

Se considera que los anostracos machos se valen de claves poco precisas para encontrar a las hembras y que en general esas claves sólo involucran el sentido de la visión. Estas observaciones sobre la poca discriminación que harían los machos para seleccionar pareja concuerdan con la teoría en la cual los machos evitan los encuentros agresivos y concentran el esfuerzo reproductivo en la búsqueda e inseminación de las hembras receptivas (Alcock, 1980). Este tipo de tácticas deja a los machos con muy poco espacio para seleccionar los apareamientos, antes de efectuar el abrazo. Aún después del abrazo copulatorio, los machos de *Artemia* precisarían de

bastante tiempo para evaluar la potencial inseminación de la hembra abrazada. Las observaciones de machos de *Artemia* abrazados a hembras de *Eubbranchipus* por más de 30 minutos, así lo indican (Belk & Serpa, 1992). Ya en 1939 Kuenen había descrito la poca selectividad para encontrar pareja de los machos de *Artemia*, al encontrar abrazos de macho en posiciones incorrectas, abrazos múltiples (varios machos y una sola hembra), machos enganchados entre sí y hasta machos nadando abrazados a hembras muertas y este tipo de observaciones fueron también descritas por Vekhov y Vekhova (1993). Esta aparente falta de discriminación en la selección de pareja fue encontrada también por Browne (1980 b) para *A. franciscana*, que observó machos de especies bisexuales abrazando a hembras de *A. parthenogenetica*.

Al analizarse el éxito que tienen las cópulas entre diferentes especies de *Artemia* en experiencias de fecundación cruzada, se verifica que los mecanismos de aislamiento reproductivo tendrían pocos componentes copulatorios (etológicos o estructurales) y estarían compuestos, casi en exclusividad por mecanismos postcopulatorios (Abreu-Grobois, 1987).

En nuestro trabajo se analiza la posibilidad de que algunas estructuras cuticulares masculinas y femeninas tengan una correspondencia mutua y/o formen parte de un mecanismo tipo "llave-cerradura" a nivel específico, para el reconocimiento o la estimulación sexual en el momento del abrazo copulatorio. Además, se agregan observaciones sobre el patrón de comportamiento durante el cortejo, en parejas de *A. persimilis*.

Metodología

Se analizó el comportamiento de cópula en parejas de *A. persimilis* mediante la observación directa de los animales. Hembras y machos fueron colocados de a dos en recipientes de 5 cm de profundidad y 10 cm de diámetro donde podían nadar libremente. Dado el tamaño de estos animales (aprox. 1.5 cm) que permite distinguirlos fácilmente las observaciones se realizaron a ojo desnudo. En algunas ocasiones se colocaron pares hembra-macho, no abrazados, en recipientes plásticos conteniendo 20 ml de medio de cultivo. Luego estos recipientes fueron colocados en total oscuridad durante 8 hs aproximadamente, transcurrido este tiempo, las parejas fueron observadas para verificar formación de abrazos copulatorios en ausencia de luz.

Para describir la morfología del abrazo copulatorio, se seleccionaron ejemplares aislados o en pareja, se fijaron y se prepararon para su observación al microscopio óptico y al microscopio electrónico de barrido. Los ejemplares a ser observados en el microscopio óptico, fueron observados y fotografiados "in toto" o se procesaron siguiendo la técnica histológica convencional para obtener cortes finos. Los preparados se realizaron fijando convenientemente individuos aislados de ambos sexos, parejas de *A. persimilis* y *A. franciscana* y parejas híbridas. Para esto último, hembras y machos sexualmente maduros, pertenecientes a las dos especies, fueron colocados en distintos recipientes para lograr la formación natural de las siguientes parejas.

- animales abrazados de *Artemia persimilis*
- animales abrazados de *Artemia franciscana*
- animales abrazados de parejas híbridas: ♀ *A. persimilis* x ♂ *A. franciscana*
- animales abrazados de parejas híbridas: ♂ *A. persimilis* x ♀ *A. franciscana*

Los animales naturalmente emparejados fueron separados cuidadosamente del cultivo, narcotizados con agua carbonatada y fijados según la técnica de microscopía a seguir.

Microscopia óptica

Parejas inmovilizadas con agua carbonatada fueron colocadas 24 hs en una mezcla de fijadores Bouin al 5% de ácido acético. Dado que *Artemia* posee una cutícula muy delgada, la acción del Bouin fue suficiente para ablandarla. Transcurridas las 24 hs se los traspasó a una solución de etanol al 80% donde se conservaron hasta el momento de la inclusión.

Los cortes histológicos se realizaron según el siguiente protocolo:

Deshidratación:

1 h alcohol 96% (con un cambio a los 30 min.)

2 hs mezcla 1:1 de alcohol 96% y alcohol butílico

24 hs alcohol butílico

Inclusión en parafina:

(Todos los pasos se realizan en estufa a 55 ° C.)

3 hs mezcla 1:1 de alcohol butílico y parafina en estado líquido

1 h parafina en estado líquido

2 hs en parafina que será la definitiva

Corte, rehidratación y coloración:

Para realizar los cortes histológicos transversales o sagitales de 12 µm de espesor se utilizó un micrótopo Leitz Weitzlar. Luego de una rehidratación gradual, la coloración se realizó con la técnica de Hematoxilina de Carazzi-Eosina alcohólica. Las observaciones y micrografías se realizaron con un foto microscopio Zeiss Axioplan.

Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Los animales inmovilizados con agua carbonatada fueron fijados directamente en una solución de alcohol etílico al 80%.

Se utilizó el siguiente protocolo:

Deshidratación:

24 hs alcohol 80%
2 hs alcohol 90%
2 hs alcohol absoluto 100%
2 hs mezcla 2:1 de alcohol absoluto y acetona
12 hs mezcla 1:1 de alcohol absoluto y acetona
2 hs mezcla 1:2 de alcohol absoluto y acetona
Conservación en acetona 100%

Las muestras así procesadas fueron sometidas a la técnica de secado por punto crítico realizada en un Critical Point Dryer, Bal-Tec CPD 030. Esta técnica es fundamental para evitar que las muestras de animales con cutícula delgada se colapsen al ser metalizados. El posterior metalizado se realizó con Oro-Paladio en un metalizador Sputter Coater, Bal-Tec SCD 050. Las observaciones y micrografías se realizaron con microscopio electrónico Zeiss DSM 940^a de origen alemán.

Resultados y conclusiones

Comportamiento reproductivo

Los machos de *A. persimilis* se aproximan a las hembras siguiendo varios pasos: detección, orientación, posicionamiento, abrazo, intromisión y separación de la pareja. Los primeros pasos, hasta que se efectúa el abrazo copulatorio (amplexo), suelen ser tan rápidos que no pueden distinguirse fácilmente unos de otros.

La detección de una hembra por parte de un macho se produce aún en ausencia de luz. En nuestro estudio hemos encontrado la formación de abrazos copulatorios en condiciones de total oscuridad. Sobre un total de 28 pares observados, se encontraron unidos 8 al cabo de algunas horas en ausencia de luz. Estas observaciones no tienen un resultado cuantitativo que pueda ser probado estadísticamente, pero son útiles para evidenciar la presencia del hecho puntual.

La orientación constituye un movimiento del macho dirigido hacia la posición dónde se encuentra la hembra; luego, el posicionamiento se produce cuando el macho se coloca debajo de la hembra y comienza a nadar a la par de ella. El posicionamiento es

realmente muy corto en *A. persimillis* y por tal motivo no hemos observado a los machos nadando a la par de las hembras (sin abrazo) por un tiempo medible. Generalmente, el macho coloca su cabeza cerca de la zona genital de la hembra y con un movimiento muy rápido abre las antenas y engancha a la hembra entre el último par de patas y el comienzo del ovisaco, rodeando con los artejos distales de su segunda antena la zona anterior y ventral del mismo. La figura 32 muestra como quedan enganchados los animales cuando se produce el amplexo o abrazo copulatorio. Hemos encontrado que tanto en *A. persimillis* como en *A. franciscana*, el amplexo dura más de un par de horas y las hembras no son capaces de liberarse de los machos aunque realicen movimientos bruscos. Las parejas pueden ser desenganchadas artificialmente con cierta dificultad, utilizando pinzas finas y narcotizando previamente a los animales. Para realizar la descarga del esperma, el macho abrazado mueve su región genital hacia el gonoporo rodeando el abdomen de la hembra, penetrando dentro del gonoporo la porción retráctil de uno de sus penes y permaneciendo en esa posición aproximadamente un minuto. Durante este tiempo la hembra continúa moviendo sus filopodios y de esta forma la pareja sigue desplazándose. Cuando la descarga del esperma finaliza el macho retira su pene del gonoporo y comienza nuevamente a mover sus filopodios en sincronía con los de la hembra. La descarga de los espermatozoides por el macho se produce cuando los oocitos ya están en los oviductos. Más tarde la fecundación se realizará cuando los oocitos descendan desde los oviductos hasta el ovisaco. Si el macho se abraza a una hembra que transporta oocitos en los oviductos, la descarga del esperma puede realizarse casi inmediatamente y luego de unos pocos minutos de finalizada, la pareja se separa. Sin embargo, cuando las parejas se forman con hembras que transportan embriones en el ovisaco (quistes o nauplios), la unión continúa hasta el momento en que puede producirse la intromisión del pene, por lo tanto puede prolongarse más allá de las 24 hs. En estos casos el macho se asegura una futura descarga de espermatozoides aun cuando la hembra este transportando embriones que han sido fecundados por otro macho. Por tal motivo, la duración del amplexo (abrazo copulatorio) parece depender, casi exclusivamente, del momento en que se produce la descarga del esperma.

Comportamientos anómalos en los machos de *A. persimilis*

En machos de *A. persimilis* que se mantuvieron aislados de hembras, se observa un comportamiento agresivo y poco selectivo de enganche entre individuos del mismo sexo. Se detectaron, por ejemplo, grupos de tres a cuatro machos enganchados de distintas partes del cuerpo. Es muy frecuente encontrar dos individuos colocados "cabeza a cabeza", uno de ellos abrazando al otro, con las antenas 2, por detrás de la cabeza de su compañero como puede verse en las fotografías de la figura 33. El comportamiento agresivo de los machos maduros también se observa en presencia de hembras. Se encontraron machos abrazando a la hembra por detrás de la cabeza, aferrándola por el tórax o nadando abrazado a una hembra muerta y ya en estado de descomposición. También pueden verse varios machos unidos a diferentes partes del cuerpo de una misma hembra, siendo esta situación muy común aun en presencia de otras hembras sexualmente maduras receptivas (Fig. 34).

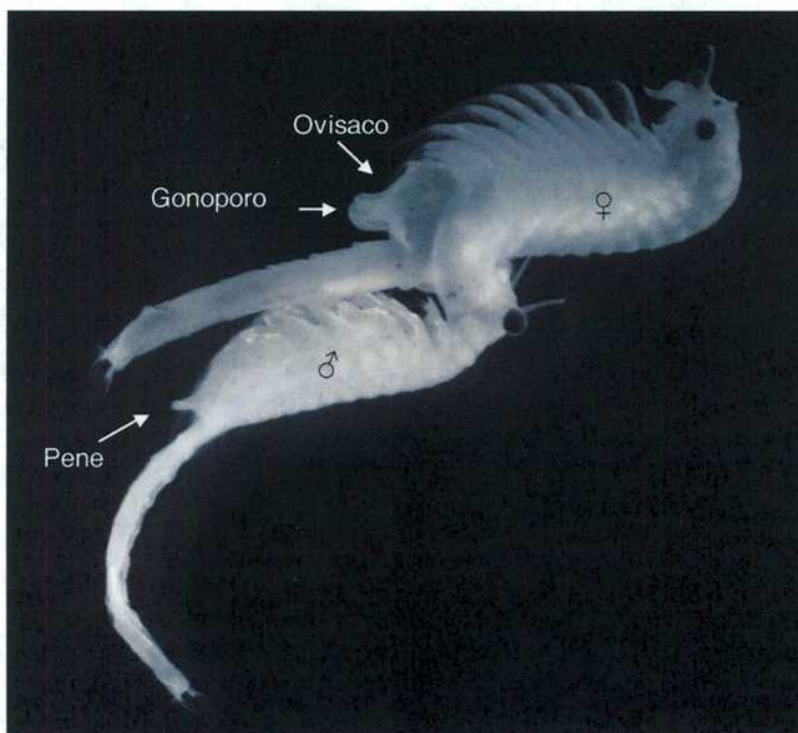


Figura 32: Morfología general del amplexo (abrazo copulatorio) en *Artemia franciscana*. (Aumento 10x)

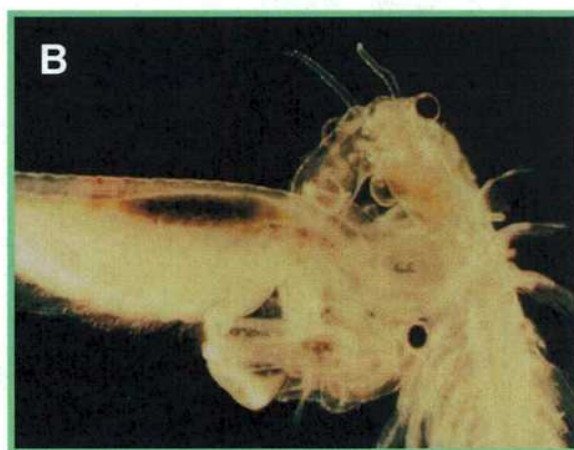
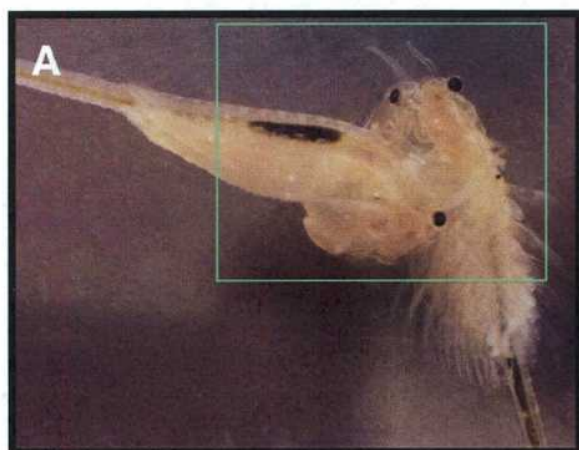


Figura 33: Machos aislados de *A. persimilis*, abrazados. Uno de los machos se engancha al otro, abrazando con las antenas 2 a su compañero, por detrás de la cabeza. El rectángulo verde en la figura A (Aumento: 50x), delimita la zona ampliada en la figura B (Aumento: 100x).

Morfología de la zona involucrada en el abrazo copulatorio en *A. franciscana* y *A. persimilis*

Antes de discutir las diferencias encontradas entre las dos especies de *Artemia* estudiadas, debemos conocer la morfología y las estructuras que estarían involucradas en el abrazo copulatorio en cada una de ellas. Como se describió anteriormente, el amplexo (abrazo copulatorio) implica que el macho se coloque paralela y dorsalmente a la hembra y la abrace con sus antenas 2 a la altura del límite entre el tórax y los segmentos genitales femeninos (Fig. 32). Por lo tanto debemos observar detalladamente la morfología de la cabeza del macho y de los segmentos genitales de la hembra en busca de estructuras que pudieran intervenir en un reconocimiento sexual entre los integrantes de la pareja.

Machos

Durante el desarrollo post-embrionario de *Artemia*, en los estadios postlarvales, la segunda antena del macho se modifica formando un órgano en forma de pinza que permite enganchar a la hembra durante el cortejo. La antena 2 o *clasper* consta de dos artejos, que son sólo el resultado de la articulación del exopodito, dado que durante el transcurso de las mudas juveniles, el protopodito, endopodito y estructuras asociadas se reducen hasta desaparecer completamente (Cohen *et al.*, 1999). En el macho adulto de *Artemia*, el artejo basal del exopodito es robusto y ensanchado, mientras que el artejo distal es aplanado y posee una forma sub-triangular en *A. franciscana*, y triangular curvada, similar a una hoz en *A. persimilis* (Yaneng & Lan, 1992). Sobre cada artejo basal podemos destacar la presencia de una protuberancia subesférica medio-basal llamada “tubérculo frontal”. Los artejos basales de ambas antenas se encuentran soldados en su parte proximal en un puente o barra transversal que lleva un par de montículos espinosos. La figura 35 muestra la cabeza de un macho de *A. franciscana* con la segunda antena desplegada en posición dorsal.

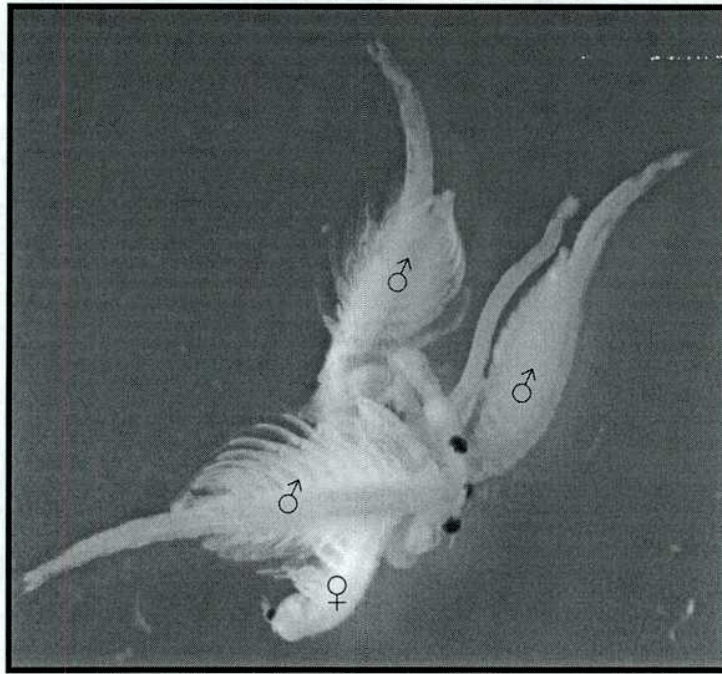


Figura 34: Tres machos (♂) de *A. persimilis* abrazados al cuerpo de una sola hembra (♀). (Aumento: 40x).

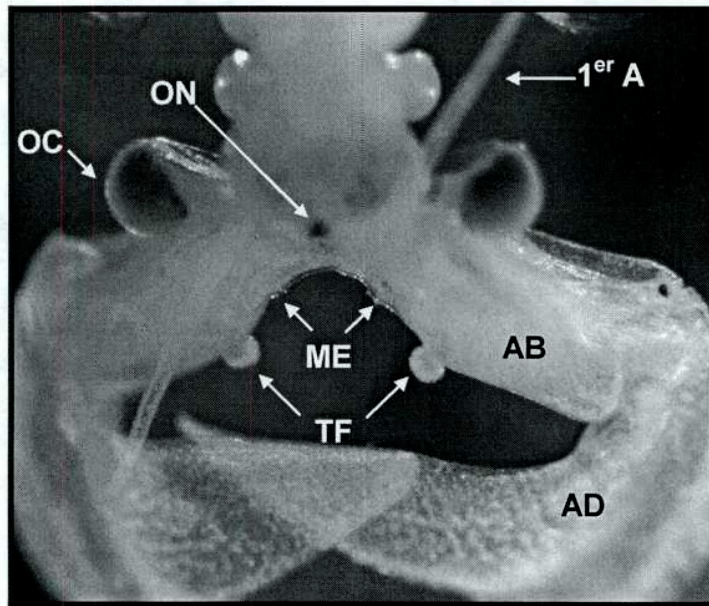


Figura 35: Cabeza del macho de *Artemia franciscana* con la antena 2 rebatida dorsalmente. (Aumento: 50x). OC: ojo compuesto; ON: ojo naupliar; 1^{er} A: antena 1; AB: artejo basal de antena 2; AD: artejo distal de antena 2; TF: tubérculo frontal; ME: montículos espinosos.

La forma del tubérculo frontal es ligeramente variable entre las diferentes especies de *Artemia* y se utiliza en la taxonomía del grupo. Dentro de las especies americanas la forma es similar pero el tamaño es diferente, midiendo en *A. franciscana* unos 150 μm de diámetro, mientras que en *A. persimilis* mide aproximadamente unos 350 μm . Presenta en toda su superficie una ornamentación cuticular especial compuesta de espinas y sedas sensoriales (Tyson & Sullivan, 1979; Mura, 1989; Cohen et al., 1999).

Hembras

La región genital de las hembras de *A. persimilis* se destaca por poseer un par de proyecciones cuticulares dorsolaterales que definen junto con el tergo del segundo segmento abdominal una estructura en forma de “silla de montar”. La ubicación de estas estructuras podemos verla en la figura 36. Las proyecciones cuticulares se elevan dorsalmente y se extienden hacia los laterales aumentando ligeramente el ancho del abdomen en este segmento (Fig 37). La observación microscópica de estas estructuras revela la presencia de ornamentaciones especiales. En un corte sagital de la zona genital (Fig. 38 A) se puede ver cómo la estructura cuticular se eleva dorsalmente y presenta un puntillado que nos indicaría la presencia de ornamentaciones. Con mayor magnificación observamos que las ornamentaciones son espinas truncas con la punta ensanchada que se disponen en toda la superficie de la proyección (Fig. 38 B) Estas proyecciones cuticulares dorsolaterales ornamentadas están totalmente ausentes en la *A. franciscana*.

Las hembras de *A. franciscana* poseen unas proyecciones cuticulares laterales que forman dos aletas al inicio del ovisaco. Las mismas comienzan a formarse al final del tórax y se ensanchan al entrar en contacto con el ovisaco. Estas proyecciones pueden distinguirse con el microscopio estereoscópico y se observan más detalladamente en los cortes histológicos transversales efectuados en ovisacos de hembras.

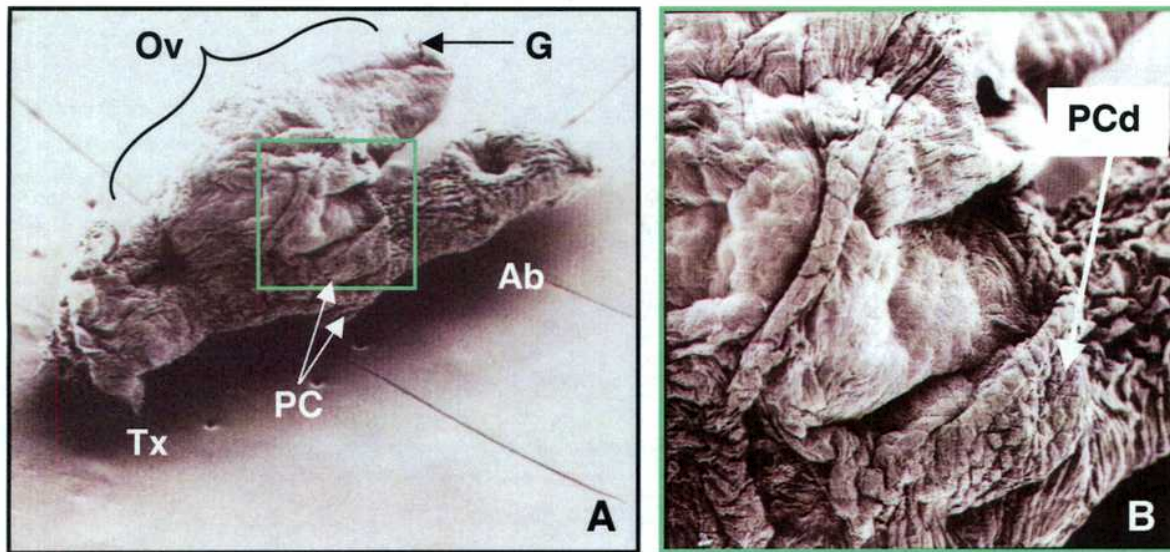


Figura 36. Vista lateral de la zona abdominal genital de la hembra de *A. persimilis*. El cuadrado verde en A, indica la zona ampliada en B. (Aumento: A 50x; B 200x). Ab, abdomen; Tx, tórax; Ov, ovisaco; G, gonoporo; PC, proyección cuticular; PCd, proyección cuticular derecha.

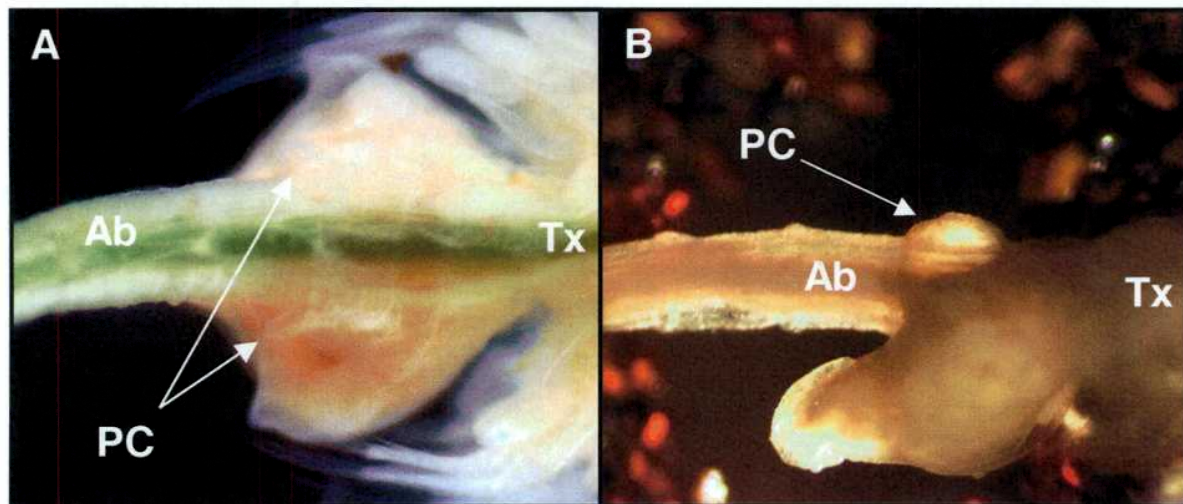


Figura 37. Diferentes vistas de la zona genital en hembras de *A. persimilis* (Aumento 50x). A: Vista dorsal. B: Vista lateral. Ab, abdomen; Tx, tórax; PC, proyección cuticular.

La figura 39 A muestra una fotografía tomada con lupa (microscopio estereoscópico) de la región abdominal de una hembra de *A. franciscana* en posición dorsal. Las proyecciones laterales (aletas) no presentan una ornamentación especial como puede verse en la figura 39 B, donde se presenta una fotomicrografía de un corte transversal realizado a nivel del primer segmento abdominal. Estas estructuras en forma de aletas laterales también están presentes en *A. persimilis* pero son notablemente más pequeñas.

Comparación de la morfología del amplexo entre *A. persimilis* y *A. franciscana*

Utilizando las fotomicrografías tomadas con microscopio electrónico de barrido que se muestran en la figura 40 podemos comparar la morfología general de la cabeza del macho de *A. persimilis* con la del macho de *A. franciscana*. Para realizar esta observación, se diseccionaron las cabezas de los animales y se colocaron en posición posterior. De esta forma se puede visualizar el interior del “órgano de abrazo” (parte medial de las antenas 2), manteniéndolo en una posición similar a la que tendría cuando el macho se abraza a la hembra. Se puede comparar el tamaño de los tubérculos frontales entre ambas especies. y diferenciar la forma del artejo distal de la segunda antena. En *A. franciscana* (Fig. 40 A) el tubérculo frontal es pequeño y el artejo distal del exopodito presenta una forma subtriangular, mientras que en *A. persimilis* (Fig. 40 B) el tubérculo frontal es de mayor tamaño y el artejo distal de la antena presenta una forma más arqueada (forma de hoz).

Con la ayuda de cortes histológicos realizados sobre parejas en el brazo copulatorio, podemos distinguir si existe una zona de encuentro entre las estructuras masculinas (tubérculo frontal y montículos espinosos) y las estructuras femeninas (proyecciones cuticulares dorsolaterales y proyecciones cuticulares laterales en forma de aleta) que describimos anteriormente.

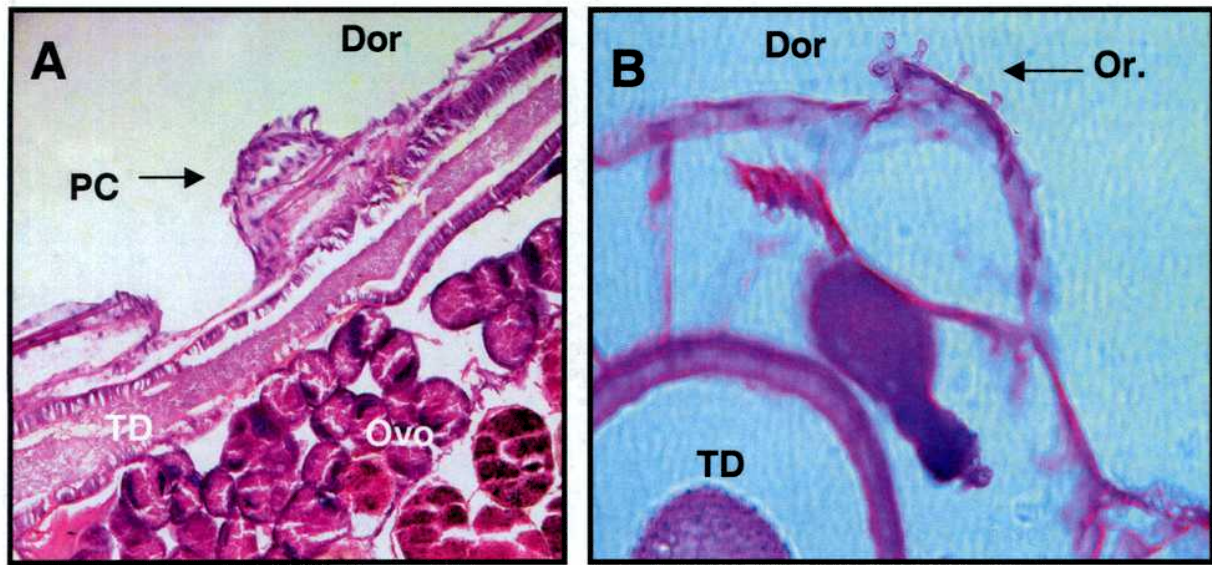


Figura 38. Fotomicrografías de cortes histológicos realizados en la zona abdominal de hembras de *A. persimilis*. A. Corte sagital a nivel del ovisaco (Aumento 100x). B Corte transversal realizado al final del segundo segmento abdominal (Aumento 400x). TD, tubo digestivo; PC, proyección cuticular dorso-lateral; Or., ornamentación; Ovo., ovocitos; Dor, Dorsal)

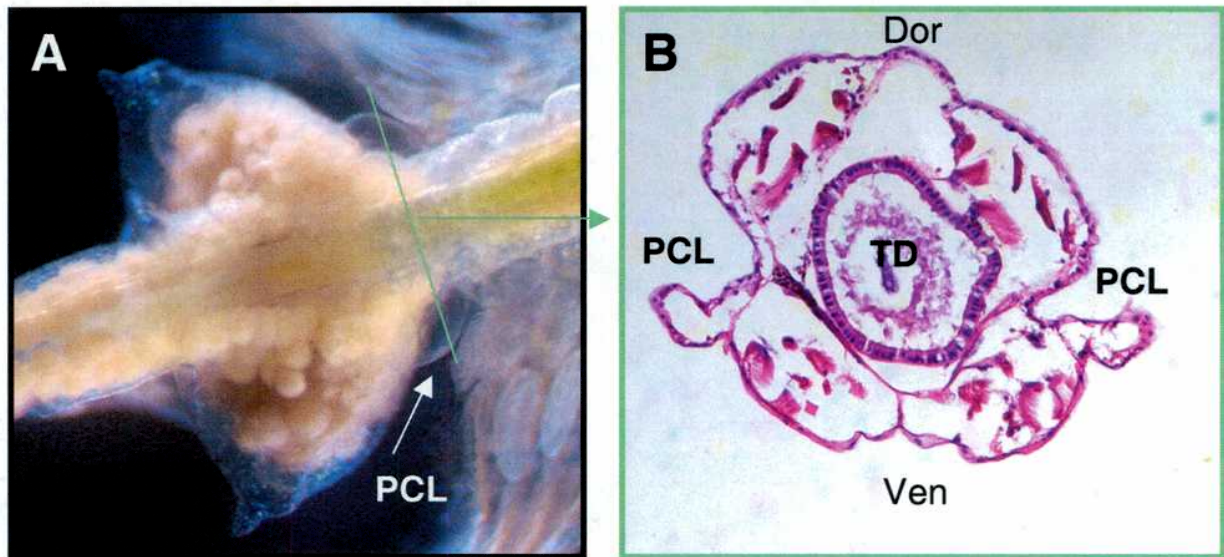


Figura 39. Fotomicrografías de la zona abdominal de hembras de *A. franciscana*. A: Vista dorsal del ovisaco (Aumento 50x). B: Corte histológico transversal realizado a la altura indicada por la línea verde en A, del primer segmento abdominal (Aumento 100x). TD: Tubo digestivo; PCL: proyección cuticular lateral; Dor, dorsal; Ven, ventral.

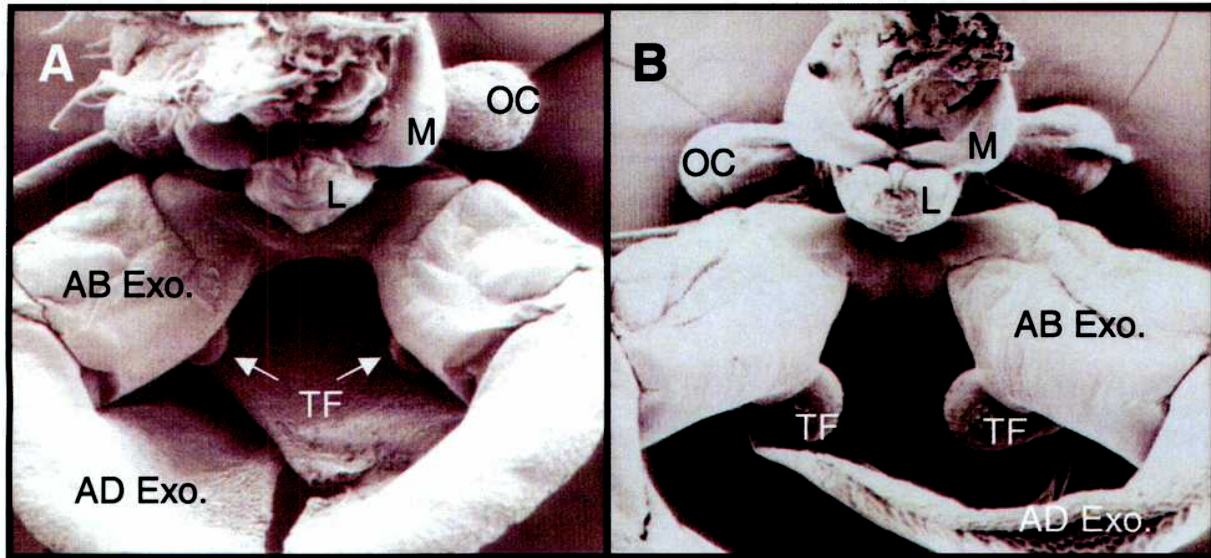


Figura 40 A, B: Fotomicrografías electrónicas de barrido tomadas en cabezas de machos de *Artemia* (Aumento 60x). A: *Artemia franciscana*. B: *Artemia pesimilis*. OC: ojo compuesto; M: mandíbula; L: labro; TF: tubérculo frontal; AB Exo.: Artejo basal del exopodito; AD Exo.: Artejo distal del exopodito.

En la figura 41 podemos observar cuatro cortes histológicos transversales realizados sobre una pareja de *A. franciscana*. Estos cortes se encuentran formando parte de una serie en dirección ántero-posterior que comienza en la zona del amplexo. El primer corte de la serie nos muestra la cabeza del macho y el inicio del ovisaco de la hembra (Fig. 41 A). Podemos ver que existe una complementariedad entre los tubérculos frontales del macho y una zona de encaje que se formaría entre las proyecciones cuticulares laterales y el cuerpo de la hembra. A medida que nos movemos posteriormente, podemos observar cómo el ovisaco queda rodeado por los artejos distales de la segunda antena y los montículos espinosos limitan dorsalmente el contacto entre el macho y la hembra (Fig. 41 B). Hacia el final de la serie los montículos espinosos ya no son visibles y sigue presente la zona de encastre entre los tubérculos frontales y las proyecciones cuticulares laterales (Fig. 41 C). Cuando el ovisaco se encuentra totalmente enmarcado por los artejos distales de la segunda antena, las proyecciones cuticulares laterales ya no son visibles (Fig. 41 D).

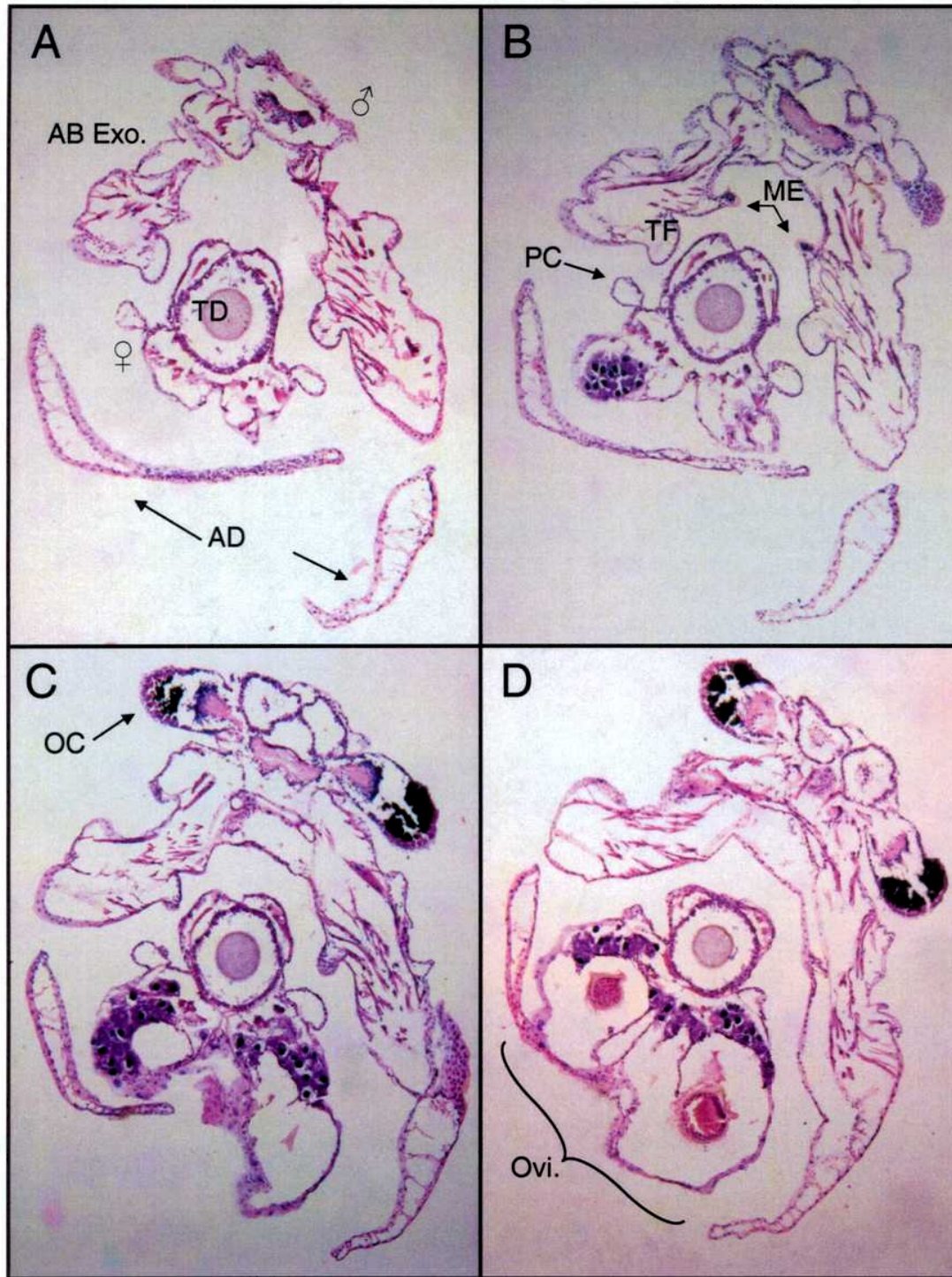


Figura 41. Cortes histológicos transversales seriados en dirección ánteroposterior realizados sobre una pareja de *A. franciscana* en amplexo. TD, tubo digestivo; AB Exo., artejo basal del exopodito de la antena 2; AD Exo., artejo distal del exopodito de la antena 2; TF, tubérculo frontal; ME, montículos espinosos; PC, proyecciones cuticulares; OC, ojo compuesto; Ovi., ovisaco. (Aumento 50x)

Los machos de *A. franciscana* se abrazan a la hembra en una posición cercana al inicio del ovisaco y reposan sus tubérculos frontales sobre las aletas laterales.

Cuando se realizan cortes seriados en parejas de *A. persimilis*, podemos observar que la morfología general del amplexo es diferente a la que se encuentra en *A. franciscana*. La figura 42 nos muestra cuatro cortes histológicos transversales seriados en dirección anterior-posterior, realizados sobre una pareja de *A. persimilis*. Podemos observar como los robustos artejos basales de la segunda antena limitan un pequeño espacio donde se localiza el abdomen de la hembra (Fig. 42 A). En la figura 42 B comienza a visualizarse el tubérculo frontal y varias secciones de los artejos distales de las segundas antenas rodeando el contorno de la hembra. Estas estructuras en conjunto, limitan una zona donde el abdomen de la hembra queda atrapado. Podemos notar una pequeña zona de complementariedad entre los montículos espinosos y el dorso de la hembra, pero es importante destacar que en esta zona, donde aún no se ha formado el ovisaco, no se detecta ningún tipo de estructura particular en las hembras de *A. persimilis*. En dirección posterior, la porción proximal de los artejos basales de las antenas 2 hasta los dos grandes tubérculos frontales encierran, casi por completo, el abdomen de la hembra dorsal y lateralmente. Ventralmente el ovisaco está delimitado por los artejos distales de las antenas 2 (Fig 42 C). En la última figura de la serie ánteroposterior podemos apreciar el inicio del ovisaco cuando se ven las últimas secciones de las segundas antenas del macho. Se deduce que las secciones de las antenas 2 son las últimas porque la unión entre los artejos basales se hace más pequeña y además ya se observa el labro en la cabeza del macho.

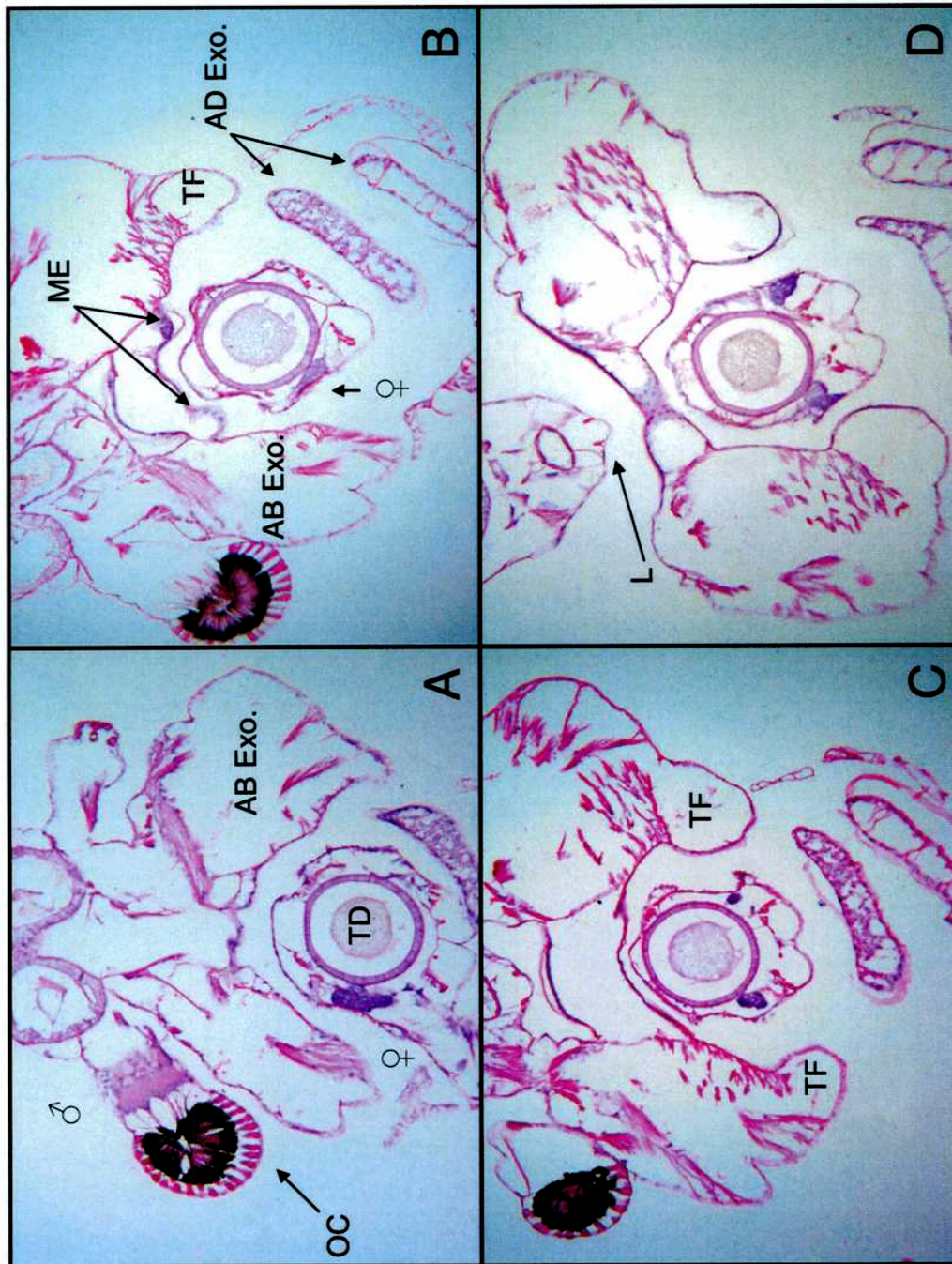


Figura 42. Cortes histológicos transversales seriados en dirección anteroposterior realizados sobre una pareja de *A. persimilis* en amplexo. TD, tubo digestivo; AB Exo., artejo basal del exopodito de la antena 2; AD Exo., artejo distal del exopodito de la antena 2; TF, tubérculo frontal; ME, montículos espinosos; PC, proyecciones cuticulares; OC, ojo compuesto; L, labro. (Aumento 100x)

El macho de *A. persimilis* se abraza apoyando los artejos basales de la segunda antena anteriormente al comienzo del ovisaco; la parte más proximal de los artejos basales de la antena 2 y los tubérculos frontales rodean todo el abdomen de la hembra y no se apoyan sobre ninguna estructura femenina. Las fotomicrografías que se muestran en la figura 43 nos permiten apreciar cómo los extremos de los artejos distales de las antenas 2 se entrecruzan uno sobre el otro en posición ventral, al rodear a la hembra, de manera que casi se ponen en contacto con los tubérculos frontales del lado opuesto. En esta pareja utilizada, se han seccionado algunos filopodios de la hembra para facilitar la visualización de los tubérculos frontales.

Las proyecciones cuticulares dorsolaterales, características de las hembras de *A. persimilis* (Figs. 37, 38, 39) no parecen formar parte de la zona del amplexo. Como puede verse en la figura 44, dada la posición en la que se abraza el macho a la hembra, estas proyecciones entrarían en contacto con el labro del macho o directamente con los primeros esternitos torácicos (Fig 44 B).

Las diferencias encontradas en la morfología de los amplexos entre *A. franciscana* y *A. persimilis* no parecen impedir la formación de parejas híbridas entre ambas especies. Durante el desarrollo de nuestra investigación pudimos obtener y fotografiar parejas híbridas abrazadas naturalmente y en posición correcta (Fig. 45). La especie a la cual pertenece cada integrante de la pareja puede identificarse fácilmente observando la morfología de las ramas furcales y la cantidad de sedas presente en las mismas. En *A. franciscana* las ramas furcales son bien lobuladas y llevan un número de pelos que es en general mayor a cinco (Fig. 45 A C). Por el contrario, en *A. persimilis* las ramas furcales son casi imperceptibles y el número de pelos es generalmente escaso (cuatro como máximo). También podemos identificar la especie a la cual pertenece cada integrante de la pareja utilizando el tamaño de los tubérculos frontales de los machos y algunas estructuras femeninas que describimos anteriormente.

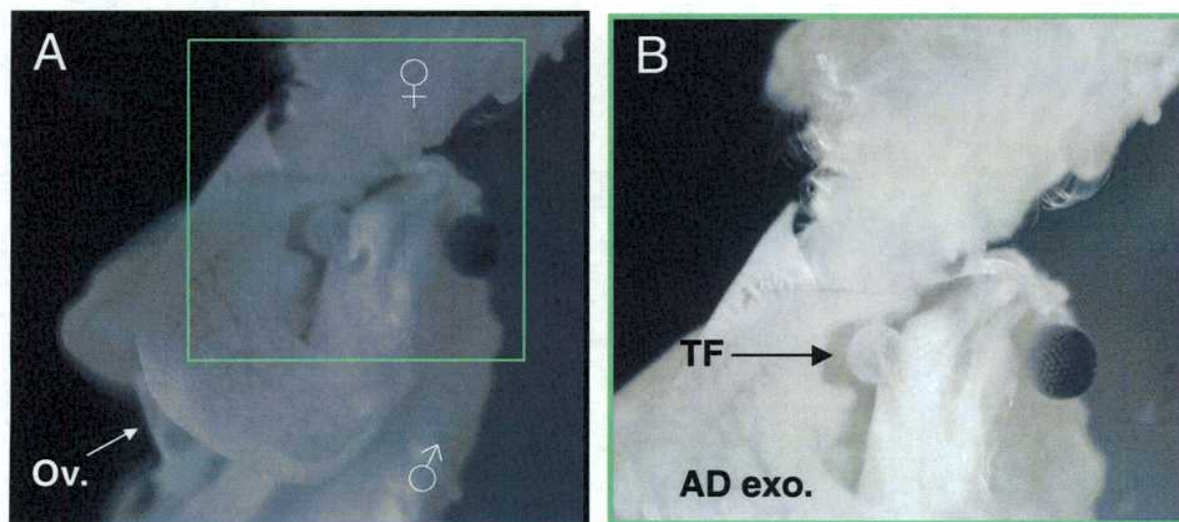


Figura 43: Aspecto del amplexo en *A. persimilis*. A: 32x; B: 40x. Ov., ovisaco; TF, tubérculo frontal; AD exo., artejo distal del exopodito de la antena 2.

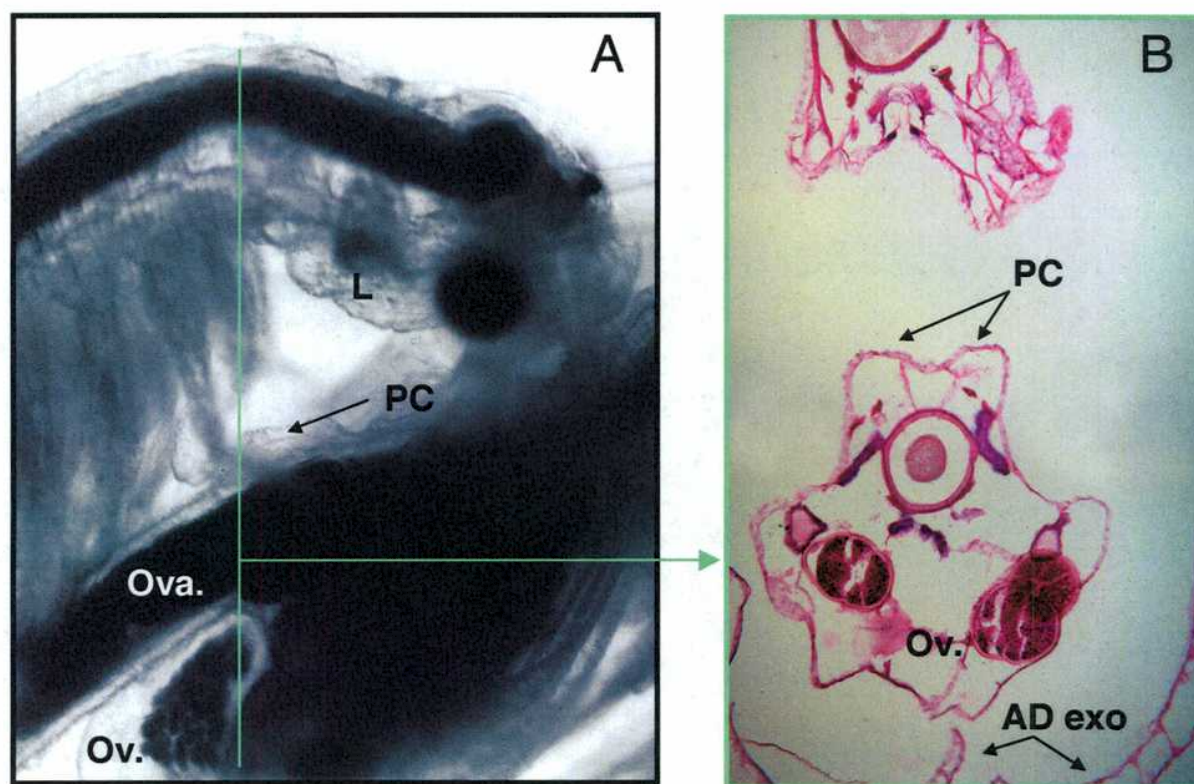


Figura 44: Aspecto del amplexo en *A. persimilis*. A: Fotomicrografía de la región dorsolateral del amplexo (Aumento 50x). B: Corte histológico transversal realizado en la zona indicada con la línea vertical de color verde (Aumento 100x). Ov., ovisaco; Ova., ovario; PC, proyecciones cuticulares; L, labro; AD exo., artejo distal del exopodito de la antena 2.

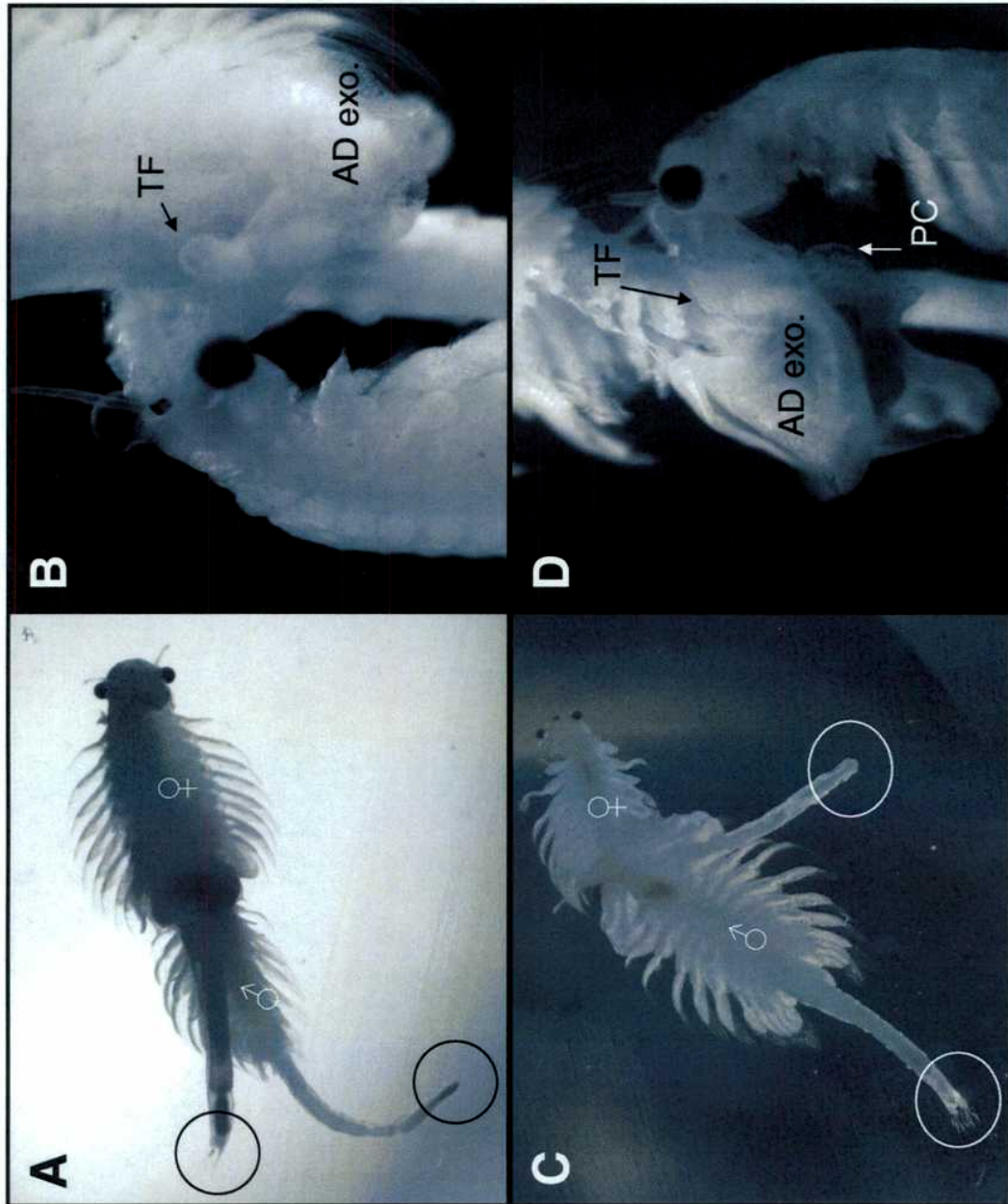


Figura 45. Aspecto del amplexo en parejas híbridas entre las especies *A. persimilis* y *A. franciscana* (Aumentos: A y C 10x; B y D 32x). A y B: Macho de *A. persimilis* unido a hembra de *A. franciscana*, C y D: Macho de *A. franciscana* unido a hembra de *A. persimilis*. TF, tubérculo frontal; AD exo., artejo distal del exopodito de la antena 2, PC, proyecciones cuticulares. Los círculos indican la posición de las ramas furcales.

A mayor aumento, podemos distinguir en una pareja mixta, un macho de *A. persimilis* que posee un tubérculo frontal grande, unido a una hembra de *A. franciscana* que no posee las proyecciones cuticulares dorso-laterales (Fig. 45 B). En la figura 45 D se puede apreciar un macho de *A. franciscana* que posee los artejos distales de las antenas 2 de forma triangular y un tubérculo frontal pequeño unido a una hembra de *A. persimilis* en la que se distinguen claramente las proyecciones cuticulares dorsolaterales.

Discusión y conclusiones

El patrón general de apareamiento de *A. persimilis* es similar al que se observa en otros anostracos (Belk, 1991). Sin embargo, en *A. persimilis* los primeros pasos hasta que se efectúa el abrazo copulatorio (amplexo) suelen ser tan rápidos que no pueden distinguirse fácilmente unos de otros. Según Belk (1991) el sentido de la vista, sería el más importante en el proceso de detección de una hembra por parte de un macho. Nuestras observaciones sobre parejas colocadas en ausencia de luz demuestran que, la visión sería importante en la detección, pero no es el único sentido involucrado en el encuentro entre una hembra y un macho.

Al producirse el abrazo, la pareja “amplexada” puede permanecer unida por un tiempo variable, nadando en forma coordinada (Lent, 1971, 1977). En el transcurso de nuestra investigación se determinó que la duración del amplexo en *A. persimilis* depende del momento en que se produce la intromisión de un pene y que las parejas unidas en amplexo continúan nadando y alimentándose normalmente.

Según varios autores, el tubérculo frontal cumpliría un rol importante durante el abrazo copulatorio. Por lo tanto, podemos sospechar que los diferentes patrones del tubérculo frontal (forma y disposición de espinas) se correspondan con diferentes patrones en algún sitio del dorso de la hembra que alojaría a este órgano durante el apareamiento (Tyson & Sullivan, 1979). Según Wolfe (1980), las hembras de *A. franciscana* poseen unas depresiones laterales ubicadas sobre el ovisaco, en las cuales se encaja el tubérculo frontal de la segunda antena del macho. De nuestras observaciones se desprende que, los machos de *A. franciscana* se abrazan a la hembra en una posición

cercana al inicio del ovisaco y reposan sus tubérculos frontales sobre las aletas laterales. En todas las observaciones realizadas sobre parejas de *A. franciscana* los tubérculos frontales están siempre cercanos a las proyecciones cuticulares en forma de aleta y las mismas se encuentran al inicio del ovisaco no sobre este, como puede verse en la figura 39 A.

Los machos de *A. persimilis* se unen a las hembras rodeando el abdomen de las mismas en la constricción anterior al ovisaco. En oposición a lo que esperábamos encontrar, las proyecciones dorsolaterales ornamentadas presentes en las hembras de *A. persimilis* no entran en contacto con la segunda antena del macho durante el amplexo. Por la posición que ocupan estas estructuras, sería la superficie del labro del macho la que entraría en contacto con ellas (Fig. 44 A). Sin embargo, en los estudios microscópicos realizados sobre el labro no se detectó la presencia de ornamentaciones ni de estructuras particulares que se correspondieran con las encontradas en las hembras.

Existen estructuras distinguibles, en la cabeza de los machos y en la zona genital de la hembra que forman parte del abrazo copulatorio (amplexo). Algunas de estas estructuras, por ejemplo el tubérculo frontal de la antena y las proyecciones cuticulares laterales en forma de aleta, son diferentes (al menos en tamaño) entre las dos especies analizadas. La morfología del abrazo copulatorio es diferente entre las parejas puras de *A. persimilis* y las de *A. franciscana*. Pero, estas diferencias no formarían parte de un mecanismo de barrera copulatorio, dado que las parejas híbridas se forman naturalmente entre estas dos especies. Como hemos mencionado, el éxito en la formación de parejas que se observa en las experiencias donde se realiza fecundación cruzada con diferentes especies, nos hace sospechar que las barreras en el flujo génico entre las especies de *Artemia* serían mayormente postcopulatorias. Este parece ser el caso entre *A. franciscana* y *A. persimilis*. Dado que algunas poblaciones de estas dos especies habitan cuerpos de agua geográficamente cercanos, la falta de barreras precopulatorias sería una de las explicaciones para las posibles zonas híbridas que se encuentran en la Argentina (Papeschi *et al.*, 2000).

Conclusión General

Es importante destacar que las caracterizaciones morfológicas y reproductivas efectuadas en diversas poblaciones de *Artemia* ofrecen una importante información básica para su aplicación en acuicultura.

En sí mismo *Artemia* constituye un recurso natural renovable, y los conocimientos que tiendan a una mejor comprensión de sus complicadas tácticas reproductivas y comportamentales, pueden permitir un manejo más idóneo, ajustado y racional de las poblaciones.

Las experiencias que muestran la tolerancia y preferencia de cada población a los factores ambientales, especialmente a la temperatura y salinidad, proveen información relevante. Por ejemplo, considerando la gran variabilidad de las poblaciones en rasgos tales como, número de puestas por hembra, número de descendientes por hembra, porcentaje de descendencia ovípara, tiempo entre puestas y período pre-reproductivo (Beardmore *et al.*, 1996) y teniendo en cuenta la tolerancia a los principales factores climáticos, es posible, comparando entre diversas poblaciones, seleccionar la población más adecuada para introducir artificialmente en algún lugar en particular desprovisto de una forma nativa, con el objetivo de ser utilizada como fuente de alimento en una piscifactoría o en una camaronera. Por otro lado, la identificación específica de las poblaciones americanas y el estudio de su distribución geográfica, plantea un interesante desafío.

Sobre la base de los datos y observaciones obtenidos en el transcurso de esta investigación podemos puntualizar las siguientes conclusiones:

5.1. Confirmación de la identidad específica de la población de *Artemia* de la laguna Colorada Chica.

❖ Nuestros resultados confirman que la población de *Artemia* de la laguna Colorada Chica pertenece a la especie *A. persimilis*.

❖ Mediante el uso de caracteres morfológicos simples es posible hacer una discriminación preliminar entre individuos de las poblaciones de *A. franciscana* y *A. persimilis*. Los caracteres principalmente utilizados son:

tamaño del tubérculo frontal presente en la antena 2 del macho

presencia o ausencia de proyecciones cuticulares dorsolaterales en el segundo segmento abdominal de la hembra
largo de las ramas furcales .

❖ Con la utilización conjunta de varios caracteres morfológicos y morfométricos de los animales adultos (ancho del tercer segmento abdominal; ancho de cabeza; distancia entre ojos; diámetro del ojo compuesto; largo de la antena 1; longitud del abdomen; longitud desde el comienzo del tercer segmento abdominal hasta el ano; longitud del octavo segmento abdominal; longitud promedio de la furca; longitud) y la aplicación de un análisis estadístico multivariado (análisis discriminante) es posible realizar una separación entre poblaciones de *Artemia* pertenecientes a las especies de *A. franciscana* y *A. persimilis* (Pág. 60).

5.2. Caracterización reproductiva de la población de *A. persimilis* de la laguna Colorada Chica.

❖ El ciclo reproductivo desde el momento que en comienza la maduración de los oocitos en el ovario, hasta que quistes o larvas nauplio son liberados al medio está compuesto de 5 estadios principales: **Estadio 1** maduración de los oocitos en los ovarios; **Estadio 2** ovarios maduros; **Estadio 3** oocitos en los oviductos; **Estadio 4** útero con oocitos; **Estadio 5** embriones (quistes o nauplios) en el ovisaco.

❖ Los ciclos reproductivos que siguen al primero, comienzan antes que los embriones de la camada anterior sean liberados al medio. Por esta causa, se encuentran hembras que transportan embriones en el ovisaco junto con oocitos en los ovarios. Esta superposición de ciclos reproductivos determina las fases dentro de un ciclo de puesta (eventos que se producen entre dos puestas sucesivas), que comienzan desde la primera ovulación y están compuestas por dos números que indican cual es la superposición de estadios correspondiente. Como ejemplo, la fase del ciclo de puesta 5+2 indica que la hembra transporta al mismo tiempo embriones en el ovisaco y oocitos maduros en los ovarios.

❖ A excepción de lo que ocurre con la primera camada de oocitos, la ovulación estaría condicionada por la oviposición. Nunca se encontraron hembras que presentaran al mismo tiempo oocitos en el ovisaco pertenecientes a una 1ª camada y oocitos en el oviducto de la camada siguiente: fases del ciclo de puesta (4+3), (5+3).

Influencia del abrazo del macho (amplexo) sobre el comportamiento reproductivo de las hembras.

❖ Las hembras vírgenes liberan al medio oocitos no fertilizados que no se degradan rápidamente.

❖ En la población de *A. persimilis* de la laguna Colorada Chica no se observa partenogénesis como una modalidad reproductiva.

❖ El apareamiento, a pesar de la presencia de estructuras de reconocimiento y/o estimulación específicas, parece ser bastante inespecífico.

❖ Las hembras mantenidas en aislamiento continuo, prosiguen con sus ciclos reproductivos sin que puedan detectarse diferencias significativas, para las variables reproductivas, entre el grupo “virgen” y el grupo “parejas”. De esta forma, una hembra que no pudo ser encontrada por un macho, mantiene la posibilidad de reproducirse en ciclos futuros, siempre en sincronización con hembras de la misma edad que ya han conseguido aparearse, aún cuando esto signifique una gran pérdida de energía.

❖ En las hembras mantenidas en parejas, el abrazo del macho (amplexo) induce la bajada de los oocitos de un nuevo ciclo reproductivo, desde los oviductos al ovisaco, dónde son fecundados de inmediato. Si la hembra estaba fecundada por un encuentro sexual anterior, el macho espera abrazado a la hembra la liberación de esta puesta, antes que una nueva camada de oocitos descienda al ovisaco. Si se trata de hembras aisladas, los oocitos quedan retenidos un tiempo en los oviductos a la espera del

amplexo, hasta que finalmente bajan al ovisaco y son liberados al medio como una puesta estéril.

Duración de los estadios que constituyen el ciclo reproductivo en la población *A. persimilis* de la laguna Colorada Chica.

❖ Se determinó que no existe una asociación significativa entre el tiempo y los eventos principales que constituyen el ciclo reproductivo (ovulación, oviposición). Por tal motivo, es posible medir la duración de los estadios dentro del ciclo reproductivo de las hembras realizando las observaciones cada 24 hs en cualquier momento del día (Pág. 83)

❖ El ciclo reproductivo promedio tiene una duración de seis días, tanto para las hembras mantenidas en pareja con machos como para las hembras virginales. Este ciclo está compuesto por dos etapas principales, una que transcurre en los ovarios y la siguiente en oviducto–ovisaco. Cada una de las etapas tiene una duración aproximada de 72 hs.

❖ La duración del estadio 3 del ciclo reproductivo (oocitos en los oviductos) puede durar más de 24 hs en las hembras virginales (retención), mientras que en las hembras mantenidas en pareja, este mismo fenómeno tiene una duración menor a las 24 hs.

5.3. Influencia de diferentes tratamientos salinos sobre las variables reproductivas y del ciclo de vida en la población *A. persimilis* de la laguna Colorada Chica.

❖ Los animales no reaccionan al cambio brusco de salinidad del medio en los primeros estadios larvales. No existe una influencia en la longevidad ni en las variables reproductivas (duración del período reproductivo y número de descendientes) cuando se someten larvas nauplio de 24-48 hs a un *shock* salino.

- ❖ La población de *Artemia* de Colorada Chica, está mejor adaptada a las salinidades intermedias, dado que presenta un mayor rendimiento reproductivo y un período pre-reproductivo más corto cuando es criada en una concentración salina de $90 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$.
- ❖ Todas las experiencias mostraron que las hembras de la población estudiada, criadas en diferentes salinidades producen durante su período reproductivo sucesivas puestas. Lo más frecuente fue encontrar hembras con puestas siempre ovíparas. Algunas hembras presentaron puestas ovíparas u ovovivíparas sin un ordenamiento determinado. No se encontraron hembras que presentaran la modalidad reproductiva ovovivípara en forma exclusiva.
- ❖ Existe una correlación positiva entre la longevidad de las hembras y el rendimiento reproductivo medido como: duración del período reproductivo, total de puestas por hembra y total de descendientes por hembra

5.4.Comportamiento de cópula en *Artemia*.

- ❖ Los machos de *A. franciscana* y *A. persimilis* utilizarían claves imprecisas para llevar a cabo el abrazo copulatorio, detectándose en varias ocasiones, abrazos anómalos entre machos o varios machos aferrados a una misma hembra, aún en presencia de hembras sexualmente maduras receptivas. Incluso, en presencia de individuos disponibles de la misma especie, se forman con relativa facilidad parejas híbridas.
- ❖ Los machos utilizarían el sentido de la vista para localizar un objeto posible de ser abrazado. Sin embargo, las observaciones sobre abrazos copulatorios que se forman en la oscuridad sugieren que la visión no sería el único sentido involucrado en estos encuentros.

- ❖ La duración del amplexo en *A. persimilis* depende del momento en que se produce la cópula. Las parejas unidas en amplexo continúan nadando y alimentándose normalmente.
- ❖ Los machos se abrazan a hembras que transportan embriones en el ovisaco pero que poseen ya una camada de oocitos en el ovario. De esta forma el macho se mantiene unido a la hembra y se asegura la fertilización de la camada siguiente. La muda que se produce en la hembra luego de la puesta no es un impedimento para que los animales continúen abrazados.

Morfología del abrazo precopulatorio en *Artemia*.

- ❖ Los machos de *A. franciscana* se abrazan a la hembra en una posición cercana al inicio del ovisaco y reposan los tubérculos frontales de sus antenas 2 sobre las aletas laterales que presentan las hembras de esta especie. El abdomen de la hembra queda trabado por los pequeños tubérculos frontales del macho que encajan entre el abdomen y las aletas laterales de la hembra. Ventralmente el ovisaco queda inmovilizado por los artejos distales entrecruzados de las antenas 2 del macho.
- ❖ Los machos de *A. persimilis* se unen a las hembras rodeando el abdomen de las mismas con sus antenas 2 en la constricción entre el tórax y el abdomen, anterior al ovisaco. El abdomen de la hembra queda completamente abrazado por los artejos basales de las antenas 2 del macho y los grandes tubérculos frontales. Refuerza esta posición el entrecruzamiento de los artejos distales de las antenas 2 del macho, ventralmente sobre el ovisaco.
- ❖ Las proyecciones dorso-laterales ornamentadas, presentes en las hembras de *A. persimilis* no entran en contacto con la segunda antena del macho durante el amplexo. Tal vez se corresponderían con alguna porción esternal de la parte anterior del tórax del macho.

❖ La morfología del abrazo copulatorio es diferente entre *A. persimilis* y *A. franciscana*. Pero, estas diferencias no formarían parte de una barrera precopulatoria, dado que las parejas híbridas se forman fácilmente entre estas dos especies, en condiciones experimentales.

Referencias

- Abatzopoulos T, Zhang B, Sorgeloos P. 1998. International Study on *Artemia*.LIX. *Artemia tibetiana*: preliminary characterization of a new *Artemia* species found in Tibet (People's Republic of China). International Journal of Salt Lake Research 7: 41–44, 1998.
- Abatzopoulos T, Kappas I, Bossier P, Sorgeloos P, Beardmore J. 2002. Genetic characterization of *Artemia tibetiana* (Crustacea: Anostraca). *Biological Journal of the Linnean Society*. 75, 333–344.
- Abele L. G.1982. Biogeography. En: Abele, L. G. (ed.), The biology of Crustacea. I. Systematics, the fossil record and biogeography, Academic Press, New York y Londres.
- Abelin P. 1997. A industria de *Artemia* no Great Salt Lake. Panorama da Aquicultura. Sept/oct. 38: 30-33.
- Abreu-Grobois F.A. 1987. A review of the genetics of *Artemia*: 61–99. En: P. Sorgeloos, D.A. Bengtson, W. Decleir and E. Jaspers (eds) *Artemia* Research and its Applications, Vol.1. Universa Press, Wetteren, Belgium.
- Alonso M. 1996. *Crustacea, Branchiopoda*. En: *Fauna Ibérica*, vol 7. ramos, M. A. et. al. (Eds.). Museo Nacional de Ciencias naturales. CSIC. Madrid.
- Alvarez Z & Sanchez R. 1994. Evaluación de la calidad de la cepa de *Artemia* Las Cumaraguas, Paraguaná, Venezuela. Ciencias Marinas 20(3): 287-299.
- Angelelli V, Schalamuk I B, Arrospide A.. 1976. Los yacimientos no metalíferos y rocas de aplicación de la región Patagonia-Comahue. Ministerio de Economía, Secretaría de Estado de Minería, Anales XVII.
- Anderson D. T. 1967. Larval development and segment formation in the branchiopod crustaceans *Limnadia stanleyana* King (Conchostraca) and *Artemia salina* (L.) (Anostraca). Australian Journal of Zoology. 15: 47–91.
- Anderson E, Lochhead J H, Lochhead M S, Huebner E. 1970, The origin and structure of the tertiary envelope in thick-shelled eggs of the brine shrimp, *Artemia*. Journal Ultrastructure Research 32, 497-525.
- Alcock J.1980. Natural selection and mating systems of solitary bees. American Scientist 68: 146-153.

- Amat F .1980. Differentiation in *Artemia* strains from Spain :19-39. En: The Brine Shrimp *Artemia*. Vol 1. Morphology Genetics, Radiobiology, Toxicology. Persoone G., P. Sorgeloos, O. Roels and E. Jaspers (Eds). Universa Press, Wetteren, Belgium.
- Amat F. 1983. Zygogenetic and partenogenetic *Artemia* in cadiz sea-salterns. Marine Ecolgy Progress Series, 13 (2-3): 291-293.
- Amat F. 1985. Biología de *Artemia*. Informes técnicos de investigación Pesquera, 126-127: 3-59.
- Amat F, Hontoria F, Navarro J C, Varo I. 1990. Caracterización de tres poblaciones de *Artemia* originarias de la zona mediterránea con vistas a su aprovechamiento en acuicultura. Actas del III Congreso Nacional de Acuicultura:687-697. Consellería de Pesca, Marisqueo y Acuicultura. Xunta de Galicia, Santiago de Compostela.
- Amat F, Hontoria F, Navarro J C, Cohen R G, Rodríguez Gil S. 1994. Aproximación preliminar a las distribución del género *Artemia* (especie *A. persimilis*) en Argentina. Provincias de Buenos Aires y La Pampa: 73-84. VIII Congreso Latinoamericano de Acuicultura. Santa Fé de Bogotá, Colombia. 25-28 de octubre.
- Arbasetti C. 2002. Estudio comparativo del efecto de diversos tratamientos salinos en distintas etapas del ciclo ontogenético de dos especies del crustáceo *Artemia* (Branchiopoda, Anostraca) en condiciones de laboratorio. Tesis de Licenciatura para optar al Título de Licenciado en Ciencias Biológicas. Hemeroteca FCEN, UBA.
- Banarescu P.1990. Zoogeography of fresh waters. 1. General distribution and dispersal of freshwater animals. Aula-Verlag, Wiesbaden.
- Baitchorov V.M. & Nagorskaja L. 1999. The reproductive characteristics of *Artemia* in habitats of different salinity. International Journal of Salt Lake Research 8: 287–291.
- Barata C, Hontoria F, Amat F. 1995. Life history, resting egg formation, and hatching may explain the temporal-geographical distribution of *Artemia* strains in the Mediterranean basin. Hydrobiologia 298: 295–305.

- Barata C, Hontoria F, Amat F, Browne R. 1996a. Competition between sexual and parthenogenetic *Artemia*: temperature and strain effects. *Journal of Experimental Marine Biology & Ecology*.196: 313-328
- Barata C, Hontoria F, Amat F, Browne R. 1996b. Demographic parameters of sexual and parthenogenetic *Artemia*: temperature and strain effects. *Journal of Experimental Marine Biology & Ecology*.196: 329-340.
- Barata C, Hontoria F, Amat F. 1996. Estimation of the biomass production of *Artemia* with regard to its use in aquaculture: temperature and strain effects. *Aquaculture* 142: 171-189.
- Barigozzi C. 1972. Problems of speciation in the genus *Artemia* sp.: 61-66. En: Proc. 5 th. European marine Biology Symposium, Battaglia B. (Ed.) Piccin Editore, padova, Italy.
- Barigozzi C. 1974. *Artemia*: a survey of its significance in genetic problems: 221-252. En: Evolutionary biology (7). Dobzhansky T., M. K. Hecht, and W.C. Steere (Eds.) Plenum Press, New York.
- Barigozzi C. 1990. Cytogenetics and speciation of the brine shrimp *Artemia*. *Atti della Accademia Nazionale del Lincei (Serie VIII) XIX*: 57–84.
- Barnes R D. 1994. Invertebrate zoology. Edward E. Ruppert, Robert D. Barnes. Fort Worth: Saunders College Pub., c1994.6th ed
- Beardmore J A, Pilla E J, Thomas K M. 1996. Genetic variation in *Artemia*: Speciation, reproductive mode and potential for exploitation: 157-163. En: Gajardo, G y P Coutteau (ed.), Improvement of the commercial production of marine Aquaculture species. Proceedings of a workshop on Fish and Mollusc Larviculture, Impresora Creces, Santiago, Chile.
- Belk D. 1982. Branchiopoda: 174-180. En: S.P. Parker (Ed.) Synopsis and Classification of living organisms, 2. McGraw-Hill Book Company, New York.
- Belk D. 1984a. Patterns in Anostracan Distribution. En: Jain, S. y P. Moyle (eds.), Symposium of vernal pools and intermittent streams, Institute of Ecology Publication 28.
- Belk D. 1984b. Antennal appendages and reproductive success in the Anostraca. *Journal of Crustacean Biology* 4: 66-71.

- Belk D. 1991. Anostracan mating behavior: a case of scramble-competition polygyny :111-125. En R. T. Bauer and J. W. Martin Eds., Crustacean Sexual Biology. Columbia Univ. Press, New York.
- Belk D. 1998. Global status and trends in ephemeral pool invertebrate conservation: implications for californian fairy shrimp: 147-150. En: Ecology, Conservation, and Management of Vernal Pool Ecosystems Conference. Witham C.W., E.T. Bauder, D.Belk, W.R. Ferren Jr. and R Ornduff (editors) - Proceedings from a 1996. California Native Plant Society, Sacramento, CA.
- Belk D & Brtek J. 1995. Checklist of the Anostraca. Hidrobiología, 298: 315-353.
- Belk D & Cole G A. 1975. Adaptational biology of desert temporary pond inhabitant: 207-226. En: Environmental physiology of desert organisms. Dowden, Teutchinsn and Ross, inc, Stroudsburg, pa. N. F. Headly ed.
- Belk D & Serpa L. 1992. First record of *Branchinecta campestris* (Anostraca) from California and casual observations of males of *Artemia* clasping females of *Branchinecta*. Journal of Crustacean Biology 12(3): 511-513
- Bell G. 1980. The cost of reproduction and their consequences. American Naturalist 116: 45-76.
- Bengston D A, Léger P, Sorgeloos P. 1991. Use of *Artemia* as food source for aquaculture: 255-285. En: *Artemia* Biology Chapter 11. Browne, R. A., Sorgeloos, P. y Trotman C.N.A. (Eds.). CRC press, United States.
- Birabén M. 1954. Sobre la distribución de *Artemia salina* en la Argentina. Neotrópica 1(2): 31-32.
- Bowen S T. 1962. The genetics of *Artemia salina*. I. The reproductive cycle. Biological Bulletin 122:25-32.
- Bowen S T. 1964. The genetics of *Artemia salina*. IV. Hybridization of wild populations with mutant stocks. Biological Bulletin 126, 333.
- Bowen S T, Fogarino E A, Hitchner K N, Dana G L, Chow V H, Buoncristiani M R, Carl J R. 1985. Ecological isolation in *Artemia*: population differences in toletance of anion concentrations. Journal of Crustacean Biology 5(1): 106-129.
- Bowen S T, Buoncristiani M R, Carl J R. 1988. *Artemia* habitats: ion concentrations tolerated by one superspecies. Hidrobiología 158: 201-214.

- Bowen S T, Davis M L, Fenste S R, Lindwall G A. 1980. Sibling species of *Artemia*: 155-167. The Brine Shrimp *Artemia*. Vol 1,. Morphology Genetics, Radiobiology, Toxicology. Persoone G., P. Sorgeloos, O. Roels and E. Jaspers (Eds). Universa Press, Wetteren, Belgium.
- Bowen S T, Durkinn J P, Sterling G, Clark S L. 1978. *Artemia* hemoglobins: genetic variation in parthenogenetic and zygomictic populations. Biological Bulletin 155: 273-287.
- Bowen S T & Sterling G. 1978. Esterase and malate dehydrogenase isozyme polymorphisms in 15 *Artemia* populations. Comparative Biochemistry and Physiology 61B: 593-595.
- Baird W. 1850. The natural history of the British *Entomostraca*. London: Ray Society, reprinted 1968 by Johnson Reprints, New York.
- Brendonck L. 1991. Contributions to the study of the reproductive biology of *Streptocephalus proboscideus* (Anostraca, Streptocephalidae). Crustaceana (Leiden) 60(2):145-162
- Brendonck L & Coomans A. 1994a. Egg morphology in African Streptocephalidae (Crustacea: Branchiopoda: Anostraca) Part 1:South of Zambezi and Kunene rivers. Archiv Für Hydrobiologie. 99: 313–334.
- Brendonck L & Coomans A. 1994b. Egg morphology in African Streptocephalidae (Crustacea: Branchiopoda: Anostraca) Part 2: North of Zambezi and Kunene rivers, and Madagascar. Archiv Für Hydrobiologie 99(3): 335-356.
- Brendonck L & Persoone G. 1993. Biological/ecological characteristics of large freshwater Branchiopods from endorheric regions and consequences for their use in cyst-based toxicity tests: 7-35. En: Soares, A. M. V. M. y P. Calow (eds.), Progress in standardization of aquatic toxicity tests, CRC Press Inc., Boca Raton,.
- Brown G. 1970. Some ultrastructural aspects of spermatogenesis and sperm morphology in the brine shrimp *Artemia salina* Leach (Crustacea: Branchiopoda), Proceedings of Iowa Academic of Science, 76, 473-485.
- Browne R A. 1980a. Reproductive pattern and mode in the brine shrimp. Ecology 61(3): 466-470.

- Browne R A. 1980b. Competition experiments between parthenogenetic and sexual strains of the brine shrimp *Artemia salina*. Ecology 61(3): 471-474.
- Browne R A. 1982. The cost of reproduction in brine shrimp. Ecology : 63 (1) pp 43-47
- Browne R A. 1983. Results of cross-breeding experiments in Mediterranean sexual population of *Artemia*. Biological Bulletin 165:506
- Browne R A. 1985. Divergence of demographic and reproductive variables over 25 years in laboratory and natural populations of the brine shrimp, *Artemia*. Crustaceana, 45 (2) : 164-168.
- Browne R A. 1992. Population genetics and ecology of *Artemia* Insights into parthenogenetic reproduction. Trends in Ecology and Evolution 7(7): 232-237.
- Browne R A & Bowen S T. 1991. Taxonomy and population genetics of *Artemia*. En: *Artemia* Biology, Chapter 9 : 221-235. Browne, R. A., Sorgeloos, P. y Trotman C.N.A. (Eds.). CRC press, United States.
- Browne R A & Halanych K M. 1989. Competition between sexual and parthenogenetic *Artemia*: a re-evaluation. Crustaceana, 57 (1): 57-71
- Browne R A & MacDonald G H. 1982. Biogeography of the brine shrimp, *Artemia*: distribution of parthenogenetic and sexual populations. Journal of Biogeography 9(4): 333-338.
- Browne R A & Wanigasekera G. 2000. Combined effects of salinity and temperature on survival and reproduction of five species of *Artemia*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 244: 29-44
- Browne R A, Davis L E, Sallee S E. 1988. Effects of temperature and relative fitness of sexual and asexual brine shrimp *Artemia*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 124: 1-20.
- Browne R A, Moller V, Forbes V E, Depledge M H. 2002. Estimating genetic and environmental components of variance using sexual and clonal *Artemia*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 267 :107- 119
- Browne R A, Sallee S E, Grosch D S, Segreti W O, Purser S M. 1984. Partitioning genetic and environmental components of reproduction and lifespan in *Artemia*. Ecology 65: 949- 960.

- Brtek J. 1997. Checklist of the valid and invalid names of the "Large Branchiopods" (Anostraca, Notostraca, Spinicaudata and Laevicaudata), with a survey of the taxonomy of all Branchiopoda. Zbornik Slovenskeho Narodneho Muzea Prirodne Vedy 43: 1-66.
- Brtek J & Mura G. 2000. Revised key to families and genera of the anostraca with notes on their geographical distribution. Crustaceana 73 (9): 1037-1088
- Camara M R. 1996. *Artemia* production in coastal saltworks in Brazil: Past, current practices and perspectives: 173-178. En: Improvement of the commercial Production of Marine Aquaculture Species. Proceedings of a workshop on Fish and Mollusc Larviculture. Impresora Creces. Santiago, Chile.
- Camara M R. 2001. Dispersal of *Artemia franciscana* Kellogg (Crustacea; Anostraca) populations in the coastal saltworks of Rio Grande do Norte, northeastern Brazil. Hydrobiologia 466: 145–148.
- Camara M R & Medeiros Rocha R. 1987. *Artemia* culture in Brazil:an overview. : 195–200. En Sorgeloos, P., D. A. Bengtson, W. Decleir & E. Jaspers (eds), *Artemia* Research and its Applications, 3. Universa Press, Wetteren, Belgium.
- Camargo W N; Bossier P; Sorgeloos P; Sun Y. 2002. Preliminary genetic data on some Caribbean *Artemia franciscana* strains based on RAPD's. Hydrobiologia 468: 245-249.
- Campos H, Soto D, Parra O, Steffen W, Agüero G.1996. Limnological studies of Amarga Lagoon, Chile: A saline lake in Patagonian South America. International Journal of Salt Research 4 : 301-314.
- Clark L S & Bowen S T. 1976. the genetic of *Artemia salina*. VII. Reproductive isolation. Journal of Heredity 67 (6): 385-388.
- Clague J. 1962. Free glycerol in dormant cysts of the brine shrimp *Artemia salina*, and its disappearance during development. Biological Bulletin 123: 295-301.
- Clegg J S. 1964. The control of emergence and metabolism by external osmotic pressure and the role of free glycerol in developing cysts of *Artemia salina*. Journal of Experimental Biology 41: 879-892.

- Clegg J S. 1974. Biochemical adaptations associated with the embryonic dormancy of *Artemia salina*. Transactions of the American Microscopical Society 93(4): 481-490.
- Clutter M E. 1978. Dormancy and Developmental Arrest. En: Clutter M. E., Ed. Academic Press, New York.
- Cohen R G. 1989 1991) "Sobre la presencia de palpo mandibular en ejemplares maduros de Anostraca (Crustacea: Branchiopoda)." Physis (Buenos Aires), Secc. B, 47(112):1-6.
- Cohen R G. 1995. Crustacea Anostraca 871-895. En: Ecosistemas de aguas continentales. Metodologías para su estudio. Lopretto, E. C. y G. Tell (Dirs.). Ediciones Sur.
- Cohen R G. 1998. "Anostraca": 491-501. En: Biodiversidad de Artrópodos argentinos. J.J. Morrone y S. Coscarón (Dirs.). Ediciones Sur. La Plata.
- Cohen R G & Amat F. 1998a. Visita prospectiva a la Laguna Las Tunas (Arias, Prov. de Córdoba). Informe de actividad 11.
- Cohen R G & Amat F. 1998b. Visita prospectiva a la Laguna de Mar Chiquita (Prov. de Córdoba). Informe de actividad 13.
- Cohen R G, Amat F, Hontoria F, Navarro J C. 1999a. Preliminary characterization of some Argentinean populations of the brine shrimp *Artemia* (Crustacea, Branchiopoda, Anostraca). Provinces of La Pampa and Buenos Aires. International Journal of Salt Lake Research 8: 329-340.
- Cohen R G, Rodriguez Gil S, Velez C G. 1999b. "The post-embryonic development of *Artemia persimilis* Piccinelli & Prosdocimi in laboratory culture". Hydrobiologia 391: 63-80.
- Cole L. 1954. The population consequences of life history phenomena. Quarterly Review of Biology 29: 103-137.
- Colihueque N & Gajardo G. 1996 a. Cytogenetic characterization of *Artemia* populations from Chile. En: Proceedings of a workshop on Fish and Mollusc Larviculture. Improvements of the Commercial Production of Marine Aquaculture Species: 187-193. G. Gajardo & P. Coutteau (eds.) Impresora Creces, Santiago, Chile.

- Colihueque N & Gajardo G. 1996 b. Chromosomal analysis in *Artemia* populations from South America. *Cytobios* 88: 141- 148.
- Conte F P, Hootman S R, Harris P J. 1972. Neck organ of *Artemia salina* nauplii: A larval salt gland. *Journal of Comparative Physiology* 80: 239-246.
- Conte F P, Peterson G L, Ewing R. D. 1973. Larval salt gland of *Artemia salina* nauplii: Regulation of protein synthesis by environmental salinity. *Journal of Comparative Physiology* 82: 277-289.
- Correa F & Tapia O. 1998. Reproductive behavior of *Artemia franciscana* (Kellogg, 1906) from San Quintin, Baja California, México. *Ciencias Marinas*. 24 (3): 295-301.
- Crespo J. 1999. On the reproduction of three *Artemia franciscana* (Kellogg, 1906) populations from South America (Crustacea, Anostraca). *Boletín de la Sociedad de Biología de Concepción*. (70): 37-43.
- Crespo J. 2002. Occurrence of *artemia* (branchiopoda, anostraca) in the "salinas el convento", central Chile. *Crustaceana* 74 (11): 1393-1395.
- Criel G. R. 1989. Morphological study of the ovary of *Artemia*: 99-129. *Cell and Molecular Biology of Artemia Development*. Warner, A., Mac Rae, T., and Bagshaw, J. C., Eds., Plenum Press,.
- Criel G R . 1991a. Morfology of *Artemia*: 119-153. En: Browne R. A.; Sorgeloos P. A.; Trotman C. N. A. (eds.). *Artemia Biology*. CRC press. Boca Raton, Florida.
- Criel G. R. 1991b. Ontogeny of *Artemia*: 155-185. En: Browne R. A.; Sorgeloos P. A.; Trotman C. N. A. (eds.).
- Croghan P C. 1958a. The osmotic and ionic regulation of *Artemia salina* (L.). *Journal of Experimental Biology* 35: 219-233.
- Croghan P C. 1958b. The mechanism of osmotic in *Artemia salina* (L.): The physiology of the branchiae. *Journal of Experimental Biology*. 35: 234-242.
- Cuellar O. 1990. Ecology of brine shrimp from Great Salt Lake, Utah, U.S.A. (Branchiopoda, Anostraca). *Crustaceana* (Leiden) 59(1) 1990: 25-34.
- Cuellar O. 1991. Probable parthenogenesis in a New World brine shrimp, *Artemia salina* (L., 1758) (Branchiopoda, Anostraca. *Crustaceana* (Leiden) 61(1) 1991: 103-105.

- D'agostino A & Provasoli L. 1968. Effects of salinity and nutrients on mono and diaxenic cultures of two strains of *Artemia salina*. Biological Bulletin 134(2):1-14
- Daly M. 1978. The cost of mating. American Naturalist 112: 771-774.
- Dana G L, Jellison R, Melack J M, Starrett G L. 1993. Relationships between *Artemia monica* life history characteristics and salinity. Hydrobiologia 263 (3): 129-143.
- Dimentman C. 1981. The rainpool ecosystems of Israel: geographical distribution of freshwater Anostraca (Crustacea). Israel Journal of Zoology 30: 1-15.
- Djunaidah I S, Wille M, Kontara E K, Sorgeloos P. 2001. Reproductive performance and offspring quality in mud crab (*Scylla paramamosaine*) broodstock fed different diets. EAS Special Publication 30: 162-165.
- Drago E & Quirós R. 1996. The hydrochemistry of the inland waters of Argentina: A review. International Journal of Salt Lake Research 4: 315–325.
- Drinkwater L E & Clegg J S. 1991. Experimental biology of cyst diapause: 93-117. En: *Artemia* Biology. Chapter 5. Browne, R. A., Sorgeloos, P. y Trotman C.N.A. (Eds.). CRC press, United States.
- Dutrieu J. 1960. Observations biochimiques et physiologiques sur le developpement d'*Artemia salina*. Archives de zoologie expérimentale et générale 99:1-134.
- Everitt B. 2001. Applied multivariate data analysis. Everitt B. S. and Dunn G. (eds). London: Arnold ; New York : Oxford University Press, 2nd ed.
- Fautrez J & Fautrez-Firlefyn N. 1971. Contribution a l'étude des glandes coquillieres et des coques de l'oeuf d'*Artemia salina*. Archives de biologie (Liège) 82: 41-83
- Fryer G. 1987. A new classification of the branchipod Crustacea. Zoological Journal of the Linnean Society 91: 357-383.
- Fryer G. 1996. Diapause, a potent force in the evolution of freshwater crustaceans. Hydrobiologia 320: 1-14.
- Gajardo G M & Beardmore J A. 1989. Ability to switch reproductive mode in *Artemia* is related to maternal heterozygosity. Marine Ecology Progres Series 55:191-195.
- Gajardo G M & Beardmore J A. 1993. Electrophoretic evidence suggests that the *Artemia* found in the Salar de Atacama, Chile, is *A. franciscana* Kellogg. Hydrobiologia 257(2): 65- 71.

- Gajardo G M & Beardmore J A. 2001. Coadaptation: lessons from the brine shrimp *Artemia*, "the aquatic *Drosophila*" (Crustacea; Anostraca). *Revista Chilena De Historia Natural* 74(1):65-72.
- Gajardo G, Colihueque N, Parraguez M, Sorgeloos P. 1998. International study on *Artemia*. LVIII. Morphologic differentiation and reproductive isolation of *Artemia* populations from South America. *International Journal of Salt Lake Research*. 7: 133-151.
- Gajardo G M, Da Conceicao M, Weber L, Beardmore J A. 1995. Genetic variability and interpopulational differentiation of *Artemia* strains from South America. *Hidrobiología* 302: 1-9.
- Gajardo G, Mercado C, Beardmore J A & Sorgeloos P. 1999. International study on *Artemia*. LX. Allozyme data suggest that a new *Artemia* population in southern Chile (50° 29'S; 73° 45'W) is *A. persimilis*. *Hydrobiologia* 405: 117-123.
- Games P & Howell A.. 1976. Pairwise multiple comparison procedures with unequal N's and/or variances: a Monte Carlo study. *Journal of Education Statistics* 1: 113-125.
- Garreau de Loubresse N. 1980. Overloading, crinophagy and autophagy in secretory cells of the shell glands in a crustacean. *Biologie Cellulaire* 39:63-90.
- Garcia-Ortega A, Verreth J A, Coutteau P, Segner H, Huisman E A; Sorgeloos, P. 1998. Biochemical and enzymatic characterization of decapsulated cysts and nauplii of the brine shrimp *Artemia* at different developmental stages. *Aquaculture* 161(1-4) (Special Issue): 501-514
- Gilchrist B M. 1960. Growth and form of the brine shrimp *Artemia salina* L. *Proceedings of Zoological Society of London* 134, 221-235.
- Guiñazú N. 1960. Por un mejor conocimiento de la *Artemia salina* (L.) de Mar Chiquita, Córdoba. *Actas y Trabajos 1er. Congr. Sudam. Zool. La Plata* 12-24 oct. 1959. T.II, Secc. III Invertebrados, La Plata.
- Halfer-Cervini A M, Piccinelli M, Prosdocimi T, Baratelli-Zambruni L. 1968. Sibling species in *Artemia* (Crustacea: Branchiopoda). *Evolution* 22: 373-381.
- Hanner R & Fugate M. 1997. Branchiopod phylogenetic reconstruction from 12S rDNA sequence data. *Journal of Crustacean Biology* 17(1): 174-183

- Hendry C I, Van Stappen G, Wille M, Sorgeloos P. 2001. Larvi 2001. 3rd fish & shellfish larviculture symposium. Gent, EAS Special Publication 30: i-xxi, 1-663.
- Herbst D B. 1988. Comparative population ecology of *Ephydra hians* Say (Diptera: Ephydriidae) at Mono Lake (California) and Abert Lake (Oregon). *Hidrobiología* 158: 145-166.
- Hildrew A G. 1895. A quantitative study of the life history of a fairy shrimp (Branchiopoda: Anostraca) in relation to the temporary nature of its habitat, a Kennyan rainpool. *Journal of Animal Ecology* 54: 99-110.
- Jawahar A & Brendonck L. 1995. Evaluation of agro-industrial wastes as diets for culture of fairy shrimp *Streptocephalus proboscideus* (Frauenfeld, 1873) (Crustacea: Branchiopoda: Anostraca) *Hidrobiologia* 298: 167-173.
- Küenen D. J. & Baas-Becking L G. 1938. Historical notes on *Artemia salina* (L.) *Zoologische Mededelingen* 20:222-230.
- Küenen D. J. 1939. Systematical and physiological notes on the brine shrimp *Artemia*. *Archives Néerlandaises de Zoologie* 3: 365-449.
- Legendre P. 1998. Numerical ecology. Amsterdam; New York: Elsevier, 2nd ed.
- Lavens P & Sorgeloos P. 1987. The cryptobiotic state of *Artemia* cysts, its diapause deactivation, and hatching: 27-63. En: *Artemia Research and its applications* (3). P. Sorgeloos, D.A. Bengtson, W. Decler & E. Jaspers (Eds.). Universa Press. Wetteren (Belgium).
- Lavens P & Sorgeloos P. 2000. The history, present status and prospects of the availability of *Artemia* cysts for aquaculture. *Aquaculture* 181: 397-403.
- Lent C M. 1971. Metachronal limb movements by *Artemia salina*: synchrony of male and female during coupling. *Science* 173. 1247-1248.
- Lent C M. 1977. The mechanism for coordinating metachronal limbs movements between joined male and female *Artemia salina* during precopulatory behavior. *Journal of Experimental Biology*. 66: 127-140
- Lenz P H. 1987. Ecological studies on *Artemia*: a review:5-18. *Artemia Research and its Applications* (3). Ecology, Culturing, use in Aquaculture. P. Sorgeloos, D. A. Bengtson, W. Decler, and E. Jaspers (Eds.). Universa Press, Wetteren, Belgium.

- Lenz P H & Browne R A. 1991. Ecology of *Artemia*: 237-253. En: Browne, R. A., Sorgeloos, P. y Trotman C.N.A. (Eds.). *Artemia* Biology. Chapter 10. CRC press, United States.
- van der Linden A, Blust R, Decler W. 1985. The influence of light on the hatching of *Artemia* cysts (Anostraca: Branchiopoda: Crustacea). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 92 (2-3): 207-214.
- Lochhead J H & Lochhead M S. 1940. The egg shells of the brine shrimp *Artemia*. *Anat Rec. Suppl.* 75,78.
- Lochhead J. 1941. *Artemia*, the "brine shrimp". *Turttox news* 19(2):1-4.
- Manly B F. 1997. Randomization, bootstrap and Monte Carlo methods in Biology. Chapman & Hall.
- Martin J W. 1992. Branchiopoda: 25-224 En: Harrison, F. W. (ed.), *Microscopic Anatomy of Invertebrates*, Wiley-Liss. Inc.
- McGarigal K. 2000. Multivariate statistics for wildlife and ecology research. McGarigal, K., Cushman S., Stafford S. (ed) New York : Springer.
- Mejia J C, Sanchez A M, Mejia G C, Barreray T C, Andrade R D. 1999. Reproductive pattern variation in two Mexican populations of *Artemia franciscana* (Branchiopoda: Anostraca) and comparison with the San Francisco Bay. *Revista De Biología Tropical* 47(1):99-104.
- Moore W & Ogren L H. 1962. Notes on the breeding behavior of *Eubbranchipus holmani* (Ryder). *Tulane Studies in Zoology* 9: 315-318.
- Morris J E. 1971. Hydration, its reversibility and the beginning of development in the brine shrimp *Artemia salina*. *Comparative Biochemistry Physiology*. 39A: 843-857.
- Munuswamy N & Sabramonian T. 1985. Influence of mating on ovarian and shell gland activity in a freshwater fairy shrimp *Streptocephalus dicotomus* (Anostraca) *Crustaceana* 49:225-232.
- Mura G. 1990. *Artemia salina* (Linnaeus, 1758) from Lymington, England: frontal knob morphology by scanning electron microscopy. *Journal of Crustacean Biology* 10(2): 364-368.
- Mura G. 1991. SEM morphology of resting eggs in the species of the genus *Branchinecta* from North America. *Journal of Crustacean Biology* 11:432-436.

- Mura G, Del Caldo L, Fanfani A. 1989. Sibling species of *Artemia*: a light and electron microscopic survey of the morphology of the frontal knobs. Part I. Journal of Crustacean Biology 9(3):414-419.
- Murugan G, Maeda-Martínez A, Criel G, Dumont H. 1996. Unfertilized oocytes in Streptocephalids: resorbed or released?. Journal of Crustacean Biology 16(1):54-60.
- Naihong X, Juju S, Zhang B, Triantaphyllidis G, Van Stappen G, Sorgeloos P. 1994. International study on *Artemia*. 51. New survey of *Artemia* resources in the People's Republic of China. International Journal of Salt Lake Research. 3:105-112.
- Naihong X, Juju S, Guizheng Z, Sorgeloos P. 1999. The effect of *Artemia* sources on growth, survival and salinity stress of crab (*Eriocheir sinensis*) larvae. Asian Fisheries Science 12(2):201-205.
- Narciso L. 1989. The brine shrimp *Artemia* sp.: an example of the danger of introduced species in aquaculture. EAS Special Publication 10: 183-184.
- Nghia T T, Wille M, Sorgeloos P. 2001. Influence of the content and ratio of essential HUFA's in the live food on larviculture success of the mud crab (*Scylla paramamosain*) in the Mekong Delta (Vietnam) EAS Special Publication 30: 430-433.
- Papeschi A G, Cohen R G, Pastorino X I, Amat F. 2000. Cytogenetic proof that the brine shrimp *Artemia franciscana* (Crustacea, Branchiopoda) is found in Argentina. Hereditas 2000;133(2):159-66.
- Pastorino X I, Marschoff E, Cohen R G. 2002. The reproductive and brood cycles of *Artemia persimilis* Piccinelli & Prosdocimi from Colorada Chica Lake (Province of La Pampa, República Argentina), both in paired or isolated females, under laboratory conditions. Hydrobiologia 486: 279-288.
- Piccinelli M. & Prosdocimi T. 1968. Descrizione tassonomica delle due specie *Artemia salina* L. e *Artemia persimilis* n.sp. Instituto Lombardo R.C.B. 102:113-118.
- Perez M L, Valverde J R, Batuecas B, Amat F, Marco R, Garesse R. 1994. Speciation in the *Artemia* genus: mitochondrial DNA analysis of bisexual and parthenogenetic brine shrimps. Journal of Molecular Evolution 38(2) : 156-168

- Polis G A & Farley R D. 1980. Population biology of a desert scorpion: survivorship, microhabitat, and the evolution of life history strategy. *Ecology* 61: 620-629.
- Prophet C W. 1963. Egg production by laboratory cultured Anostraca. *Southwest Naturalist* 8: 32-37
- Reati G J, Florin M, Fernandez G J, Montes C. 1997. The Laguna de Mar Chiquita (Cordoba, Argentina): a little known, secularly fluctuating, saline lake. *International Journal of Salt Lake Research* 5(3) 1996-1997: 187-219.
- de los Ríos P. 2000. Morphometric description of the *Artemia* (Leach, 1819) population of "El Convento" salt pond (Valparaiso, Chile). *Gayana* 64 (1) pp 79-82.
- de los Ríos P. 2001. Growth of *Artemia franciscana* and *A. persimilis* (Crustacea, Anostraca) under controlled conditions. *Revista de Biología Tropical*, 49 (2): 629-634.
- de los Ríos P & Zuñiga O. 2000. Biometric comparison of the frontal knob in american populations of *Artemia* (Anostraca, Artemiidae). *Revista Chilena De Historia Natural*, V73(N1):31-38.
- Rodríguez Gil S, Papeschi A G, Cohen R. G. 1998. Mitotic and meiotic chromosomes of *Artemia* (Branchiopoda) from populations of La Pampa province, Argentina. *Journal of Crustacean Biology* 18(1): 36-41.
- Rogers D Ch. 2002. The amplexial morphology of selected Anostraca. *Hidrobiología* 486: 1-18.
- Saint-Paul U. 1992. Status of aquaculture in Latin America. *Journal of Applied Ichthyology* 8:21-39.
- Schrehardt A. 1987. A scanning electron-microscope study of post-embrionic development of *Artemia*: 5-32. En *Artemia Research and its Applications* (1) Morphology Genetics, Strain Characterization, Toxicology. P. Sorgeloos, D.A. Bengston, W. Declier, and E. Jaspers (Eds). Universa Press, Wetteren, Belgium.
- Snell T & King C. E. 1977. Lifespan and fecundity patterns in rotifers: The cost of reproduction. *Evolution* 31: 882-890.
- Spears T & Abele L G. 1999. Phylogenetic relationships of crustaceans with foliaceous limbs: an 18S rDNA study of Branchiopoda, Cephalocarida, and Phyllocarida. *Journal of Crustacean Biology* 19(4) : 825-843.

- Spears T & Abele L G. 2000. Branchiopod monophyly and interordinal phylogeny inferred from 18S ribosomal DNA. *Journal of Crustacean Biology* 20(1) : 1-24
- Shepard W D & Hill R E. 2001. Anostracan cysts found in California salt lakes. *Hydrobiologia* 466: 149–158, 2001.
- Schram F R. 1986. Anostraca: 364-378 En: Schram, F. R. (ed.), *Crustacea.*, Oxford University Press, Oxford, Nueva York.
- Sokal R R & Rohlf J F. 1995. *Biometry*, 2nd edn. Freeman, San Francisco, CA, USA.
- Sorgeloos P. 1980. The use of the brine shrimp *Artemia* in aquaculture: 25-46. *The Brine Shrimp Artemia* (3). Ecology, culturing, use in aquaculture. Persoone G., P. Sorgeloos, O. Roels and E. Jaspers (Eds). Universa Press, Wetteren, Belgium.
- Sorgeloos P. 1985. Two strains of *Artemia* in Urmia lake (Iran). *Artemia Newsletter* 13,5.
- Sorgeloos P. 1987. Brine shrimp *Artemia* in coastal saltworks: hydrobiological key to improved salt production; inexpensive food for vertically integrated aquaculture. En: *Proc. International Symposium on Saltworks Convención for Aquaculture*, D'Amelio, V. Y Santulli, A. (eds.) , Libera Università Trapani.
- Sorgeloos P. 1989. *Artemia Newsletter*, No. 12, *Artemia Reference Center*, State University of Ghent, Belgium.
- Sorgeloos P. 1995. *Artemia* cyst shortage: the *Artemia* Reference Center point's of view. *Larviculture and Artemia newsletter*. 35,19
- Sorgeloos P & Sweetman J. 1993. Aquaculture success stories. *World Aquaculture* 24: 4-14.
- van Stappen G. 1997. *Artemia*. Introduction, biology and ecology of *Artemia*: 79-106. En: *Manual on the production and use of live food for aquaculture*. FAO Fisheries Technical Paper N° 361. Rome. FAO.
- van Stappen G & Sorgeloos P. 1993. The cosmopolitan brine shrimp. *Infophis int.* 4:45-50.
- van Stappen G, Fayazi G, Sorgeloos P. 2001. International study on *Artemia* 63. Field study of the *Artemia urmiana* (Günther, 1890) population in Lake Urmiah, Iran. *Hydrobiologia* 466: 133–143.

- Stearns S C. 1977. Evolution of life history trait: a critique of the theory and a review of the data. *Annual Review of Ecology and Systematics* 8: 145-171.
- Sun Y, Song W Q, Zhong Y C, Zhang R S, Abatzopoulos T J, Chen R Y. 1999. Diversity and genetic differentiation in *Artemia* species and populations detected by AFLP markers. *International Journal of Salt Lake Research* 8: 341–350.
- Thiéry A, 1987. Les crustacés Branquiopodes Anostraca, Notostraca & Conchostraca des mllieux limniques temporaires (Dayas) au Maroc. Taxonomie, biogeographie, Ecologie. Thèse Doctorat es-Ciences. Université Aix-Amrsielle III. Marsielle.
- Thiéry A & Gasc C. 1991. Resting eggs of Anostraca, Notostraca and Spinicaudata (Crustacea, Branchiopoda) occurring in France: identification and taxonomical value. *Hydrobiologia* 212: 245–259.
- Thiery A & Robert F. 1992. Bisexual populations of the brine shrimp *Artemia* in Sete-Villero y and Villeneuve saltworks (Languedoc, France). *International Journal of Salt Lake Research* 1(1): 47-63
- Torrentera L & Belk D. 2002. New penis characters to distinguish between two American *Artemia* species. *Hydrobiologia*. 470. 15: 149-156.
- Torrentera L. & Dodson S. 1995. Morphological diversity of populations of *Artemia* (Branchiopoda) in Yucatán. *Journal of Crustacean Biology* 15(1): 86-102.
- Triantaphyllidis G V, Pilla E, Thomas K, Abatzopoulos T J, Beardmore J A, Sorgeloos P. 1994. International study on *Artemia*. 52. Incubation of *Artemia* cyst samples at high temperature reveals mixed nature with *Artemia franciscana* cysts. *International Journal of Salt Lake Research* 3(1) 1994: 105-112
- Triantaphyllidis G V, Pouloupoulou K, Abatzopoulos T J, Perez C, Pinto A, Sorgeloos P. 1995. International study on *Artemia* 49. Salinity effects on survival, maturity, growth, biometrics, reproductive and lifespan characteristics of a bisexual and a parthenogenetic population of *Artemia*. *Hydrobiologia* 302(3): 215-227
- Triantaphyllidis G V, Criel G R J,. Abatzopoulos T J, Thomas K M, Peleman J, Beardmore J A, Sorgeloos P. 1997. International Study on *Artemia*. 57. Morphological and molecular characters suggest conspecificity of all bisexual European and North African *Artemia* populations. *Marine Biology* 129: 477-487.

- Triantaphyllidis G V, Abatzopoulos T J, Sorgeloos P. 1998. Review of the biogeography of the genus *Artemia* (Crustacea, Anostraca). *Journal of Biogeography* 25: 213-226.
- Tyson G E & Sullivan M L. 1979. Scanning electron microscopy of the frontal knobs of male brine shrimp.. *Transactions of the American Microscopical Society* 99: 167-172
- Vanhaecke P. & Sorgeloos P. 1983. International Study on *Artemia* 19. Hatching data for 10 commercial source of brine shrimp cysts and revaluation of the "hatching efficiency concept". *Aquaculture* 30(1-4): 43-52
- Vanhaecke P, Siddall S E, Sorgeloos P. 1984. International Study on *Artemia* 32. Combined effects of temperature and salinity on the survival of *Artemia* of various geographical origin. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 80: 259-275.
- Vanhaecke P, Tackaert W, Sorgeloos P. 1987. The biogeographie of *Artemia*: an update review. En *Artemia Research and its Applications* (1): 129-155. Morphology Genetics, Strain Characterization, Toxicology. P. Sorgeloos, D.A. Bengston, W. Declier, and E. Jaspers (Eds). Universa Press, Wetteren, Belgium.
- Vekhov N V & Vekhova T P. 1993. Ethological peculiarities of *Artemia salina* (L.) in the reproduction period. *Gidrobiologicheskii Zhurnal (Kiev)* 29 (6): 29-36.
- Vu Do Quynh, Lavens P, Leger P, Tackaert W, Sorgeloos P. 1988. Characterization of brine shrimp *Artemia* from Cam Ranh Bay in central Vietnam. *Hydrobiologia* 157(3): 209-217
- Walošsek D. 1995. The upper Cambrian *Rehbachella*, its larval development, morphology and significance for the phylogeny of Branchiopoda and Crustacea. *Hydrobiologia* 298: 1-13.
- Wayne A. & Gliwicz Z. 2001. Limnological control of brine shrimp population dynamics and cyst production in the Great Salt Lake, Utah. *Hydrobiologia* 466: 119–132, 2001.
- Wear R G & Haslett S J. 1986. Effects of temperature and salinity on the biology of *Artemia franciscana* (Kellogg) from Lake Grassmere, New Zealand. 1 Growth and mortality. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 98:153–166.

- Wear R G, Haslett S J, Alexander N K. 1986. Effects of temperature and salinity on the biology of *Artemia franciscana* (Kellogg) from Lake Grassmere, New Zealand. 2. Maturation, fecundity, and generation times. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 98, 167–183.
- Williams W D, Boulton A J, Taaffe R G. 1990. Salinity as a determinant of salt lake fauna: a question of scale. *Hidrobiología* 1997: 257-266.
- Williams W D. 1996. The largest, highest and lowest lakes of the world: Salines lakes. *Internationale Vereinigung fuer Theoretische und Angewandte Limnologie Verhandlungen* 26: 61-71.
- Williams W D. 2000. Biodiversity in temporary wetlands of dryland regions. *Internationale Vereinigung fuer Theoretische und Angewandte Limnologie Verhandlungen*. 27: 167-172.
- Wingstrand K G. 1978. Comparative spermatology of the crustacea Entomostraca 1. Subclass Branchiopoda. *Kongelige Danske Videnskabernes Selskab Biologiske Skrifter* 22(1): 1-67.
- Wolfe A F. 1980. A light and electron microscopic study on the frontal knob of *Artemia* (Crustacea, Branchiopoda) 117-130. Persoone, G; Sorgeloos, P; Roels, O; Jaspers, E [Eds]. *The brine shrimp Artemia*. (1). Morphology, genetics, radiobiology, toxicology. Universa Press, Belgium. 1980: i-xxvii, 1-318.
- Yaneng C & Lan G. 1992. Comparative study of the male clasper and its frontal knob of four species of *Artemia* *Journal of Ocean University of Qingdao* 22(1) : 90-96.
- Zar J H. 1999. *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall, NJ, USA.
- Zmora O, Avital E, Gordin H. 2002. Results of an attempt for mass production of *Artemia* in extensive ponds. *Aquaculture* 213: 395–400
- Zuñiga O, Wilson R, Amat F, Hontoria F. 1999. Distribution and characterization of Chilean populations of brine shrimp *Artemia* (Crustacea, Branchiopoda, Anostraca). *International Journal of Salt Research*. 8 : 23-40.