شناسایی مولکولی Artemia franciscana Kellogg 1906 در دریاچه بختگان، استان فارس

سپیده شفائی[1*و5]، صمد زارع[2]، رامین مناف فر[3] و آفاق فلاحتی[4]

تاریخ دریافت: 91/07/03 تاریخ پذیرش: 92/04/05

1-دانشجوی کارشناسی ارشد گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه

2- عضو هیات علمی گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه

3- عضو هیات علمی پژوهشکده آرتمیا و جانوران آبزی، دانشگاه ارومیه

4- دانشجوی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بندرعباس، گروه شیلات، بندرعباس، ایران

5- عضو باشگاه پژوهشگران جوان

*. مسئول مکاتبه: E-mail: s.shafaie87@yahoo.com

چکیده

آرتمیا سخت پوست کوچکی با ارزش اقتصادی بالاست که مدل تحقیقاتی بسیار مناسبی برای محققان می باشد. این موجود با تحمل محدوده های بسیار متنوع از شرایط بسیار مختلف اکولوژیک در بیش از 600 نقطه زمین و نیز 18 زیستگاه در ایران توزیع شده است. دریاچه بختگان در استان فارس یکی از زیستگاههای طبیعی آرتمیای پارتنوژنز در ایران می باشد. با توجه به وجود یک آرتمیای دو جنسی ناشناخته در این دریاچه، گونه این جمعیت غیر بومی مورد تحقیق قرار گرفت. بدین منظور 4 مارکر مولکولی مختلف شامل دو ژن *Na/K ATPase*، *12S-16S* با روش پی سی آر- آر اف ال پی[1] و دو ناحیه *COI* و *HSP26* به روش تعیین توالی مورد تحقیق قرار گرفت. *DNA* مورد نیاز از نمونه های سیست جمع آوری شده از دریاچه و همچنین آرتمیای بالغ پرورش یافته در آزمایشگاه تهیه شد. نتایج ضمن تاکید بر توانایی روشهای مولکولی جهت شناسایی یک گونه ناشناخته، این گونه را به عنوان *A. franciscana* شناسایی نمود که از نظر توالی ژنهای سکانس شده تنوع ژنتیکی زیادی با تمامی نمونه های ثبت شده در بانک ژنی دارد.

کلمات کلیدی: آرتمیا، پارتنوژنز، دریاچه بختگان، مارکرهای مولکولی.

[1]. PCR-RFLP

Molecular Characterization Artemia Franciscana Kellogg 1906 in Bakhtegan Lake, Fars Province

S Shafaie[1*,5], S Zare[2], R Manaffar[3] and A Falahati[4]

Received: September 24, 2012 Accepted: June 26, 2013
1MSc student of Biology Department , Faculty of Science, Urmia University, Iran
2Prof of Biology Department , Faculty of Science, Urmia University, Iran
3Prof of Artemia and Aquatic Animals Research Institute, Urmia University, Iran
4MS student of Fishery Branch, Islamic Azad University, Bandar abass, Iran
5Member of Young Researchers Club.
Corresponding author E-mail: s.shafaie87@yahoo.com

Abstract

Artemia is a small crustacean with high commercial value that provides a valuable model organism for researchers. This creature was dispersed to more than 600 and 18 sites over the world and Iran, respectively, by tolerating extreme range of different environmental conditions. Bakhtegan Lake is one the natural parthenogenetic *Artemia* habitat in Iran. Due to occurrence of an unknown bisexual *Artemia* in Bakhtegan Lake, the species of this un-endemic *Artemia* was inferred. In this regard, four different molecular markers as Na/K ATP-ase, 12S-16S by PCR-RFLP technique and COI, HSP26 by were studied. *The DNA was provided from the harvested cysts and reared adult Artemia in laboratory conditions.* The results with emphasizing to ability of molecular techniques for identifying unknown species characterized the new population as *A. franciscana.* These analyses also revealed a molecular diversity between the sequenced genes with the all data found in the Genbank.

Keywords: *Artemia*, Parthenogenetic, Bakhtegan Lake, *Molecular markers.*

مقدمه

آرتمیا سخت پوست کوچکی است که در بخش های مختلفی از جهان به جز قطب جنوب یافت می شود (ون استاپن و همکاران 2002). آرتمیا پالیده خواری غیرانتخابی است که به منظور جلوگیری از شکار شدن و احتراز از رقابت با سایر پالیده خواران به دلیل دارا بودن سازش های فیزیولوژیک خاص مانند قابلیت سنتز هموگلوبین، تولید سیست مقاوم، سیستم تنظیم فشار اسمزی بسیار موثر به زندگی در آب های شور و بسیار شور سازش یافته است. در حقیقت در بین جانوران پرسلولی، آرتمیا تنها جانوریست که قادر است شوری های بالا (تا 300 گرم نمک در لیتر) را تحمل نماید (براون 1992). علاوه بر ارزش غذایی بسیار بالای این موجود (اسیدهای چرب و پروتئین های لازم)، آرتمیا یک مدل تحقیقاتی مناسبی برای آزمایش های مولکولی و تکاملی می باشد(منا ف فر 2012). جنس آرتمیا دارای 6 گونه دو

جنسی و یک سویه پارتنوژنز می باشد (ون استاپن 2008). هر یک از این جمعیت ها بر اساس ویژگی های مولکولی و سازش های ژنتیکی، به اقلیم ها و زیستگاه های متفاوتی سازش یافته اند اولین مقاله رسمی در سال 1915 تنها به 80 منطقه بعنوان زیستگاه آرتمیا اشاره کرده است (آبونی 1915) در حالیکه در آخرین لیست ارائه شده در سال 2002 حدود 600 منطقه جغرافیایی برای پراکندگی آرتمیا معرفی شده است (ون استاپن و همکاران 2002). به هر حال این لیست به دلیل پراکندگی سریع آرتمیا در اقصی نقاط کره زمین و همچنین کشف مناطق جدید به واسطه توسعه تحقیقات علمی و از سویی انقراض آرتمیا در برخی مناطق (مانند منطقه لیمینگتن انگلستان و دریاچه شورابیل ایران) که زیستگاه ها و پراکندگی انواع آرتمیا را دستخوش تغییر نمایند دائما در حال تغییر و به روزرسانی است (ون استاپن 2008).

تا کنون 18 سایت مختلف آرتمیا در ایران گزارش شده است (آباتزوپولوس و همکاران 2006 و آق 2007 و عاصم و همکاران 2009) که غیر از دریاچه ارومیه بقیه این سایتها دارای آرتمیای بومی پارتنوژنز می باشند. دریاچه بختگان با مساحت 3120 کیلومتر مربعی که در 80 کیلومتری شرق شیراز قرار گرفته، به عنوان یکی از زیستگاه های آرتمیای پارتنوژنز ایران در استان فارس می باشد. موقعیت جغرافیایی این دریاچه 53 درجه، 50 دقیقه، عرض شمالی و 29 درجه، 40 دقیقه طول شرقی گزارش شده است (آق 2007) (شکل1). دمای دریاچه نیز که با ترموایزوپلت های منطقه تطابق دارد، در طول سال بین کمتر از 5 درجه تا بیش از 40 درجه و حتی در لجن زار ها تا 45 درجه سانتی گراد هم میرسد (علمداری و همکاران 1987). شناخته شدن این دریاچه به عنوان دریاچه ای لب شور، این دریاچه را به زیستگاهی مناسب برای آرتمیای بکرزا تبدیل کرده است ولی امروزه به دلیل تغییر اقلیم، کاهش نزولات جوی و در پی کاهش ورودی آب رودخانه کر به دریاچه بختگان، این دریاچه را بیش از پیش در معرض خشکسالی قرار داده است (اسعدی و همکاران 1389). تاریخ اولین گزارش آرتمیای پارتنوژنز در دریاچه معلوم نیست اما در سالهای 2007، 2002، 1984 و1980 چندین گزارش از وجود آرتمیای پارتنوژنز در این دریاچه به ثبت رسیده است (گدس 1980 و براون و همکاران، 1984 و ون استاپن و همکاران 2002 و آق 2007).

A. franciscana به عنوان یکی از گونه های دو جنسی بسیار مهم در دنیا (با فراوانی بسیار زیاد) گونه غالب دریاچه بزرگ نمک آمریکا می باشد که از 74 منطقه در سرتاسر جهان گزارش شده است (ون استاپن 2002). در حقیقت قدرت سازش بالا و سریع این گونه در زیست بوم های جدید سبب گردیده تا در اکثر کشورها این گونه برای پرورش تجاری انتخاب شود (آمات و همکاران 2007). توانایی سازش مولکولی و فیزیولوژیک *A. franciscana* به دامنه وسیعی از شرایط اکولوژیک و همچنین سرعت رشد و قدرت تولید مثل بالای این آرتمیا سبب شده است که این گونه بتواند به سادگی در اقصی نقاط کره زمین پراکنده شود (کاپاس و همکاران 2004).

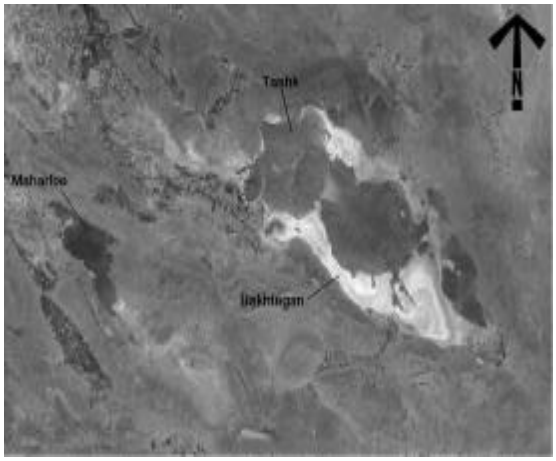
در راستای بررسی تنوع گونه ای آرتمیا، روشهای مختلف مورفومتریک و مولکولی معرفی شده است. پیش از این کارایی ژنوم میتوکندریایی به عنوان گزینه ای مناسب جهت شناسایی تاکسونهای نامعین، بررسی گونه زایی و حتی شناسایی جمعیتهای آرتمیا مورد تائید قرار گرفته بود (آویس 2000 و بوسیر و همکاران 2004). همچنین اخیرا یک روش مولکولی جهت شناسایی سویه پارتنوژنز آرتمیا از سویه دو جنسی آن ارائه گردیده که می تواند به سادگی جهت جدا سازی این دو سویه از یکدیگر مورد استفاده قرار گیرد (مناف فر و همکاران 2011).

با توجه به اینکه *A. urmiana* تنها آرتمیای دو جنسی بومی ایران می باشد و تاکنون فقط وجود آرتمیای پارتنوژنز در دریاچه های طبیعی داخلی ایران (به ویژه دریاچه بختگان) گزارش شده بود، به دلیل

مشاهده جمعیت کثیری از آرتمیای دو جنسی در داخل دریاچه بختگان، شناسایی سویه و گونه آرتمیای مشاهده شده در این دریاچه به عنوان هدف اصلی اجرای این تحقیق در نظر گرفته شد.

مواد و روش‌ها

سیست آرتمیا در اسفند ماه سال 1390 از چهار نقطه متفاوت از دریاچه بختگان برداشت شد (شکل 1). سیست های فوق پس از شستشو و خالص سازی در شرایط استاندارد آزمایشگاهی که شامل آب دریاچه ارومیه رقیق شده تا شوری 35 گرم در لیتر، دمای 27 درجه سانتیگراد و pH= 8 مجهز به سیستم هوادهی و نور کافی تفریخ یافتند (لاونس و سورگلوس 1996). با توجه به اینکه در مراحل اولیه رشد آرتمیا جنسیت و سویه آرتمیا (پارتنوژنز و یا دوجنسی بودن) لاروها با از نظر ویژگیهای موفولوژیک قابل شناسایی نیست لذا در این مرحله بصورت تصادفی به تعداد 500 ناپلیوس اینستار 1 پس از شمارش به درون بطری های یک لیتری واجد آب شور 80 گرم در لیتر در 4 تکرار منتقل شده و به مدت 20 روز با ترکیبی از مخمر غنی شده با اسید چرب و جلبک تک سلولی *Dunaliella salina* پرورش یافتند (کوته و همکاران 1992).



شکل 1- موقعیت دریاچه بختگان در نزدیکی دریاچه های طشک و مهارلو.

بررسی های مولکولی

ژنوم سیست های آرتمیا از هر نمونه سیست منفرد با استفاده از روش چلکس[1] استخراج شدند (استاپ و همکاران 1996). جهت استخراج ژنوم از نمونه های آرتمیای بالغ از روش سی تب[2] استفاده شد (دویله و دویله 1990).

در راستای بررسی سویه و گونه آرتمیای بیگانه دریاچه طشک، 20 عدد نمونه (سیست و آرتمیای بالغ) مورد استفاده قرار گرفت. بدین منظور قطعات ژنی Na/K ATPase (قطعه‌ای از ژنوم هسته‌ای جهت تشخیص دوجنسی یا پارتنوژنز) (مناف فر و همکاران 2011) و 12s-16s (قطعه‌ای از ژنوم میتوکندریایی بمنظور تشخیص گونه آرتمیا) استفاده شد (بوسیر و همکاران 2004). برنامه پی سی آر[3] و همچنین آغازگرهای مورد استفاده به ترتیب زیر می‌باشند. آغازگرهای هر کدام از ژن‌ها بدین صورت بودند: آغازگر پیشرو ژن Na–K aseATP '5-cag-cca-aac-gta-tgg-ctt-c-3' و آغازگر معکوس '5-gaa-ttc-agc-acg-act-gca-aag-3' و آغازگر پیشرو ژن 12S-16S که شامل '5-cta-tta-gat-acc-cta-3' آغازگر معکوس '5-ccg-gtc-tga-act-cag-atc-3'. بدین منظور برنامه بکار رفته در مورد این ژنها Na/KATPase دمای 94 درجه به مدت 2 دقیقه (مرحله واسرشت شدن اولیه) 35 سیکل حرارتی شامل 94 درجه به مدت 25 ثانیه (واسرشته شدن) 56 درجه به مدت 25 ثانیه (اتصال پرایمرها) 72 درجه به مدت 1 دقیقه (بسط) و 72 درجه 3 دقیقه ای برای بسط نهایی انجام گرفت.

برای ژن 12S-16S بادمای 94 درجه برای20 دقیقه، 34 سیکل حرارتی شامل سه مرحله یعنی 94 درجه به مدت 1 دقیقه و 15 ثانیه، 45 ثانیه بادمای 52

[1]. Chelex
[2]. CTAB
[3]. PCR

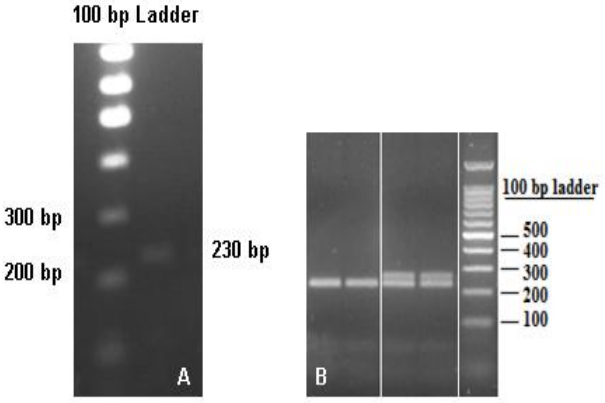
درجه، 72 درجه 2 دقیقه ای و نهایتا یک دوره 4 دقیقه ای می باشد.

به منظور تکثیر قطعه COI، ژن میتوکندریایی، از آغازگرهای اختصاصی این ژن که شامل آغازگر پیشرو 5'-ggt-aca-atc-ata-aag-ata-tgt-g-3' و آغازگر معکوس 5'-act-tca-ggg-tga-cca-aaa-aat-ca -3'-taa استفاده شد. برای تکثیر قطعه ی HSP 26 از آغازگر پیشرو 5'-gga-gaa-gaa-tga-gaa-g-3' و آغازگر معکوس 5'-ctt-tgg-acg-tgt-cca-tat-tc-3'-tct استفاده شد. برنامه دمایی بکار رفته برای ژن COI شامل دمای 95 درجه به مدت 3 دقیقه (مرحله واسرشت شدن) 33 سیکل حرارتی شامل 95 درجه به مدت 1 دقیقه (واسرشته شدن) 50 درجه به مدت 1 دقیقه (اتصال پرایمرها) 72 درجه به مدت 1 دقیقه و 20 ثانیه (بسط) و یک بسط نهایی بمدت 10 دقیقه برای ژن فوق انجام گرفت. این برنامه برای ژن HSP 26 شامل دمای 94 درجه به مدت 2 دقیقه، دمای 94 درجه به مدت 15 ثانیه، دمای 54 درجه به مدت 1 دقیقه و30 ثانیه، 72 درجه 30 ثانیه ای و 72 درجه ی نهایی به مدت 4 دقیقه صورت گرفت. محصول پی سی آر[1] در تمامی آزمایش ها با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز 2% و دستگاه عکس برداری از ژل مدل ژل فلاش مورد بررسی قرار گرفت. پس از تائید کیفیت محصول فوق در روش آر اف ال پی[2]، اگزون 7 ژن Na/K ATP-ase توسط آنزیم *Tru*1I و قطعه ژن 12s-16s توسط آنزیم *Hpa II* براساس دستور العمل کارخانه برش داده شده و برروی ژل آگارز 2% بررسی شد. به منظور تعیین توالی ژنهای HSP26 و COI تعداد 4 نمونه از هر ژن که باندهای با کیفیت بالا داشتند جهت تعیین سکانس به شرکت سیناژن-ایران ارسال شد (فولمر و همکاران 1994 و کویی و همکاران 2006) .

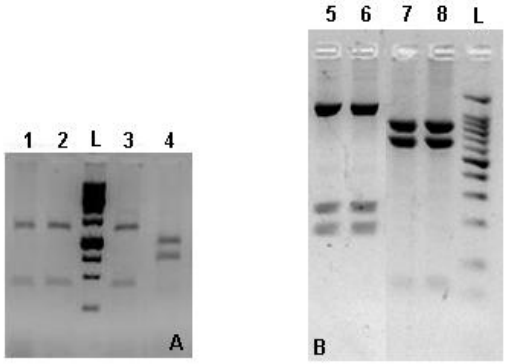
نتایج

بررسی باندهای الکتروفورزی مربوط به قطعه 700 جفت بازی از ژن سیتوکروم اکسیداز و نیز قطعه 217 جفت بازی مربوط به ژن شوک حرارتی HSP26 نشان داد مطابقت کاملی بین اندازه باندهای تولید شده با گزارش های موجود در بانک ژنی و منابع وجود دارد. برش آنزیمی قطعه ی 280 جفت بازی از ژنوم هسته ای تولید شده توسط آنزیم *Tru*1I نشان داد الگوی برش ایجاد شده در نمونه های آرتمیای دریاچه بختگان دقیقا مشابه الگوی آرتمیای دو جنسی می باشد (شکل 2). جهت بررسی گونه آرتمیا همانطور که پیش تر اشاره شد از برش آنزیمی قطعه 1500 جفت بازی ژنوم میتوکندریایی 12S-16S استفاده شد. برش آنزیمی توسط آنزیم محدودکننده *Hpa*II از نظر الگوی برش آنزیمی شکل پروفایلی *A. franciscana* را ایجاد نمود (شکل 3). بررسی نتایج سکانس توسط جستجوی اینترنتی بانک ژنی توسط نرم افزار بلاست[3] (مناف فر و همکاران 2011) نیز بر این نکته تاکید نمود که آرتمیای دو جنسی مورد تحقیق متعلق به گونه آرتمیای دو جنسی آمریکا *A. franciscana* می باشد لیکن بیش از 30% اختلاف مولکولی در ساختار این ژن با تمامی نمونه‌های ثبت شده در بانک ژنی مربوط به A. franciscana مشاهده شد.

[1]. PCR
[2]. RFLP
[3]. Blast



شکل 2- ژل آگارز مربوط به برش آنزیمی قطعه 280 جفت بازی ناحیه Na/K ATP-ase. شکل A): باند 230 جفت بازی تولید شده از نمونه های آرتمیای بختگان شکل B): ژل رفرنس گرفته شده از مناف فر و همکاران، 2011 الگوی برش دو باندی مربوط به آرتمیای پارتنوژنز و الگوی تک باندی نشانگر آرتمیای دو جنسی می باشد.



شکل 3- ژل آگارز مربوط به الکتروفورز قطعه 1500 جفت بازی ناحیه 12S-16S پس از برش آنزیمی توسط آنزیم *Hpa* II. به ترتیب شکل A): برش آنزیمی قطعه فوق در آرتمیای مشکوک دریاچه بختگان (نمونه های 1 و 2) و نمونه های شاهد (3 : *A. franciscana* و 4: *A. sinica*) با مارکر 1 کیلو جفت بازی و شکل B): ژل رفرنس گرفته شده از بوسیر و همکاران، 2004 ، نمونه 6-5 مربوط به *A. franciscana* و نمونه 8-7 مربوط به نمونه *A. sinica* با مارکر 100 جفت بازی می باشد.

بحث

مطالعه حاضر اولین گزارش مشاهده *A. franciscana* به عنوان یک گونه دو جنسی جدید در دریاچه بختگان از استان فارس محسوب می شود. پیش از این بررسی های علمی دقیقی وجود *A. franciscana* را در فلات ایران (زیستگاههای طبیعی آرتمیا) مورد تائید قرار داده بودند (مناف فر و همکاران 2008). در طی این تحقیق سعی شد از تکنیکهای جدید که در طول سالهای اخیر به پیش بینی الگوهای تمایز ژنتیکی و گسترش تنوع در چندین موجود با خطای ناچیز می پردازد استفاده شود (چاو و همکاران 2006).

بر اساس نتایج حاصل شده دو مارکر استفاده شده در این تحقیق قادر به شناسایی دقیق سویه و گونه آرتمیای بیگانه گردیدند لیکن تعیین توالی ژنهای سیتوکروم اکسیداز و همچنین پروتئین شوک حرارتی کوچک و بررسی توالی آن با نمونه های بانک ژنی بیش از 30% اختلاف ژنتیکی آرتمیاهای آزمایش شده با نمونه های موجود در سایت فوق را نشان می دهد. این اختلاف همانطور که قبلا نیز توضیح داده شد، می تواند در اثر حضور موفق آرتمیای دو جنسی در داخل دریاچه بختگان حاصل شده باشد. البته تاثیر پدیده های دیگری همچون اثر یابنده[1] و تغییر رانش ژنتیکی[2] را نیز نباید نادیده گرفت (کاپاس و همکاران 2004). سازش مولکولی ایجاد شده به هر صورتی که باشد بایستی به این نکته مهم اشاره نمود که این جمعیت جدید توانسته است با موفقیت خود را در دریاچه بختگان سازگار نماید.

در خصوص شیوه احتمالی انتقال این گونه آرتمیا به دریاچه بختگان باید اشاره نمود با وجود اینکه تخم آرتمیا عموما توسط باد و پرندگان آبزی انتقال می یابد (پرسون و سورگلوس 1980)، اما از دهه 70 میلادی تاکنون انسان عموما مسئول پراکنش آرتمیا بویژه *A. franciscana* بوده است. با توجه به گزارش پیشین در خصوص ذخیره سازی انسانی این گونه در دریاچه مهارلو و طشک (حسینی و زارع 1391) و نظر به نزدیکی این سه دریاچه، حدس زده می شود که *A.*

---
1. Founder effect
2. Genetic drift

franciscana توسط پرندگان از دریاچه مهارلو به دریاچه بختگان انتقال یافته است.

لازم به ذکر است که این آرتمیا بالاترین سطح انعطاف پذیری فنوتیپی و ژنتیکی را نشان داده و با سرعت زاد و ولد بسیار بالا، سازش سریع به شرایط سخت و تطابق مولکولی با محیط به طور موفقی در آسیا، اروپا و آمریکا توزیع شده و اغلب موجب حذف آرتمیای بومی نیز شده است (براون و همکاران 1988 و کاپاس و همکاران 2004 و پوگ 2006). با انتقال این گونه در دهه 1970 به جزایر اقیانوس آرام و برزیل اعلام شد که گونه فوق محتملا جایگزین سایر گونه ها منجمله *A. salina* خواهد شد (ون استاپن و همکاران، 2002). اما اولین گزارش رسمی مبنی بر قدرت تهاجمی *A. franciscana* مربوط به کامارا در سال 2001 است که این گونه را در شمال برزیل گزارش نموده است. چنین گزارشهایی همچنین در پرتغال (آمات و همکاران 2005)، فرانسه (تیری 1992)، مصر (تریان تافیلیدیس و همکاران 1998) ، ایتالیا (مورا و همکاران 2004)، اسپانیا و مراکش (آمات و همکاران 2007) به ثبت رسیده است. تحقیقات انجام شده توسط کاپاس در سال 2004 بر روی *A. franciscana* غیر بومی در ویتنام نشان داد که بین *A. franciscana* بومی آمریکا و آرتمیای تجاری ویتنام که بیش از 10 سال پیش به ویتنام انتقال داده شده بودند، تفاوت های مولکولی قابل ملاحظه ای مشاهده می شود.

لازم به ذکر است که استقرار دائمی جمعیت های غیر بومی آرتمیا در سطح جهان و گسترش توزیع *A. franciscana* در دنیا یکی از موضوعات مورد توجه در سالهای اخیر بوده است (آمات و همکاران 2005 و گرین و همکاران، 2005 و آباتزوپولوس و همکاران 2006 و مورا و همکاران 2006).

در حال حاضر *A. franciscana* به عنوان جمعیت غالب در غرب دریای مدیترانه، معدن های استخراج نمک در پرتغال، ساحل مدیترانه ای فرانسه و خلیج Cadiz اسپانیا مطرح است (آمات و همکاران 2005). تحقیق فوق گزارش می دهد که *A. franciscana* در عرض چند سال قادر شده است جمعیت بومی را بصورت رقابتی از محیط حذف نماید (آمات و همکاران، 2005 و گرین و همکاران، 2005 و آمات و همکاران 2007). تحقیقات میدانی در ایران نیز نشان داده است که در آبگیر نوق رفسنجان (که پیش از این یک زیستگاه طبیعی برای آرتمیا پارتنوژنز بود) *A. franciscana* قادر شده است در مدتی کمتر از 4 سال در رقابت با جمعیت آرتمیای بکرزا به یک جمعیت غالب تبدیل شود (آباتزوپولوس و همکاران 2006).

با توجه به نتایج تحقیق حاضر در خصوص تنوع ژنتیکی مشاهده شده در *A. franciscana* و همچنین توانایی بالقوه این آرتمیا بیم آن می رود که این گونه بتواند تهدیدی برای حذف جمعیت پارتنوژنز بومی باشد.

منابع مورد استفاده

اسعدی ر ،سردشتی م ،کرمی م و گلزارخرم ی،1389.گزارش بازدید از تالاب های طشک،مهارلو وبختگان .تحت نظارت وزارت نیرو.صفحه دوم.

حسینی ل و زارع ص. 1391. سازگاری مولکولی در *Artemia franciscana*, Kellog 1906 پس از 10 سال حضور در زیستگاه جدید (دریاچه مهارلو، استان فارس). زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس. دوره 3، شماره 1، تابستان 1391.

Abatzopoulos TJ, Agh N, Van Stappen G, Razavi Rouhani SM and Sorgeloos P, 2006. *Artemia* sites in Iran. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 86, 299-307.

Abonyi A, 1915. Experimentelle Daten zum Erkennen der *Artemia*- Gattung. Zeitschrift fur Wissenschafliche Zoologie 114, 95-168.

Agh N, 2007. Characterization of *Artemia* population from Iran. PhD thesis. Ghent University, Belgium, P 8-16.

Alamdari A, 1987. Limnology and preserving of ecologic dynamic of Bakhtegan wetland.

Amat F, Hontoria F, Ruiz O, Green AJ, Sanchez MI, Figuerola J, Hortas F, 2005. The American brine shrimp as an exotic invasive species in the western Mediterranean, Biological Invasions 7, 37-47.

Amat F, Hontoria F, Navarro JC, Vieira N and Mura G, 2007. Biodiversity loss in the genus *Artemia* in the Western Mediterranean Region, Limnetica 26, 387-404.

Asem A, Atashbar B, Rastegar-Pouyani N and Agh N, 2009. Zoology in the middle east 47, 1-4.

Doyle JJ and Doyle JL, 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12, 13-15.

Estoup A, Largiader CR, Perrot E and Chourrout D, 1996. Rapid one-tube DNA extraction for reliable PCR detectionof fish polymorphic markers and transgenes. Molecular marine biology and biotechnology 5, 295-298.

Feder ME, Hofmann GE, 1999. Heat Shock Proteins. Molecular Chaperones, and the Stress Response. Annual Review of Physiology 61, 243-282.

Folmer OM, Black W, Hoeh R, Lutz R and Vrijenhoek R, 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome coxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Mulecular Marine Biology and Biotechnology 3, 294-299.

Geddes MC, 1980. The brine shrimp *Artemia* and Parartemia in Australia. In: Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O., Jaspers, E. (Eds.), The Brine Shrimp *Artemia*, Vol. 3, Universa Press, Wetteren, Belgium, pp. 57-65.

Green AJ, Sanchez MI, Amat F, Figuerola J, Hontoria F, Ruiz O and Hortas F, 2005. Dispersal of invasive and native brine shrimps *Artemia* (Anostraca) via waterbirds. Limnology and Oceanography 50, 737-742.

Kappas I, Abatzopoulos TJ, Van Hoa N, Sorgeloos P and Beardmore AJ, 2004. Genetic and reproductive differentiattion of *Artemia franciscana* in a new environment. Journal of Marine biology 146, 103-117.

Kellogg VA, 1906. A new *Artemia* and its life condition. Science 24, 594-596.

Lavens P, Sorgeloos P, 1996. Manual on the production and use of live food for Aquaculture. Laboratory of Aquaculture and *Artemia* Reference Center, University of Gent, Belgium. Published by: Food and Agriculture Organization of the unitednations (FAO Fisheries Technical paper). P 1-295.

Manaffar, R. 2012. Genetic diversity of *Artemia* populations in Lake Urmia, Iran. PhD thesis, Ghent University, Belgium

Manaffar R, Falahati A, Moshtagiyan A, Mosavi SM, Atashbar B and Asem A, 2008. First report for existence of *Artemia franciscana* coexistence with endemic parthenogenetic *Artemia* population in inside of the Lake Maharlu, Iran.

Avise JC, 2000. Phylogeography: The History and Formation of Species. Harvard University Press, Cambridge, MA, 447 pp.

Bossier P, Xiaomei W, Catania F, Dooms F, Van Stappen G, Naessens E and Sorgeloos P, 2004. An RFLP database for authentication of commercial cyst samples of the brine shrimp *Artemia spp*. (International Study on *Artemia* LXX). Aquaculture 231, 93-112.

Bossier P, Gajardo G and Beristain P, 2009. Species-specific RFLP pattern in the Heat Shock Protein 26 gene a single–locus tool for species identification and experimental testing of habitat-induced isolation in the New world *Artemia* species. Molecular Ecology Resources. Vol. 10, pp. 229-231.

Browne RA, Sallee SE, Grosch DS, Sergreti WO and Purser SM, 1984. Partitioning genetic and environmental components of reproduction and life span in *Artemia*. Ecology 65, 949-960.

Browne RA, Davis LE and Sallee SE, 1988. Temperature effects on life history traits and relative fitness of sexual and asexual *Artemia*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 124, 1-20.

Browne R, 1992. Population genetics and ecology of *Artemia*: Insights into parthenogenetic reproduction. Elsevier Science Publishers Ltd. Trends in Ecology and Evolution 7, 232-237.

Camara MR, 2001. Dispersal of *Artemia franciscana* Kellogg (Crustacea; Anostraca) populations in the coastal saltworks of Rio Grande do Norte, northeastern Brazil, Hydrobiologia 466, 145-148.

Chow S, Suzuki N, Imai H and Yoshimura T, 2006. Molecular species identification of spiny lobster phyllosoma larvae of the genus Panulirus from the Northwestern Pacific Marine Biotechology 8, 260-267.

Clegg JS, Jackson SA, Van Hoa N and Sorgeloos P, 2000. Thermal resistance, developmental rate and heat shock proteins in *Artemia franciscana* from San Francisco Bay and southern Vietnam. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 252, 85-96.

Coutteau P, Brendonck L, Lavens P and Sorgeloos P, 1992. The use of manipulated baker's yeast as an algal substitute for laboratory culture of Anostraca, Hydrobiologia 234, 25-32.

Conference of world aquaculture, Bussan, Korea.

Manaffar R, Zare S, Agh N, Abdolahzadeh N, Soltanian S, Sorgeloos P, Bossier P and Van Stappen G, 2011. SNP detection in Na/K ATP-ase gene a1 subunit of bisexual and parthenogenetic *Artemia* strains by RFLP screening. Molecular Ecology Resources 11, 211-214.

Mura G, Amat F, Abatzopoulos TJ and Moscatello S, 2004. First record of *Artemia franciscana* in an Italian saltwork, Fifth International Large Branchiopod Symposium, Book of abstracts Toodyay, Western Australia, pp. 35-36.

Mura G, Kappas I, Baxevanis AD, Moscatello S, D'Amico Q, Lopez GM, Hontoria F, Amat F and Abatzopoulos TJ, 2006. Morphological and molecular data reveal the presence of the invasive *Artemia franciscana* in Margherita di Savoia salterns (Italy). International Review. Hydrobiology 91, 539-554.

Persoone G, Sorgeloos P, 1980. General aspects of the ecology and biogeography of *Artemia*. In: The brine shrimp *Artemia*. Vol.3. Ecology, Culture, Use in Aquaculture, Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O., Jaspers, E. (Eds.), Universa Press, Wettern, Belgium, pp. 3–24.

Pogge C, 2006. Bio 25, Sanfrancisco bay ecology, brine shrimp, P.1-8.

Prohaszka Z, Fust G, 2004. Immunological aspects of heat- shock proteins- The optimum stress of life. Molecular immunology 41, 29-44.

Qui Z, Bossier P and Wang X, 2006. Diversity structure and expression of the gene for p26 a small heat shock protein from *Artemia*. Genomics 88, 230-240.

Triantaphyllidis GV, Abatzopoulos TJ and Sorgeloos P, 1998. Review of the biogeography of the genus *Artemia* (Crustacea, Anostraca), Journal of Biogeography 25, 213-226.

Thiéry R, Robert F, 1992. Bisexual populations of the brine shrimp *Artemia* in Sète-Villeroi and Villeneuve saltworks (Languedoc, France), International Journal of Salt Lake Research 1, 47-63.

Van Stappen G, 2002. Zoogeography. In: Abatzopoulos, Th.J., Beardmore, J.A., Clegg, J.S.,Sorgeloos, P. (Eds.). *Artemia*: basic and applied biology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands. pp. 171-224.

Van Stappen G, 2008. *Artemia* biodiversity in Central and Eastern Asia. Ph.D Thesis. University of Ghent, Ghent, Belgium, P 1-179.