

گزارش وجود *Artemia franciscana*, Kellogg 1906 در دریاچه طشک، ایران

سپیده شفائی^{۱*}، صمد زارع^۱، رامین مناف^۲ و آفاق فلاحتی^۳

^۱ گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه

^۲ پژوهشکده آرتمیا و جانوران آبی، دانشگاه ارومیه

^۳ گروه شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بندرعباس

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱۲/۷ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۱/۷/۱)

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 ۶۰۰ نقطه زمین و نیز ۱۸ زیستگاه در ایران توزیع شده است. دریاچه طشک در استان فارس یکی از زیستگاه های 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 ۴ مارکر مولکولی مختلف شامل دو ژن Na/K ATP-ase، 12S-16S با روش PCR-RFLP و دو ناحیه COI و HSP26 به روش تعیین توالی مورد تحقیق قرار گرفت. آنالیزهای انجام شده ضمن تأکید بر توانایی روش های مولکولی جهت شناسایی یک گونه ناشناخته، این گونه را به عنوان *A. franciscana* شناسایی نمودند که از نظر توالی ژن های سکانس شده تنوع ژنتیکی زیادی با نمونه های ثبت شده در بانک ژنی دارد.

واژه های کلیدی: آرتمیا، پارتنوژنز، دو جنسی، دریاچه طشک

مقدمه

میگوی آب شور یکی از زئوپلانکتون‌های مهم در آبی‌پروری است. آرتمیا با دارا بودن سازش‌های فیزیولوژیک خاص مانند قابلیت تولید سیست مقاوم، سیستم تنظیم فشار اسمزی بسیار مؤثر به زندگی در آب‌های شور و بسیار شور سازش یافته است. در حقیقت در بین جانوران پرسلولی، آرتمیا تنها جانوری است که می‌تواند شوری‌های بالا (تا ۳۰۰ گرم نمک در لیتر) را تحمل نماید (Browne, 1992). علاوه بر ارزش غذایی بسیار بالای این موجود (اسیدهای چرب و پروتئین‌های لازم)، آرتمیا یک مدل تحقیقاتی مناسب برای آزمایش‌های مولکولی و تکاملی می‌باشد. جنس آرتمیا دارای ۶ گونه دو جنسی و یک سویه پارتنوژن می‌باشد (Van Stappen, 2008). هر یک از این جمعیت‌ها بر اساس ویژگی‌های مولکولی و سازش‌های ژنتیکی، به اقلیم‌ها و زیستگاه‌های متفاوتی سازش یافته‌اند. اولین مقاله رسمی در سال ۱۹۱۵ تنها به ۸۰ منطقه به عنوان زیستگاه آرتمیا اشاره کرده است (Abonyi, 1915)، در حالیکه در آخرین لیست ارائه شده در سال ۲۰۰۲ حدود ۶۰۰ منطقه جغرافیایی برای پراکندگی آرتمیا معرفی شده است (Van Stappen et al., 2002). پراکندگی سریع آرتمیا در اقصی نقاط زمین و همچنین کشف مناطق جدید به واسطه توسعه تحقیقات علمی دلیل تغییر لیست پراکندگی آرتمیا می‌باشد. همچنین انقراض آرتمیا در برخی مناطق (مانند منطقه لیمینگتن انگلستان و دریاچه شورابیل ایران) نیز می‌تواند لیست زیستگاه‌ها و پراکندگی آرتمیا را دستخوش تغییر نماید (Van Stappen, 2008). تاکنون ۱۸ سایت مختلف آرتمیا در ایران گزارش شده است (Abatzopoulos et al., 2006; Asem et al., 2009) که غیر از دریاچه ارومیه بقیه این سایت‌ها دارای آرتمیای بومی پارتنوژن می‌باشند. دریاچه طشک به عنوان یکی از زیستگاه‌های آرتمیای پارتنوژن ایران در استان فارس، در موقعیت جغرافیایی ۲۹ درجه، ۴۲ دقیقه، ۴۲ ثانیه عرض شمالی و ۵۳ درجه، ۳۱ دقیقه، ۱۳ ثانیه طول شرقی در فاصله ۵۰-۱۶۰ کیلومتری شرق شیراز قرار دارد

(Asaadi et al., 2011)، (شکل ۱). این دریاچه پیش‌تر به عنوان یک دریاچه لب شور معرفی شده است، به این صورت که بوسیله یک پل ارتباطی به دریاچه بختگان ارتباط داشته است. بنابراین در این ناحیه شوری آب بالا رفته که این بخش را از نظر زیستی برای آرتمیای پارتنوژن مناسب ساخته است (Agh, 2007). دمای دریاچه نیز که با ترموایزوپلت‌های منطقه تطابق دارد، در طول سال بین کمتر از ۵° تا بیش از ۴۰° و حتی در لجن‌زارها تا ۴۵° سانتی‌گراد هم می‌رسد (Alamdari, 1987). تاریخ اولین گزارش آرتمیای پارتنوژن در دریاچه معلوم نیست اما در سال‌های ۱۹۸۰، ۱۹۸۴، ۲۰۰۲ و ۲۰۰۷ چندین گزارش از وجود آرتمیای پارتنوژن در این دریاچه به ثبت رسیده است (Geddes, 1980; Browne, 2002; Agh, 2007; et al., 1984; Van Stappen et al., 2002). *A. franciscana* به عنوان یکی از گونه‌های دو جنسی بسیار مهم در دنیا (با فراوانی بسیار زیاد)، گونه غالب دریاچه بزرگ نمک آمریکا (Great Salt Lake) می‌باشد که از ۳۸ منطقه از ۲۳ کشور جهان گزارش شده است (Bahman Pour, 2011). در حقیقت قدرت سازش بالا و سریع این گونه در زیست‌بوم‌های جدید سبب گردیده است تا در اکثر کشورها این گونه برای پرورش تجاری انتخاب شود (Amat et al., 2007). توانایی سازش مولکولی و فیزیولوژیک *A. franciscana* به دامنه وسیعی از شرایط اکولوژیک و همچنین سرعت رشد و قدرت تولیدمثل بالای این آرتمیا سبب شده است که این گونه بتواند به سادگی در اقصی نقاط زمین پراکنده شود. مطالعات نشان داده است که قابلیت سازش‌پذیری مولکولی آرتمیا (خصوصاً *A. franciscana*) دلیل اصلی این پراکنش وسیع می‌باشد. چنین استنباط می‌شود که برخی از ژن‌های پروتئین‌های شوک حرارتی (HSPs) Heat Shock Proteins و یا ژن‌های میتوکندریایی می‌توانند به سرعت این تغییرات مولکولی را نشان دهند به طوری که به عنوان شاخص سازش موفق به شرایط جدید در نظر گرفته می‌شوند. تحقیقات نشان داده است این پروتئین‌ها که از دسته چاپرون‌های مولکولی هستند

پارتنوژنز در دریاچه‌های طبیعی داخلی ایران (خصوصاً دریاچه طشک) گزارش شده است، به دلیل مشاهده جمعیت کثیری از آرتمیای دو جنسی در داخل دریاچه طشک، شناسایی سویه و گونه آرتمیای مشاهده شده در این دریاچه به عنوان هدف اصلی اجرای این تحقیق در نظر گرفته شد.

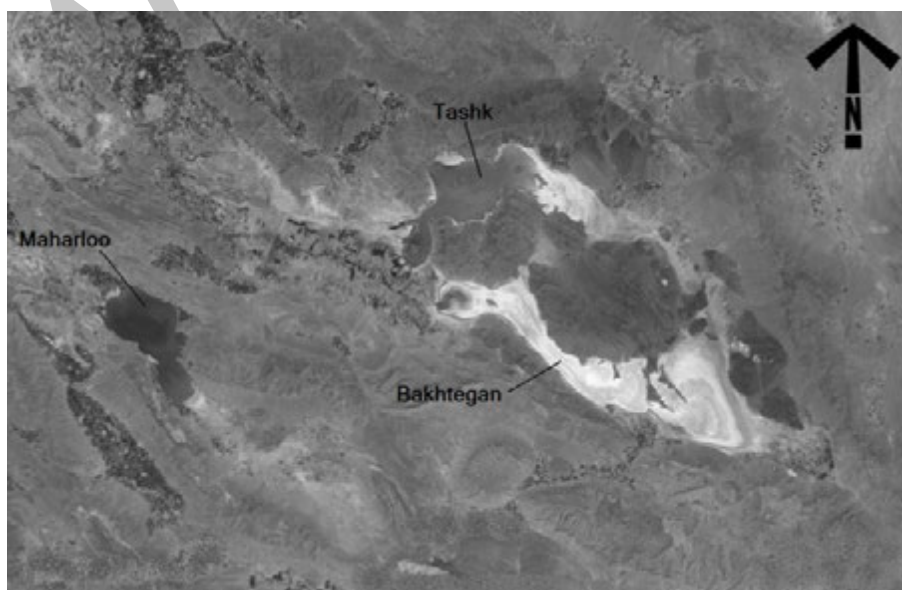
مواد و روش کار

سیست‌های آرتمیا در تیر ماه سال ۱۳۹۰ از دریاچه طشک در استان فارس با مختصات $53^{\circ} 50' N$ و $60^{\circ} 29' E$ برداشت شدند (شکل ۱). این سیست‌ها پس از شستشو و خالص‌سازی در شرایط استاندارد آزمایشگاهی که شامل آب دریاچه ارومیه رقیق شده با شوری ۳۵ گرم در لیتر، دمای $27^{\circ}C$ و $pH=8$ مجهز به سیستم هوادهی و نور کافی تخم‌گشایی شدند (Lavens and Sorgeloos, 1996). لاروهای اینستار ۱ پس از شمارش به تعداد ۵۰۰ ناپلیوس به درون بطری‌های یک لیتری واجد آب شور ۸۰ گرم در لیتر در ۴ تکرار منتقل شده و به مدت ۲۰ روز با ترکیبی از مخمر غنی شده با اسید چرب و جلبک تک سلولی *Dunaliella salina* پرورش یافتند (Coutteau et al., 1992).

نقش مهمی در افزایش سازش فیزیولوژیکی موجود زنده در مواجهه با شرایط ناگوار زیستی دارند (Clegg et al., 2000) و در آرتمیاهایی که یک دوره موفق را در یک زیستگاه جدید و متفاوت تجربه کرده اند بسیار تغییر می‌یابند (Bossier et al., 2009). همچنین اثبات شده است که سایر پروتئین‌های این خانواده نیز نقش مهمی در تحمل استرس و همچنین ایجاد سازش مولکولی ایفا می‌کنند (Feder and Hofmann, 1999; Prohaszka, 2004 and Fust).

در راستای بررسی تنوع گونه‌ای آرتمیا روش‌های مختلفی شامل انواع تکنیک‌های مورفومتریکی و مولکولی معرفی شده است. پیش از این کارآیی ژنوم میتوکندریایی به عنوان گزینه‌ای مناسب جهت شناسایی تاکسون‌های نامعین، بررسی گونه‌زایی و حتی شناسایی جمعیت‌های آرتمیا مورد تأیید قرار گرفته بود (Avisé, 2000; Bossier et al., 2004). همچنین اخیراً یک روش مولکولی جهت شناسایی سویه پارتنوژنز آرتمیا از سویه دو جنسی آن ارائه گردیده است که می‌تواند به سادگی جهت جداسازی این دو سویه از یکدیگر مورد استفاده قرار گیرد (Manaffar et al., 2011).

با توجه به اینکه *A. urmiana* تنها آرتمیای دو جنسی بومی ایران می‌باشد و تاکنون فقط وجود آرتمیای



شکل ۱- موقعیت دریاچه طشک در نزدیکی دریاچه‌های مهارلو و بختگان

بررسی‌های مولکولی

DNA سیست‌های آرتیمیا از هر نمونه سیست منفرد با استفاده از روش Chelex استخراج شدند (Estoup *et al.*, 1996). جهت استخراج DNA از نمونه‌های آرتیمیای بالغ از روش CTAB^۱ استفاده شد (Doyle and Doyle, 1990). در راستای بررسی سویه و گونه آرتیمیای بیگانه دریاچه طشک، ۲۰ عدد نمونه (سیست و آرتیمیای بالغ) مورد استفاده قرار گرفت. به این منظور قطعات ژنی Na/K ATP-ase (قطعه‌ای از ژنوم هسته‌ای جهت تشخیص دوجنسی یا پارتنوژن) (Manaffar *et al.*, 2011) و ۱۶S-۱۲S (قطعه‌ای از ژنوم میتوکندریایی به منظور تشخیص گونه آرتیمیا) استفاده شد (Bossier *et al.*, 2004). برنامه PCR^۲ و همچنین آغازگرهای مورد استفاده

در جدول ۱ خلاصه شده است. محصول PCR در تمامی آزمایش‌ها با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۲٪ و دستگاه عکس‌برداری از ژل مدل GeneFlash مورد بررسی قرار گرفت. پس از تأیید کیفیت محصول PCR در تکنیک RFLP^۳، قطعه‌اگزون ۷ ژن Na/K ATP-ase توسط آنزیم *HpaII* و *TruII* و قطعه ژن ۱۶S-۱۲S توسط آنزیم *HpaII* براساس دستورالعمل کارخانه برش داده شده و بر روی ژل آگارز ۲٪ بررسی شدند. به منظور تعیین توالی ژن‌های HSP26 و COI تعداد ۴ نمونه از هر ژن که باندهای کیفیت بالا داشتند جهت تعیین سکانس به شرکت سیناژن-ایران ارسال شدند (Qui *et al.*, 1994; Folmer *et al.*, 2006).

1. Cetyltrimethylammonium BROMIDE: CTAB
2. PCR: Polymerase Chain Reaction

3. RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

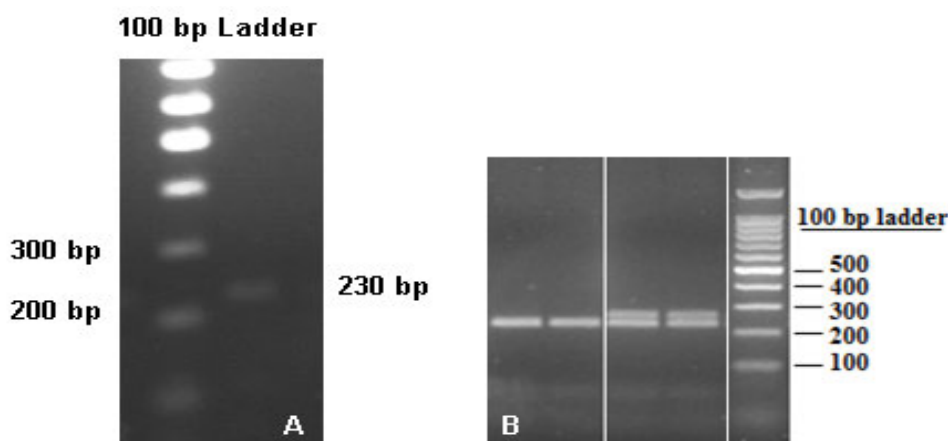
جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق

آغازگرهای پیشرو و معکوس	برنامه PCR
Na/K ATP-ase ۵'-cag-cca-aac-gta-tgg-ctt-c-۳' ۵'-gaa-ttc-agc-acg-act-gca-aag-۳'	94°C 2 Min 35 cycle (94°C 2 Min, 56°C 25 Sec, 72°C 1 Min) 72°C 3 Min
COI ۵'-ggg-aca-atc-ata-aag-ata-tgt-g-۳' ۵'-taa-act-tca-ggg-tga-cca-aaa-aat-ca-۳'	95°C 3 Min 33 cycle (95°C 1Min, 50°C 1 Min, 72°C 1.20 Min) 72°C 10 Min
12S-16S ۵'-cag-cca-aac-gta-tgg-ctt-c-۳' ۵'-gaa-ttc-agc-acg-cta-gca-aag-۳'	95°C 2 Min 34 cycle (94°C 1.15 Min, 52°C 1 Min, 72°C 2 Min) 72°C 4 Min
HSP 26 ۵'-gga-gaa-gaa-tga-gaa-g-۳' ۵'-tct-ctt-tgg-acg-tgt-cca-tat-tc-۳'	94°C 2 Min 35 cycle (94°C 15 Sec, 54°C 25 Sec, 72°C 30 sec) 72°C 4 Min

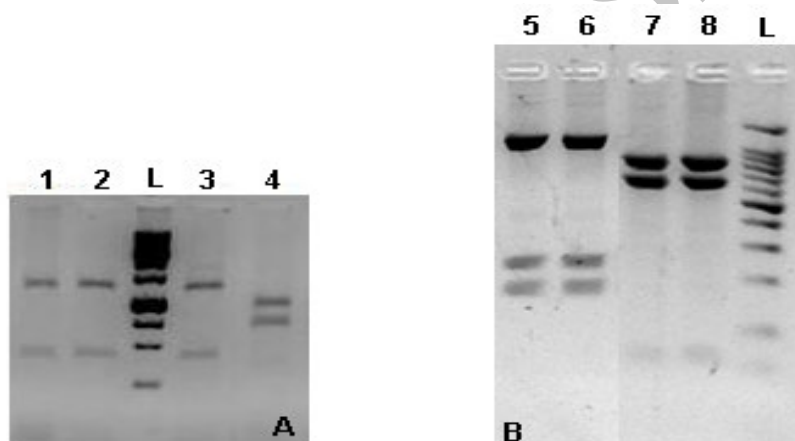
نتایج

بررسی باندهای الکتروفورزی محصول PCR مربوط به قطعه ۷۰۰ جفت بازی از ژن سیتوکروم اکسیداز و نیز قطعه ۲۱۷ جفت بازی مربوط به ژن شوک حرارتی HSP26 نشان داد مطابقت کاملی بین سائز باندهای تولید شده با گزارش‌های موجود در بانک ژنی (Genbank) و منابع وجود دارد. برش آنزیمی قطعه ۲۸۰ جفت بازی از ژنوم هسته‌ای تولید شده توسط آنزیم *TruII* نشان داد الگوی برش ایجاد شده در نمونه‌های آرتیمیای دریاچه طشک دقیقاً مشابه الگوی آرتیمیای دو جنسی می‌باشد

(شکل ۲). جهت بررسی گونه آرتیمیا همانطور که پیش‌تر اشاره شد از برش آنزیمی قطعه ۱۵۰۰ جفت بازی ژنوم میتوکندریایی ۱۶S-۱۲S استفاده شد. برش آنزیمی توسط آنزیم محدودکننده *HpaII* از نظر الگوی برش آنزیمی شکل پروفایلی *A. franciscana* را ایجاد نمود (شکل ۳). بررسی نتایج سکانس توسط جستجوی اینترنتی GenBank توسط نرم‌افزار Blast نیز بر این نکته تأکید نمود که آرتیمیای دو جنسی فوق متعلق به گونه آرتیمیای دو جنسی آمریکا *A. franciscana* می‌باشد لیکن بیش از ۳۰٪ اختلاف مولکولی در ساختار این ژن با نمونه‌های



شکل ۲- ژل آگارز مربوط به برش آنزیمی قطعه ۲۸۰ جفت بازی ناحیه Na/K ATP-ase. تصویر (A): باند ۲۳۰ جفت بازی تولید شده از نمونه‌های آرتمیای طشک تصویر (B): ژل رفرنس گرفته شده از Manaffar *et al.* (2011). الگوی برش دو باندهی مربوط به آرتمیای پارتنوژن و الگوی تک باندهی نشانگر آرتمیای دو جنسی می باشد.



شکل ۳- ژل آگارز مربوط به الکتروفورز قطعه ۱۵۰۰ جفت بازی ناحیه 12S-16S پس از برش آنزیمی توسط آنزیم *Hpa II* به ترتیب تصویر (A): برش آنزیمی قطعه فوق در آرتمیای مشکوک دریاچه طشک (نمونه های ۱ و ۲) و نمونه های شاهد (۳: *A. franciscana* و ۴: *A. sinica*) با مارکر ۱ کیلو جفت بازی و تصویر (B): ژل رفرنس گرفته شده از Bossier *et al.* (2004)، نمونه ۵-۶ مربوط به *A. franciscana* و نمونه ۷-۸ مربوط به نمونه *A. sinica* با مارکر ۱۰۰ جفت بازی می باشد.

ثبت شده در بانک ژنی مشاهده شد.

پیش‌بینی الگوهای تمایز ژنتیکی و گسترش تنوع در چندین موجود با خطای ناچیز می‌پردازد استفاده شود (Chow *et al.*, 2006).

بر اساس نتایج حاصل شده دو مارکر استفاده شده در این تحقیق به طور دقیق، سوبه و گونه آرتمیای بیگانه را شناسایی نمودند اما تعیین توالی ژن‌های سیتوکروم اکسیداز و همچنین پروتئین شوک حرارتی کوچک و بررسی توالی آن با نمونه‌های بانک ژنی (Genbank) بیش از ۳۰٪ اختلاف ژنتیکی آرتمیاهای آزمایش شده با نمونه‌های موجود در سایت فوق را نشان می‌دهد. این

مطالعه حاضر اولین گزارش مشاهده *A. franciscana* به عنوان یک گونه دو جنسی جدید در دریاچه طشک از استان فارس محسوب می‌شود. پیش از این بررسی‌های علمی دقیقی وجود *A. franciscana* را در فلات ایران (زیستگاه‌های طبیعی آرتمیا) مورد تأیید قرار داده بودند (Manaffar *et al.*, 2008). در طی این تحقیق سعی شد از تکنیک‌های جدید که در طول سال‌های اخیر به

2004)، اسپانیا و مراکش (Amat et al., 2007) به ثبت رسیده است. تحقیقات انجام شده توسط Kappas (2004) بر روی *A. franciscana* غیربومی در ویتنام نشان داد که بین *A. franciscana* بومی آمریکا و آرتمیای تجاری ویتنام که بیش از ۱۰ سال پیش به ویتنام انتقال داده شده بودند، تفاوت‌های مولکولی قابل ملاحظه‌ای مشاهده می‌شود.

لازم به ذکر است که استقرار دائمی جمعیت‌های غیربومی آرتمیا در سطح جهان و گسترش توزیع *A. franciscana* در دنیا یکی از موضوعات مورد توجه در سال‌های اخیر بوده است (Abatzopoulos et al., 2006; Amat et al., 2006; Mura et al., 2006; Green et al., 2005). در حال حاضر *A. franciscana* به عنوان جمعیت غالب در غرب دریای مدیترانه، معدن‌های استخراج نمک در پرتغال، ساحل مدیترانه‌ای فرانسه و خلیج Cadiz اسپانیا مطرح است (Amat et al., 2005). این تحقیقات اثبات کرده است که *A. franciscana* در عرض چند سال توانسته است جمعیت بومی را به صورت رقابتی از محیط حذف نماید (Amat et al., 2005; Green et al., 2005). تحقیقات در ایران نیز نشان داده است که در آبگیر نوق رفسنجان (که پیش از این یک زیستگاه طبیعی برای آرتمیای پارتونوزن بود) *A. franciscana* توانسته است در مدتی کمتر از ۴ سال در رقابت با جمعیت آرتمیای بکرزا به یک جمعیت غالب تبدیل شود (Abatzopoulos et al., 2006).

با توجه به نتایج تحقیق حاضر در خصوص تنوع ژنتیکی مشاهده شده در *A. franciscana* و همچنین توانایی بالقوه این آرتمیا پیش‌بینی می‌شود که این گونه دو جنسی بتواند در آینده جمعیت پارتونوزن بومی را به طور کامل حذف نماید.

سپاسگزاری

از مساعدت‌های خانم راضیه پاک ترمی کارشناس محترم آزمایشگاه ژنتیک پژوهشکده آرتمیا صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

اختلاف همانطور که قبلاً نیز توضیح داده شد، می‌تواند در اثر حضور موفق آرتمیای دو جنسی در داخل دریاچه طشک حاصل شده باشد. البته تأثیر پدیده‌های دیگری همچون اثر یابنده (founder effect) و تغییر رانش ژنتیکی (genetic drift) را نیز نباید نادیده گرفت. 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 طشک سازگار نماید.

اما در خصوص شیوه احتمالی انتقال این گونه آرتمیا به دریاچه طشک باید اشاره نمود با وجود اینکه تخم آرتمیا عموماً توسط باد و پرندگان آبی انتقال می‌یابد (Persoone and Sorgeloos, 1980)، اما از دهه ۷۰ میلادی تاکنون انسان عموماً مسئول پراکنش آرتمیا خصوصاً *A. franciscana* بوده است. با توجه به گزارش پیشین در خصوص ذخیره‌سازی انسانی این گونه در دریاچه مهارلو و نظر به نزدیکی این دو دریاچه، حدس زده می‌شود که *A. franciscana* توسط پرندگان از دریاچه مهارلو به دریاچه طشک انتقال یافته باشد.

لازم به ذکر است که این آرتمیا بالاترین سطح انعطاف‌پذیری 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 (Browne et al., 1988; Kappas et al., 2004; Pogge, 2004). با انتقال این گونه در دهه ۱۹۷۰ به جزایر اقیانوس آرام و برزیل اعلام شد که گونه فوق احتمالاً جایگزین سایر گونه‌های منجمله *A. salina* خواهد شد (Van Stappen et al., 2002). اما اولین گزارش رسمی مبنی بر قدرت تهاجمی *A. franciscana* مربوط به Camara در سال 2001 است که این گونه را در Rio Grande do Norte واقع در شمال برزیل گزارش نموده است. چنین گزارش‌هایی همچنین در پرتغال (Amat et al., 2005)، فرانسه (Thiery, 1992)، مصر (Triantaphyllidis et al., 1998)، ایتالیا (Mura et al., 1998)

References

- Abatzopoulos, T.J., Agh, N., Van Stappen, G., Razavi Rouhani, S.M., 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 für Wissenschaftliche Zoologic*, 114, 95-168.
- Agh, N., 2007. Characterization of *Artemia* population from Iran. Ph.D. thesis. Ghent University, Belgium, Pp 8-16.
- Alamdari, A., 1987. Limnology and preserving of ecologic dynamic of Bakhtegan wetland.
- Amat, F., Hontoria, F., Ruiz, O., Green, A.J., Sanchez, M.I., 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, J.C., Vieira, N., Mura, G., 2007. Biodiversity loss in the genus *Artemia* in the Western Mediterranean Region, *Limnetica*, 26, 387-404.
- Asaadi, R., Sardashti, M., Karami, M., Golzar, Y., 2011. The visit report of Tashk, Maharlo and Bakhtegan Wetlands. *Under Supervision of Ministry of Power*, 4 pp.
- Asem, A., Atashbar, B., Rastegar-Pouyani, N., Agh, N., 2009. *Zoology in the Middle East*, 47, 1-4.
- Avise, J.C., 2000. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge, MA, 447 pp.
- Bahman Pour, L., 2011. Comparative study on Morphometric characteristics, HSPs and protein profile of *A. franciscana* introduced to new environment. M.Sc. Thesis of Urmia University. P. 27.
- Bossier, P., Xiaomei, W., Catania, F., Dooms, F., Van Stappen, G., Naessens, E., 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., 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*, 10, 229-231.
- Browne, R.A., Sallee, S.E., Grosch, D.S., Sergeti, W.O., Purser, S.M., 1984. Partitioning genetic and environmental components of reproduction and life span in *Artemia*. *Ecology*, 65, 949-960.
- Browne, R.A., Davis, L.E., Sallee, S.E., 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, 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.
- Chow, S., Suzuki, N., Imai, H., Yoshimura, T., 2006. Molecular species identification of spiny lobster phyllosoma larvae of the genus *Panulirus* from the Northwestern Pacific Marine *Biotechnology*, 8, 260-267.
- Clegg, J.S., Jackson, S.A., Van Hoa, N., 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., Sorgeloos, P., 1992. The use of manipulated baker's yeast as an algal substitute for laboratory culture of Anostraca, *Hydrobiologia*, 234, 25-32.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, 13-15.
- Estoup, A., Largiader, C.R., Perrot, E., Chourout, D., 1996. Rapid one-tube DNA extraction for reliable PCR detection of fish polymorphic markers and transgenes. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 5, 295-298.
- Feder, M.E., Hofmann, G.E., 1999. Heat Shock Proteins. Molecular Chaperones and the Stress Response. *Annual Review of Physiology*, 61, 243-282.
- Folmer, O.M., Black, W., Hoeh, R., Lutz, R., Vrijenhoek, R., 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3, 294-299.
- Geddes, M.C., 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, A.J., Sanchez, M.I., Amat, F., Figuerola, J., Hontoria, F., Ruiz, O., Hortas, F., 2005. Dispersal of invasive and native brine shrimps *Artemia* (Anostraca) via waterbirds. *Limnology and Oceanography*, 50, 737-742.
- Kappas, I., Abatzopoulos, T.J., Van Hoa, N., Sorgeloos, P., Beardmore, A.J., 2004. Genetic and reproductive differentiation of *Artemia franciscana* in a new environment. *Journal of Marine Biology*, 146, 103-117.
- Kellogg, V.A., 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 United Nations* (FAO Fisheries Technical paper). P 1-295.
- Manaffar, R., Falahati, A., Moshtagiyan, A., Mosavi, S.M., Atashbar, B., Asem, A., 2008. First report for existence of *Artemia franciscana* coexistence with endemic parthenogenetic *Artemia* population in inside of the Lake Maharlu, Iran. Conference of world aquaculture, Bussan, Korea.
- Manaffar, R., Zare, S., Agh, N., Abdolazadeh, N., Soltanian, S., Sorgeloos, P., Bossier, P., 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, T.J., 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, A.D., Moscatello, S., D'Amico, Q., Lopez, G.M., Hontoria, F., Amat, F., Abatzopoulos, T.J., 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, Wetteren, 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., Wang, X., 2006. Diversity structure and expression of the gene for p26 a small heat shock protein from *Artemia*. *Genomics*, 88, 230-240.
- 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.
- 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.

Report for the Occurrence of *Artemia franciscana* Kellogg 1906 in Tashk Lake, Iran

S. Shafaie^{1,2*}, S. Zare¹, R. Manaffar² and A. Falahati³

¹ Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Iran

² Artemia and Aquatic Animals Research Institute, Urmia University, Iran

³ Fisheries Branch, Islamic Azad University, Bandar abass, Iran

(Received: 25-02-2012 – Accepted: 22-09-2012)

Abstract

Artemia, a small crustacean, with high commercial value is a valuable model organism for researchers. This creature by tolerating extreme range of different environmental conditions is dispersed to more than 600 and 18 sites over the world and Iran, respectively. Tashk Lake is one the natural parthenogenetic *Artemia* habitat in Iran. Due to occurrence of an unknown bisexual *Artemia* in Tashk Lake, the species of this un-endemic *Artemia* was researched. In this regard, four different molecular markers as Na/K ATP-ase, 12S-16S by PCR-RFLP technique and COI and HSP26 by sequencing and subsequent Genbank data were studied. The conducted analyses as long as 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 data found in the Genbank.

Keywords: *Artemia*, parthenogenetic, Bisexual, Tashk Lake