

مطالعه مراحل پس از جنینی *A. urmiana* و *A. parthenogenetica* با استفاده از میکروسکوپ نوری و الکترونی نگاره

حسن رحیمیان^{*}، پریسا داودی^۱، ناصر آق^۲

^۱ دانشکده زیست شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

^۲ مرکز تحقیقات آرتمیا، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

*مسئول مکاتبات - آدرس الکترونیکی: Rahimian@khayam.ut.ac.ir

(دریافت: ۸۸/۸/۱۲؛ پذیرش: ۸۹/۱۰/۵)

چکیده

در تعیین تعداد مراحل لاروی آرتمیا و نیز صفات مورفولوژیک این مراحل میان محققین اختلاف نظر وجود دارد. تاکنون بیشتر مطالعات مورفولوژیکی انجام شده روی مراحل پس از جنینی دو گونه *Artemia urmiana* و *A. parthenogenetica* با استفاده از میکروسکوپ های نوری صورت گرفته است. در این مطالعه، و در ادامه پژوهش های قبلی نویسندگان، برای افزایش دقت در یافتن و توصیف صفات مورفولوژیکی، مراحل مختلف لاروی دو گونه آرتمیای ایران به تفکیک تهیه و اندام های مختلف آنها با استفاده از میکروسکوپ نوری مجهز به لوله ترسیم و میکروسکوپ الکترونی نگاره مورد بررسی قرار گرفتند. سیستم های دو گونه *A. urmiana* و *A. parthenogenetica* از مرکز تحقیقات آرتمیا در دانشگاه ارومیه تهیه شد و در محیط آزمایشگاه تحت شرایط کنترل شده و یکسان مورد تغریخ و پرورش قرار گرفتند. در هریک از مراحل لاروی، اندام های مختلف از جمله شاخک اول، شاخک دوم، پاهای سینه ای، و اندام های تناسلی خارجی در هر مرحله لاروی جدا شدند و پس از آماده سازی در میکروسکوپ های نوری و الکترونی مشاهده شدند. مشاهدات انجام شده بجز توصیف دقیقتر صفات که در این دو گونه برای اولین بار صورت می گیرد، نشان دادند که این دو گونه در برخی از صفات در مراحل لاروی با یکدیگر متفاوت اند. مراحل تکوین آنتنول ها، شاخک ها، و فیلوپودها در دو گونه مشابه بودند، اما الگوی شیارهای اکتودرمی کیسه تخمی و برجستگی جانبی روی این کیسه ها در مرحله بلوغ دو گونه متفاوت بودند. بعلاوه، ناحیه انتهایی یا برگشت پذیر پنیس *A. urmiana*، که برای اولین بار انجام گردیده است، مشخص شد که ویژگی های الگوهای سطحی این ناحیه در *A. urmiana* با این الگوها در *A. franciscana* و *A. persimilis* متفاوت بوده و می توان از این صفت در افتراق این سه گونه راز یکدیگر استفاده نمود.

واژه های کلیدی: آرتمیا، مراحل پس از جنینی، میکروسکوپ نوری و الکترونی

مقدمه

A. franciscana (Peterson & Rosowski, 1994)، آرواره های *A. urmiana* (Davoodi et al. 2009) و *A. parthenogenetica* (Tyson & Sullivan 1980) اشاره برجستگی های قدامی آرتمیا های نر (Tyson & Sullivan 1980) کرد. از سوی دیگر بسیاری از مطالعات مورفولوژیکی در آرتمیاها بر اندام های خاص در دوران بلوغ متمرکز بوده است (Mura et al. 1989, Triantaphyllidis et al. 1997, Brendonck, & Belk 1997, Torrentera & Belk 2002). تنها گونه دوجنسی آرتمیا در ایران *A. urmiana* می باشد (Abatzopoulos et al. 2006) که تنها در دریاچه ارومیه یافت می شود، بقیه جمعیت های آرتمیای ایران، *A. parthenogenetica* می باشند. یکی از این جمعیت های بکرزا، آرتمیای بکرزای برکه های اطراف دریاچه ارومیه است.

آرتمیا (*Artemia*) سخت پوست کوچک و ظریفی است که به زندگی در آب های بسیار شور سازش پیدا کرده است. اعضاء این جنس مجموعه ای از گونه های خواهری اند که تا حد زیادی توسط جدایی تولیدمثلی توصیف می شوند. مطالعات مراحل لاروی گونه های *Artemia* مورد توجه محققین مختلف بوده است، که از جامع ترین این مطالعات می توان به مقالات (Anderson (1967 بر *A. salina*، (Schrehardt (1987a,b بر *A. franciscana*، Cohen و همکاران (1999) روی *A. persimilis* اشاره کرد. در این مطالعات در تعیین تعداد پوست اندازها و زمان شروع و پایان هر مرحله اختلاف نظر وجود دارد.

مراحل تکوین اندام های خاص نیز در برخی از گونه های آرتمیاها مورد مطالعه قرار گرفته است، که از جمله می توان به مطالعه آرواره های *A.*

نتایج:

مشاهدات با میکروسکوپ نوری و الکترونی نشان داده اند که شاخک های اول ساختارهایی تک شاخه اند، که در دو طرف چشم ناپلیوسی قرار دارند. در مرحله L1، در انتهای شاخک های اول، سه تار نوع یک وجود دارند، که تار وسطی از دو تار کناری بزرگتر است. در مرحله L2 دو جوانه مربوط به تارهای نوع دوم ایجاد شده و بتدریج دارای زائده شفاف رآسی می شوند (شکل های A، B). در مرحله L3 دو تار نوع دو رشد بیشتری کرده و زائده شفاف تبدیل به یک تازه شفاف می شود (شکل C). در مراحل L4، L5 و L6 در تعداد این تارها تغییری ایجاد نمی گردد و تنها تازه های شفاف دو تار نوع دوم کمی بزرگتر می شوند. در مرحله L7 جوانه سومین تار نوع دوم ایجاد شده که به تدریج رشد کرده و دارای زائده شفاف رآسی می شود (شکل D). طی مراحل L7-L9 این جوانه رشد کرده و زائده شفاف تبدیل به یک تار می شود. در مرحله L10 جوانه چهارمین تار نوع دوم نیز ایجاد شده و شاخک های اول به ساختار نهایی خود می رسند که دارای سه تار نوع اول و چهار تار نوع دوم در بخش پایینی تارهای نوع اول است (شکل E). در سطح تارهای نوع اول خارهای بسیار کوچکی به چشم می خورد (شکل F). در کل سطح شکمی شاخک، خارهای کوتیکولی با تراکم های متفاوت در نمونه های مختلف دیده می شود. این خارهای کوتیکولی از مرحله اول لاروی ایجاد می شوند و در مراحل پایانی تراکم آن ها بیشتر می شود. میزان تراکم این خارها و الگوی پراکنش آن ها در دو گونه *A. urmiana* (شکل G و H) و *A. parthenogenetica* (شکل I) تفاوتی نداشته اما در نمونه های مختلف هر گونه تنوع در این صفت دیده می شود. سیر تغییرات شاخک ها در هر دو گونه *A. urmiana* و *A. parthenogenetica* مشابه و به شرح زیر می باشد:

دوره ناپلیوسی (Napliar period):

:NaupliusI (L1)

شاخک ناپلیوس آرتمیای، که بصورت جفت در طرفین ناحیه قدامی ناپلیوس قرار دارند دو شاخه بوده، دارای پروتوپودیتی است که در ناحیه قدامی دارای یک زائده enditic قدامی (pep) است که این زائده ضخیم و تک شاخه است. بر روی بخش انتهایی پروتوپود یک تار انحنا دار انتهایی (cs) نیز وجود دارد. پس از cs، اندوپود دیده می شود که دارای دو تار طویل و یک جوانه کوچک است. در انتهای شاخک نیز نه الی ۱۱ تار طویل دیده می شود (شکل A و B). در سطح شاخک خارهای کوتیکولی به چشم می خورند که در میکروسکوپ نوری این خارها به شکل حباب های قهوه ای رنگ ظاهر می شوند.

دوره متاناپلیوسی (Metanaupliar period):

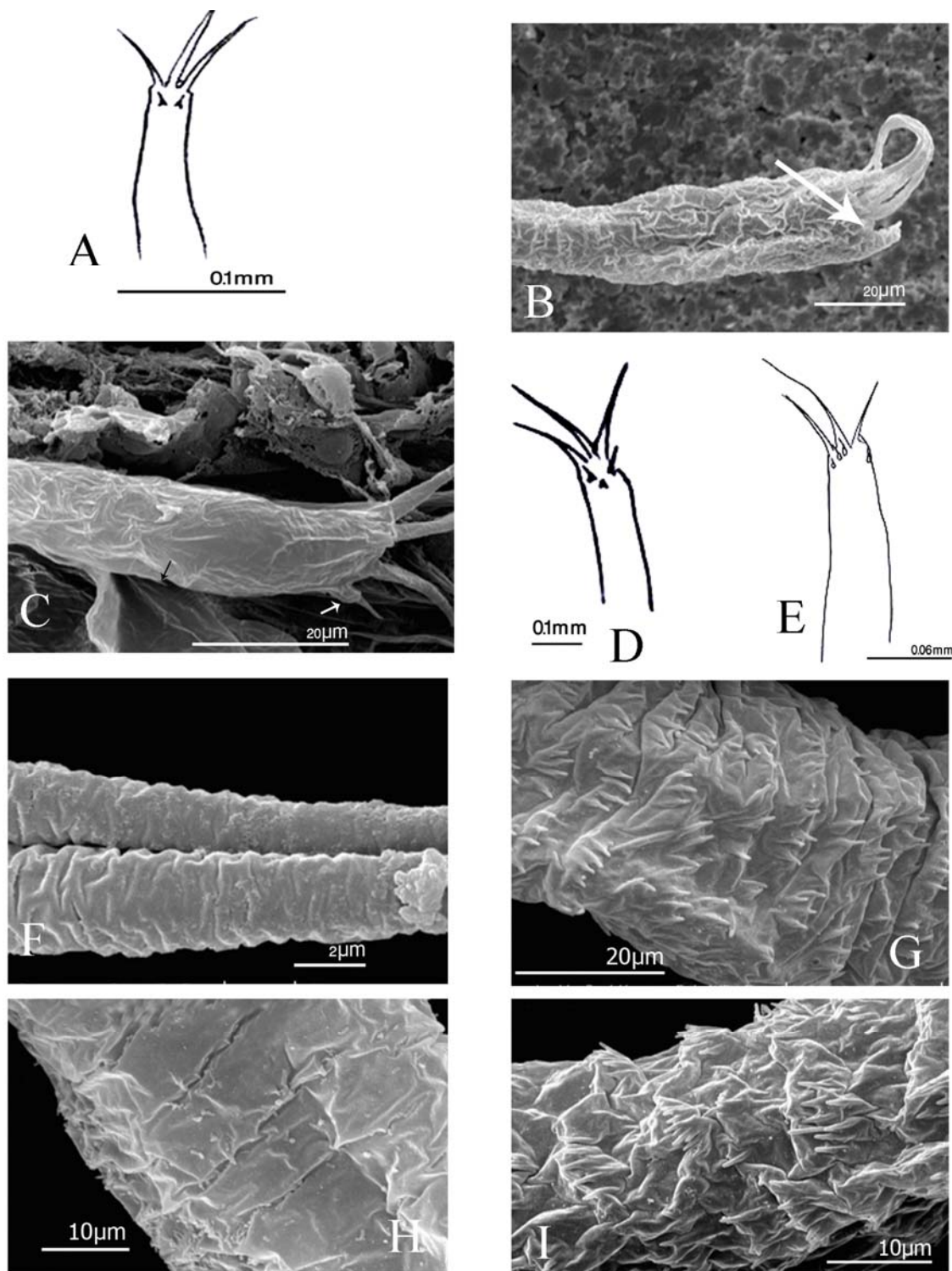
آرتمیای بکرزای برکه ها نخستین بار توسط آق و نوری (۱۳۷۶) معرفی شد. بجز مشاهده و توصیف آرواره های مراحل لاروی *A. urmiana* و *A. parthenogenetica* (Davoodi et al. 2009) تاکنون تنها مطالعات مورفولوژیکی انجام شده با استفاده از میکروسکوپ های نوری صورت گرفته اند (آق و نوری ۱۳۷۶).

با توجه به نتایج قابل توجه از مطالعه ریز-مورفولوژی دیگر گونه های آرتمیای، در این مطالعه مراحل پس از جنینی دو گونه *A. urmiana* و *A. parthenogenetica* و تکوین مورفولوژیک اندام های مختلف با استفاده از میکروسکوپ نوری و میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) بررسی و توصیف گردیدند. بعلاوه، ناحیه پایه ای و برگشت پذیر پنیس، و نیز تزئینات کیسه نگهداری تخمهای آرتمیای نیز به طور کامل مورد مطالعه قرار گرفتند.

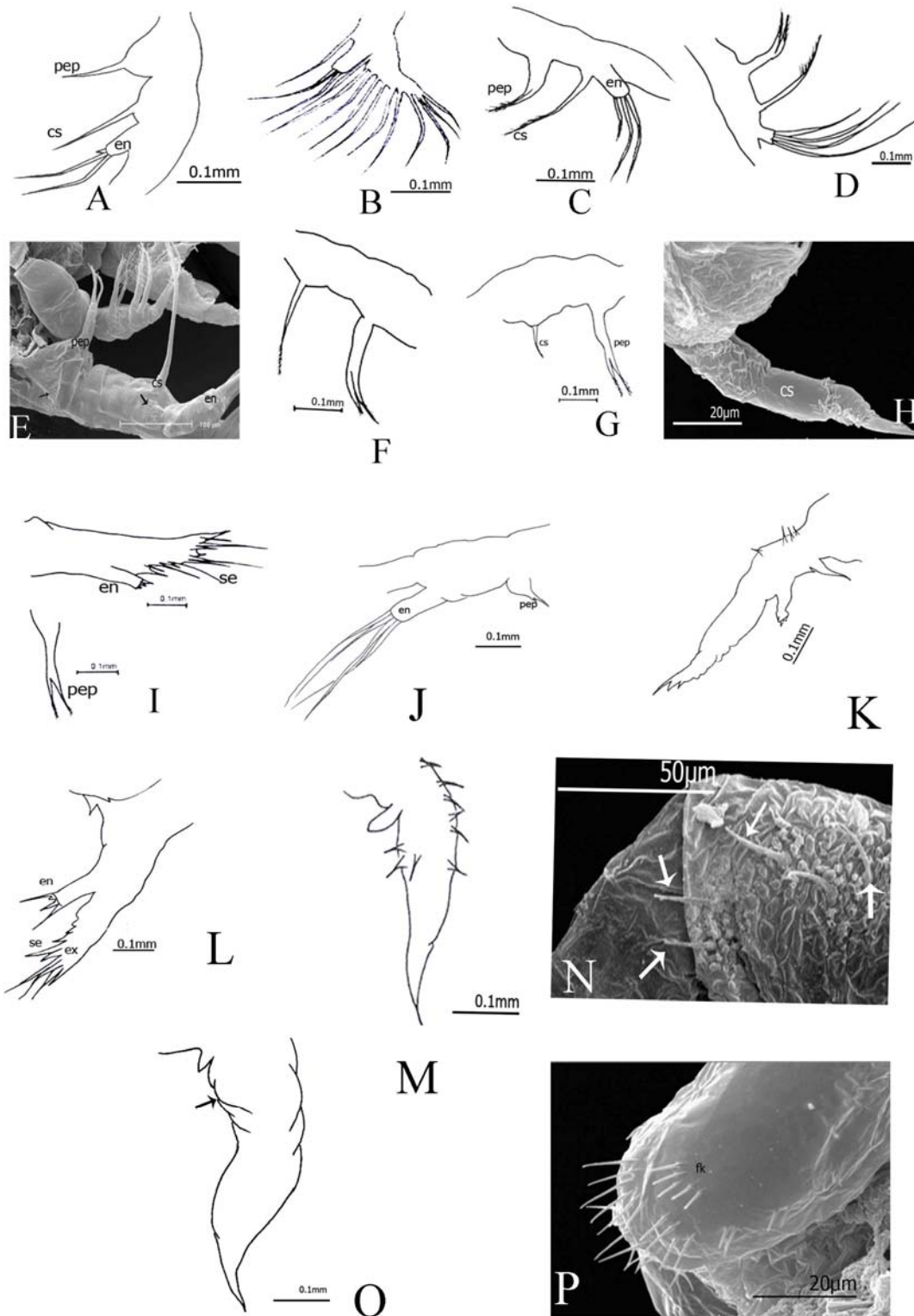
مواد و روشها

سیست های *A. urmiana* و *A. parthenogenetica* از مرکز تحقیقات آرتمیای دانشگاه ارومیه تهیه و در شرایط استاندارد (دمای ۲۴ درجه سانتیگراد و شوری ۳۰ ppt) در آزمایشگاه کشت داده شدند. پس از تقریب لاروها به آب شور (۵۰ ppt) با دمای ۲۵°C منتقل و با مخلوطی از جلبک های تک سلولی (*Dunaliella* sp. and *Colorella* sp.) تغذیه شدند. لاروهای حاصل هر روز مورد مشاهده قرار گرفته و از لاروهای مربوط به هر یک از مراحل هفده گانه ۱۵ نمونه تهیه و در فرمالدهید ۴٪ تثبیت شدند. نمونه های تثبیت شده بعد از شستشو در آب مقطر، به درجات فزاینده الکلی (۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰ و ۷۰٪) منتقل و در هر مرحله ۲۰ دقیقه باقی ماندند. برخی از نمونه ها در گلیسرین قرار داده شده، و از آنها با میکروسکوپ نوری مجهز به لوله ترسیم تصاویری رسم شد. نمونه هایی که برای مشاهده در میکروسکوپ الکترونی در نظر گرفته شده بودند، برای آبیگری کامل از الکلی ۷۰٪ به ترتیب در الکلی های ۸۰، ۹۰، و ۱۰۰٪ (در الکلی ۱۰۰٪ دو بار) و سپس در مخلوط ۱:۱ الکلی و هگزامتیل دیزیل آزان (hexamethyldisilazan) و پس از آن در محلول هگزا متیل دیزیل آزان خالص در هر یک به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شدند. نمونه های آبیگری شده با کمک چسب نقره یا چسب کربن روی پایه آلومینیومی مخصوص چسبانیده و در دستگاه کوتر با طلا-پالادیوم پوشانیده شدند. جزئیات مراحل نموی لاروها توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) Phillips XL30s مورد مطالعه و عکس برداری قرار گرفتند.

شاخکها در طی ۴ مرحله این دوره نمو یافته و در حرکت و تغذیه ناپلیوس نقش فعالی ایفا می کنند.



شکل ۱: مراحل نمو شاخک اول لارو آرتمیا: A، مرحله L2، به تارهای نوع دوم در زیر تارهای نوع اول توجه شود (فلش)؛ B، تصویر SEM از مرحله L2، به تارهای نوع دوم توجه شود (فلش)؛ C، تصویر SEM مرحله L3، فلش سفید تارهای نوع دوم، فلش سیاه خارهای سطح شاخک؛ D، مرحله L7؛ E، مرحله L10؛ F، تصویر SEM خارهای کوچک سطح تارهای نوع اول (فلش ها)؛ G و H، تصاویر SEM آرایش خارهای کوتیکولی سطح شاخک اول در *A. urmiana* بالغ؛ I، تصویر SEM، آرایش خارهای کوتیکولی سطح شاخک اول در *A. parthenogenetica*.



شکل ۲: مراحل نمو شاخک دوم در *A. urmiana* و *A. parthenogenetica* طی مراحل لاروی: A و B، مراحل L1؛ C، مرحله L2؛ D، مرحله L3؛ E، تصویر SEM مرحله L5، به محل ایجاد خارهای کوتیکولی (فلش) توجه شود؛ F، مرحله L10، به کوتاه شدن تار انحنای پروتوپود (cs) و باریک شدن زائده enditic قدامی پروتوپود (pep) توجه شود؛ G، مرحله L11؛ H، تصویر SEM cs؛ I، شاخک ماده در مرحله L12، به کوچک شدن اندوپود و تارهای اگزوپود و دو شاخه ماندن pep توجه شود؛ J، شاخک نر در مرحله L12، به طویل بودن تارهای اندوپود توجه شود؛ K، شاخک ماده در مرحله L13؛ L، شاخک نر در مرحله L13؛ M، شاخک ماده در مرحله L14؛ N، تصویر SEM آرایش تارهای روی شاخک شکل M؛ O، شاخک نر مرحله L14، به بقایای ایجاد برآمدگی قدامی (فلش) توجه شود؛ P، تصویر SEM برآمدگی قدامی در شکل O. en اندوپود، ex اگزوپود.

Metanauplius I (L2):

در این مرحله شاخک به رشد خود ادامه داده، سومین تار اندوپود رشد کرده و در برخی نمونه ها جوانه مربوط به تار چهارم ظاهر می شود. در روی pep شکافی ایجاد می شود که مقدمه دو شاخه شدن است. از سوی دیگر cs و pep مژکدار می شوند (شکل ۲C).

MetanaupliusII (L3):

در این مرحله pep دوشاخه شده و از محل دو شاخه شدن کاملاً مژک دار می شود. cs نیز طویل و در نیمه انتهایی دارای دو ردیف مژک است که به سمت داخل قرار می گیرند. اندوپود دارای سه تار طویل و یک تار کوچک است که تار آخر نیز ۳/۴ طول بزرگترین تار است (شکل ۲D).

شاخک از این مرحله تا مرحله L5 نسبت به مراحل قبل تغییری نمی یابد. خارهای موجود در سطح شاخک در مرحله L5 در شکل (۲E) دیده می شود. این خارها در محل های دو شاخه شدن یعنی در ابتدای پروتوپود، اندوپود و اگزوپود متمرکزند.

دوره پس متاناپلئوسی (Postmetanaupliar period):

در این دوره شاخک ها به تدریج تحلیل رفته و از نقش آن در حرکت و تغذیه کاسته می شود. از مرحله L6 به بعد به تدریج مژک های pep و cs شروع به تحلیل رفتن می کنند. در مرحله L9 تغییر ایجاد شده در pep و cs کاملاً واضح است.

PostmetanaupliusV (L10):

در این مرحله cs کوتاه تر شده و شاخه داخلی pep نیز نازکتر می شود. تارهای اندوپود و اگزوپود نیز در حال تحلیل رفتن هستند (شکل ۲F).

PostmetanaupliusVI (L11):

از این مرحله به تدریج شاخک از طرفین بدن به موقعیت شکمی می آید. cs به شکل خار بلند یا کوتاه فاقد مژک در می آید. شاخه داخلی pep نیز بسیار نازک می شود (شکل ۲G, H).

PostmetanaupliusVII (L12):

تغییرات ایجاد شده در شاخک *A. urmiana* و ماده و *A. parthenogenetica* در مرحله Post meta naupliar شبیه یکدیگر است، اما در نرها این تغییرات با تاخیری یک مرحله ای رخ می دهد. در نمونه های ماده *A. urmiana* و *A. parthenogenetica*، cs از بین رفته و تارهای اگزوپود و اندوپود بسیار کوچک شده اند (شکل ۲I). در افراد نر cs از بین رفته اما تارهای اندوپود و اگزوپود نسبت به نمونه های ماده، طویل تراند (شکل ۲J).

دوره پس لاروی (Post larval period):

در طی این دوره که شامل ۵ مرحله است شاخک لارو آرتمیای به ساختار نهایی و بالغ خود می رسد. در آرتمیای ماده شاخک از موقعیت جانبی

به سطح شکمی می آید و تبدیل به یک اندام حسی می شود. در نرها شاخک تبدیل به چنگال جفت گیری (clasper) می شود.

Post-larval I (Larval13=L13):

در این مرحله شاخک کاملاً در موقعیت شکمی قرار دارد. در نمونه های نر *A. urmiana* تارهای اگزوپود و اندوپود تحلیل می رود. هنوز اثری از برآمدگی قدامی در ناحیه داخلی اگزوپود دیده نمی شود (شکل ۲L). در نمونه های ماده *A. urmiana* و تمام نمونه های *A. parthenogenetica* از تارهای اندوپود و اگزوپود تنها برجستگی هایی به جا مانده است (شکل ۲K). pep به شکل یک برآمدگی کوچک دیده می شود. تعداد تارهای روی شاخک زیاد می شود.

Post-larval II (Larval 14=L14):

در لارو های ماده *A. urmiana* و لاروهای *A. parthenogenetica* از pep یک زائده بر جای مانده است و تعدادی تار نیز وجود دارد (شکل ۲M, N). در نمونه های نر نیز اندوپود دیده می شود و از سوی دیگر برآمدگی برجستگی قدامی نیز ایجاد می شود (شکل ۲O, P).

Post-larval III (Larval 15=L15):

شاخک در نر بزرگتر می شود. برجستگی قدامی نیز بزرگتر شده است و سطح آن کمی چین خورده می شود (شکل ۲D, C). در نمونه های ماده آرتمیای ارومیه و نمونه های آرتمیای بکرزا شاخک نسبت به مرحله قبل تغییر قابل توجهی نمی کند (شکل ۲A, B). اندوپود نیز همچنان در هر دو جنس دیده می شود.

Post-larval IV (Larval 16=L16):

در ماده های *A. urmiana* و نمونه های *A. parthenogenetica* شاخک فاقد اندوپود بوده و تقریباً به ساختار بالغ خود رسیده است.

در نمونه های نر *A. urmiana* بر جستگی برآمدگی قدامی کاملاً واضح می باشد و در سطح آن تزئیناتی به چشم می خورد. شاخک دو بخشی شده است و بخش اگزوپود ضخیم تر شده است. در بخش بالایی شاخک، در محل اتصال شاخک ها، دو زائده خار مانند دیده می شود (شکل ۲H, I).

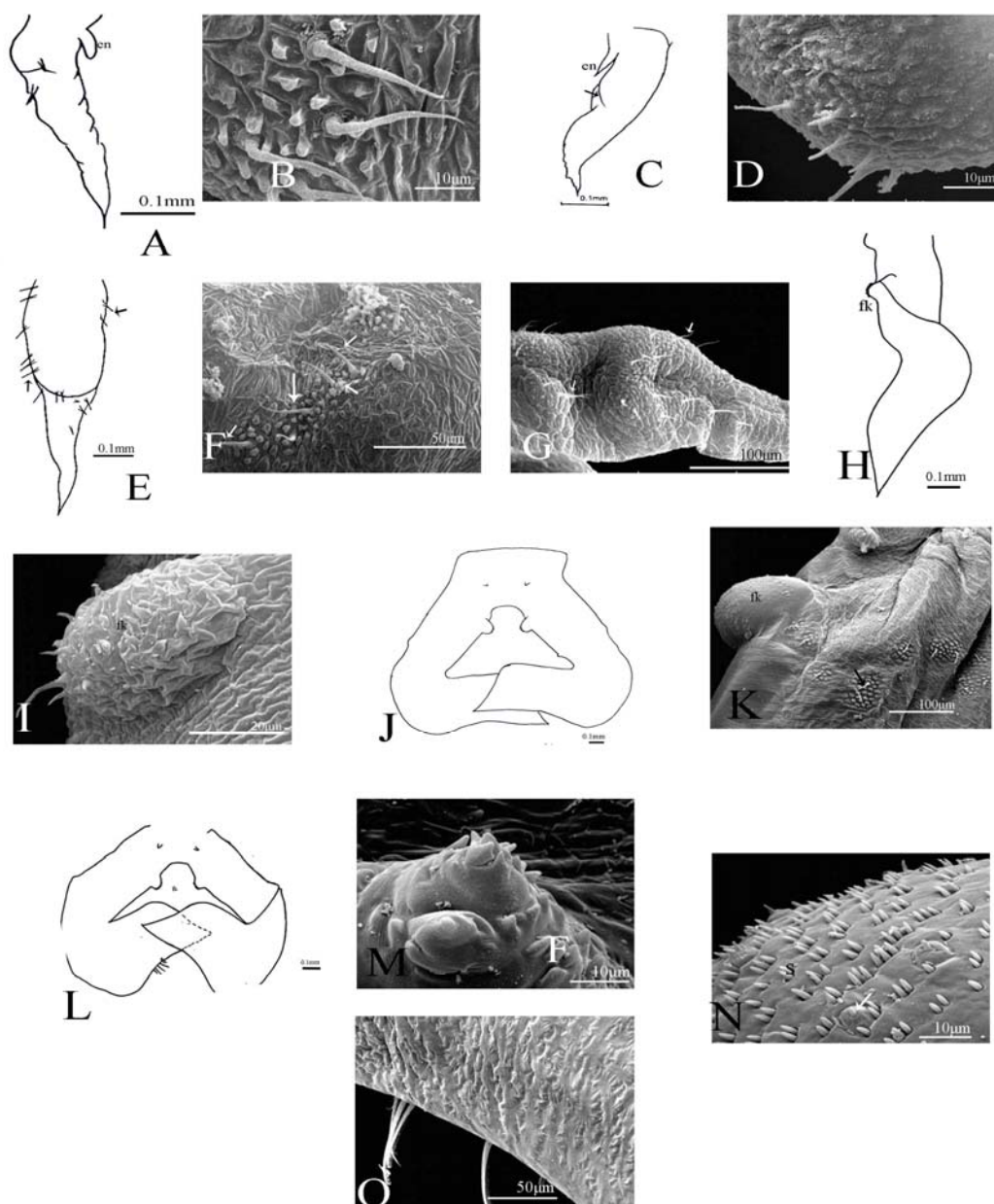
Post-larval V (Larval 17=L17):

در سطح شاخک نمونه های ماده *A. urmiana* (شکل ۲E, F) و نمونه های بکرزا (شکل ۲G) تار هایی در چند دسته جداگانه قرار گرفته و توسط چهار تا پنج برجستگی خار مانند احاطه می شوند. در نمونه های نر *A. urmiana* دو بخش اگزوپود شاخک با زاویه ۹۰ درجه بر روی یکدیگر قرار می گیرند. برجستگی های قدامی بزرگتر شده و تزئینات روی آن بیشتر می شود. یک جفت خار موجود در محل اتصال دو شاخک برجسته تر شده اند (شکل ۲J, K).

مرحله بلوغ:

شاخک در نمونه های ماده تغییری نمی کند و مانند مرحله L17 می

باشد.



شکل ۳. مراحل نمو شاخک دوم در نمونه نر و ماده *A. urmiana* و نمونه های *A. parthenogenetica*. A: شاخک ماده *A. urmiana* مرحله L15؛ B: تصویر SEM آرایش تارهای سطح شاخک در شکل A با بزرگنمایی بیشتر؛ C: شاخک نر مرحله L15، به بزرگ شدن برآمدگی قدامی (فلش) توجه شود؛ D: تصویر SEM برآمدگی قدامی در شکل C؛ E: مرحله L17 شاخک در *A. urmiana* ماده، به تارهای سطح شاخک (فلش) توجه شود؛ F: تصویر SEM تارهای شاخک در شکل C؛ G: تصویر SEM شاخک مرحله L17 در *A. parthenogenetica* به الگوهای مشابه تارها و تزئینات سطحی شاخک (فلش ها) با نمونه *A. urmiana* ماده توجه شود؛ H: شاخک نر مرحله L16؛ I: تصویر SEM برجستگی قدامی موجود در مرحله L16، به تزئینات ایجاد شده در سطح برجستگی قدامی دقت شود؛ J: تصویر کلی شاخک در مرحله L17؛ K: تصویر SEM، به تارهای ایجاد شده در سطح شاخک (فلش) و رشد برجستگی قدامی توجه شود؛ L: شاخک نر *A. urmiana* مرحله بلوغ؛ M: تصویر SEM، خار بخش بالایی شاخک، ناحیه مشخص شده با فلش در شکل L؛ N: سطح برجستگی قدامی، به گیرنده های مکانیکی (فلش) و خارها (s) توجه نمایید؛ O: ناحیه اگزوپود شاخک، به خارهای بسیار ریز و چند تار مزک دار توجه شود. Fk، برجستگی قدامی، en: اندوپود.

قدامی بیشتر می شود. خارها و گیرنده های مکانیکی سطح برجستگی قدامی به وضوح دیده می شود. این خارها به شکل منفرد یا در دسته های دو یا سه تایی دیده می شوند. گیرنده های مکانیکی به صورت

شاخک در افراد نر بالغ نسبت به مرحله L17 بزرگتر می شود (شکل ۳L). دو خار موجود در محل اتصال دو شاخک در بالای لب بالایی در این مرحله برجسته تر شده (شکل M ۳) و تزئینات سطح برجستگی

یک تارد در مرکز یک سلول گنبدی شکل دیده می شود (شکل N ۳). در سطح بخش پایه ای اگزوپود خارهای کوچکی دیده می شوند که کل سطح این قسمت را می پوشانند، به علاوه چند تار مژک دار نیز دیده می شود (شکل O ۳).

Post mandibular region

Naupliar period

NaupliusI (L1)

لارو خارج شده از سیستم تازه تخم گشایی شده آرتمیآ تخم مرغی شکل با سه جفت زائده سری می باشد: شاخک های اول، شاخک و آرواره. در پشت سر، اندام گردنی قرار دارد، که به شکل یک برجستگی دیده می شود. ناحیه Postmandibular یکپارچه و فاقد ضمايم است و در انتهای آن مخرج قرار دارد (شکل A و B ۴).

metanaupliar period

Metanaupliar دومین دوره رشد لاروها است. در این دوره هرچند بند هایی به بدن اضافه می شوند، اما تا پایان این دوره نقش فعالی ندارند.

MetanaupliusI (L2)

در مرحله MetanaupliusI ناحیه post mandibular طولی تر شده و دو جوانه مربوط به آرواره های تحتانی اول (maxillulae) و آرواره های تحتانی دوم (maxillae) ظاهر می شوند.

MetanaupliusII (L3)

ناحیه post maxillary در MetanaupliusII طولی تر شده و دو جوانه مربوط به بندهای سینه ای اول و دوم علاوه بر جوانه های maxilla و maxillula در آن ظاهر می شوند (شکل C ۴).

Metanauplius III (Larval 4=L4)

در ناحیه post-maxillary در مرحله Metanauplius III چهار بند سینه ای دیده می شود، که بند اول برجسته تر شده و در روی آن شش اندیت ایجاد می گردد. جوانه بند دوم نیز به تدریج رشد می کند و برآمده تر می شود. Maxilla و maxillula در این مرحله برآمده تر شده و در نوک آنها چند تار کوچک دیده می شود (شکل D ۴).

MetanaupliusIII (Larva5=L5)

ناحیه post-maxillary در این مرحله شش بند دارد، که در بندهای اول تا سوم تقسیمات مربوط به اندیت ها، اندوپود و تلوپود ظاهر می شوند و از نمای پشتی جوانه مربوط به اگزوپود نیز به چشم می خورد (شکل F ۴) و در بند های چهارم و پنجم تقسیمات اندیت ها و اندوپود ایجاد می گردد. بند ششم جوانه در حال رشد است (شکل E ۴ و شکل G ۴).

Post-metanaupliar period

در طی هفت مرحله این دوره (L6-L12) بند های سینه ای کامل شده

و در حرکت و تغذیه لارو نقش خود را ایفا می کنند .

Post-metanaupliusI (Larval 6=L6)

در ناحیه post-maxillary در این مرحله ۸-۱۰ بند سینه ای ظاهر می گردد که در بندهای اول و دوم اندیت ها، اندوپود و تلوپود دارای تارهایی هستند. پاهای سینه ای سوم و چهارم شروع به بند بند شدن کرده و اندیت ها ، اندوپود و تلوپود ظاهر شده اند. بقیه بند ها به شکل جوانه های در حال رشد هستند. شکل پای سینه ای و تار جداکننده دو اندیت اول در شکل های ۴ (H و I) دیده می شود. تارهای maxilla و maxillula در حال کامل شدن است. اولین تار مربوط به چنگال دمی در آرتمیای بکرزا ایجاد می گردد.

Post-metanaupliusII (Larval 7=L7)

ناحیه post-maxillary در این مرحله دارای ۱۰-۱۱ بند سینه ای است که بندهای ۱ تا ۴ کامل و دارای شش اندیت، اندوپود، تلوپود و اگزوپود و ابی پود می باشند (شکل J ۴). البته اندیت اول و دوم به یکدیگر متصل شده و مرز بین آن ها توسط یک تار طویل مشخص می شود. بر روی اندیت ها، اندوپود و اگزوپود تارهای زیادی ایجاد می شود. طول این تارها در بندهای ۳ و ۴ نسبت به دو بند اول کوتاه تر است. بند های ۵ و ۶ شروع به تقسیم شدن می کنند. در بندهای اخیر تنها تقسیمات اندیت ها، اندوپود و تلوپود به چشم می خورد که ممکن است دارای تارهای بسیار کوچک باشند. بقیه بند ها به صورت جوانه در حال رشد هستند. maxilla و maxillula به ساختار نهایی خود رسیده و به ترتیب دارای یک و نه تار انتهایی هستند. یک جفت تار چنگال دمی در آرتمیای بکرزا طویل تر می شود ، در صورتیکه در *A. urmiana* هنوز تاری در این ناحیه ایجاد نشده است.

Post-metanaupliusIII (Larval 8=L8)

در این مرحله ۱۱ بند سینه ای و دو بند شکمی وجود دارد. پاهای سینه ای یک تا چهار دارای تارهای کامل و طویل بوده و بند پنج و شش دارای تارهای کوتاه می باشند. بندهای هفت و هشت لوبوله شده اما فاقد تار هستند، بقیه بندها در حال رشد می باشند (شکل K ۴).

Post-metanaupliusIV (Larval 9=L9)

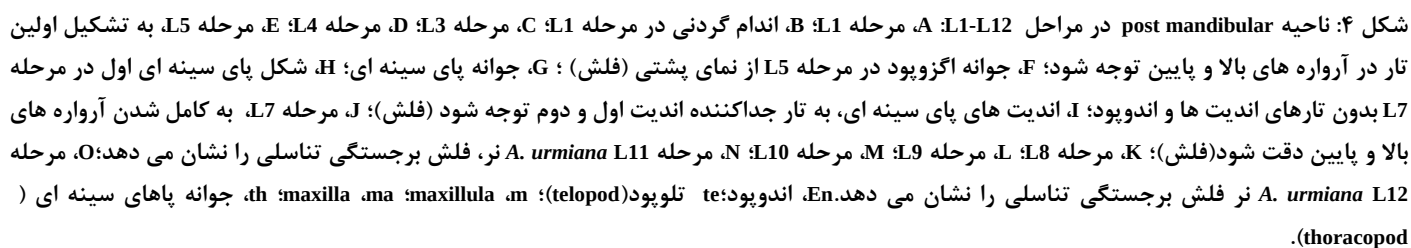
در ناحیه post-maxillary در این مرحله ۱۱ بند سینه ای و سه بند شکمی به چشم می خورد. پاهای سینه ای یک تا شش دارای تارهای کامل و بلند بوده، اما پای سینه ای هفت و هشت تنها تارهای کوتاهی دارند. بند نه نیز لوبوله شده و بند ۱۰ و ۱۱ به صورت جوانه می باشد. تعداد تارهای چنگال دمی در آرتمیای بکرزا زیاد تر شده اما در آرتمیای ارومیه هنوز تاری در این ناحیه ایجاد نشده است (شکل L4).

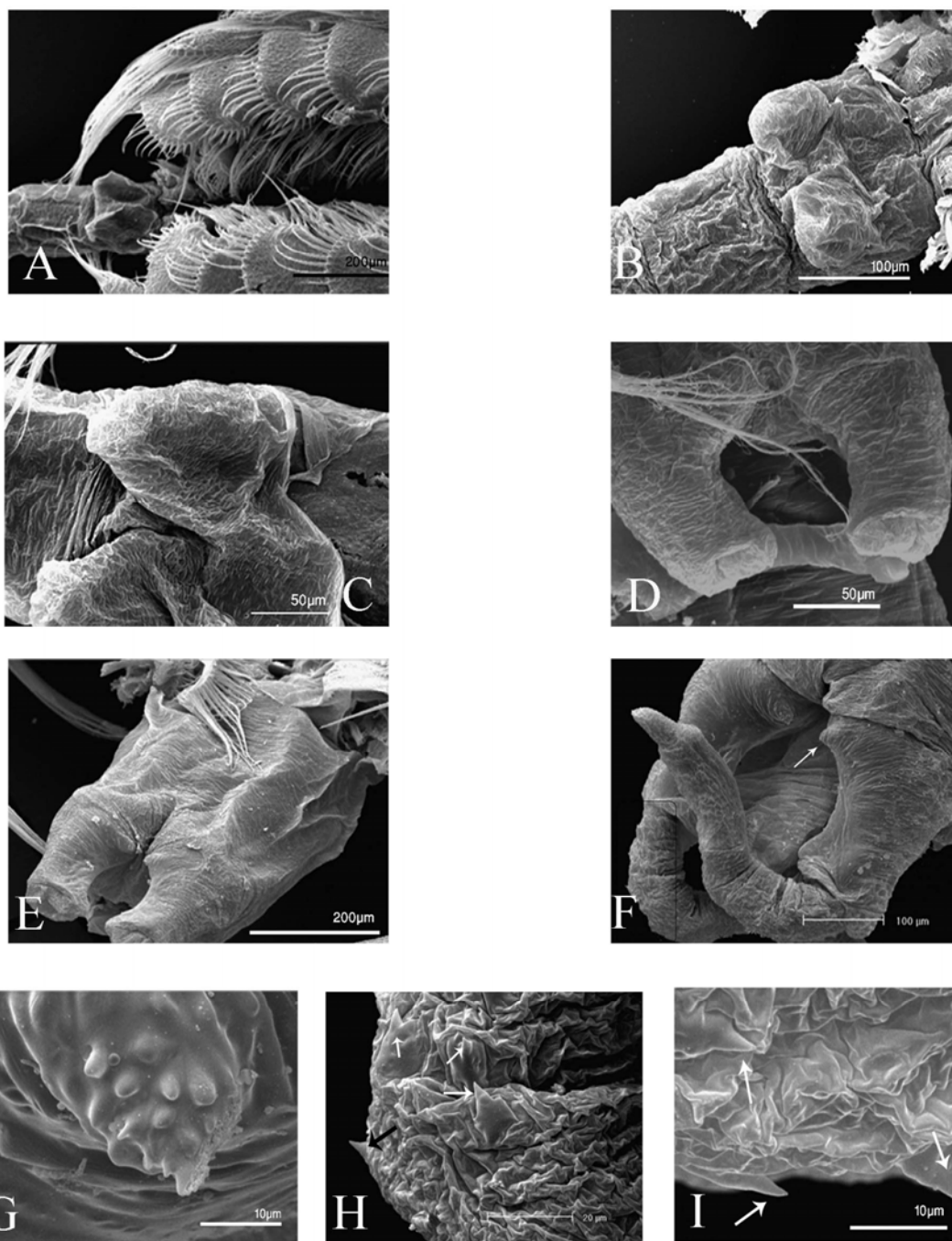
Post-metanaupliusV (Larval 10=L10)

پای سینه ای هفت تار کامل و بلند دارد، بند های هشت تا ۱۰ دارای تارهای کوتاه اند، بند ۱۱ به شکل جوانه، یا گاهی لوبوله شده است. در

دارای تار کوتاه و بند سینه ای ۱۱ لب دار شده یا دارای تارهای کوتاه می باشد. در ناحیه شکمی هفت بند ایجاد شده است. از این مرحله به بعد جنس نر و ماده *A. urmian* قابل تفکیک هستند.

پاهای سینه ای اول تا نهم دارای تارهای کامل است، پای سینه ای ۱۰





شکل ۵: تصاویر ناحیه تناسلی در مراحل L13-L17 و بلوغ در *A. urmiana* نر: A، تصویر SEM مرحله L13، فلش برجستگی تناسلی را نشان می دهد؛ B، مرحله L14؛ C، مرحله L15؛ D، مرحله L16؛ E، مرحله L17، به ایجاد یک جفت خار در بخش پایه ای پنیس دقت نمایید؛ F، ناحیه پایه ای و برگشت پذیر پنیس، خارها با فلش نشان داده شده اند؛ G، نوک برجستگی خار مانند در شکل F با بزرگنمایی بیشتر؛ H، خار نوع اول (فلش مشکی) و خارهای نوع دوم (فلش های سفید) در ناحیه انتهایی یا برگشت پذیر پنیس؛ I، خارهای نوع اول در ناحیه انتهایی یا برگشت پذیر پنیس.

Post-metanauplius VII (Larva 12=L12)

پاهای سینه ای ۱۰ و ۱۱ نیز دارای تارهای کامل می شوند، بندهای ناحیه شکمی کامل می شوند: هشت بند و تلسون. در ناحیه تناسلی برجستگی های تناسلی رشد کرده و برجسته تر می شوند. در نمونه های نر *A. urmiana* دو جفت زائده پنیس به هم متصل شده و به یک جفت زائده برآمده تبدیل می شود (شکل ۴O). اما در نمونه های ماده

در نرها اولین بند شکمی دارای دو زائده کروی شکل بوده و از نمای جانبی در این بند دو فرورفتگی دیده می شود (شکل ۴N)، اما در ماده ها در بند تناسلی یک برجستگی دیده می شود که مقدمه ایجاد اوویساک می باشد (شکل ۴A). در مورد *A. parthenogenetica* مرفولوژی توصیف شده برای نمونه های ماده *A. urmiana* دیده می شود.

آرتمیای ارومیه و بکرزا برجستگی اوویساک برآمده تر شده اما هنوز به شیار بین دو بند تناسلی نرسیده است (شکل B ۶).

Post larval period :

در طی این دوره که شامل پنج مرحله است لارو آرتمیا به ساختار نهایی و بالغ خود می رسد .

Postlarval I (Larval 13=L13)

در افراد ماده *A. urmiana* و نمونه های *A. parthenogenetica* برجستگی های تناسلی به رشد خود ادامه می دهند. نوک اوویساک در این مرحله پهن و به شیار بین دو بند تناسلی می رسد. تصاویر نمونه های ماده و نمونه های بکرزا در (شکل C ۶) دیده می شود. در نرها پنیس رشد کرده و دو بخش آن شروع به جدا شدن از هم می کنند (شکل A ۵).

Postlarval II (Larval 14=L14)

در افراد ماده *A. urmiana* و نمونه های *A. parthenogenetica* برجستگی های تناسلی تقریباً به صورت آزاد قرار می گیرند و نوک اوویساک از حالت مسطح خارج می شود (شکل D ۶). در افراد نر *A. urmiana* دو بخش پنیس تقریباً از یکدیگر جدا و طویل تر شده است (شکل B ۵).

Postlarval III (Larval 15=L15)

برجستگی های تناسلی در هر دو گونه *A. urmiana* و *A. parthenogenetica* رشد می کنند. در ماده ها بخش قدامی اوویساک برجسته تر می شود (شکل E ۶)، در نرها دو بخش پنیس طویل تر شده و شیار مربوط به مرز دو بند تناسلی نیز تقریباً از بین می رود (شکل C ۵).

Postlarval VI (Larval 16=L16)

شیار بین دو بند تناسلی از بین رفته و دو بخش پنیس نر به یکدیگر متصل و طویل تر می شوند (شکل D ۵). در ماده های آرتمیای ارومیه و آرتمیای بکرزا بر روی اوویساک دو جفت خار دیده می شود که جفت بالایی در پهن ترین بخش اوویساک قرار داشته و نسبت به خارهای پایینی بزرگتر می باشند (شکل F ۶).

Post-larval V (Larval 17=L17)

در ماده های آرتمیای ارومیه (شکل J ۶) و آرتمیای بکرزا (شکل G ۶) اوویساک طویل تر شده و در انتهای آن شیارهایی به چشم می خورد. خارها نیز برجسته تر شده اند.

در نرهای آرتمیای ارومیه بر روی پنیس دو خار ایجاد می شود و در انتهای آن نیز شیارهایی به چشم می خورد (شکل E ۵).

مرحله بلوغ:

تزئینات سطح کیسه نگهداری تخم در *A. urmiana* ماده و *A. parthenogenetica* مورد بررسی قرار گرفت. این تزئینات در شکل

های (شکل ۶K) و (شکل H ۶) به ترتیب در آرتمیای دو جنسی و بکرزا نشان داده شده است. آرایش تزئینات در *A. urmiana* به شکل لوزی های طویل با فاصله های کم است، در صورتیکه این تزئینات در کیسه نگهداری تخم آرتمیای بکرزا به صورت برجستگی های کروی دیده میشوند. دو جفت خار اوویساک نیز برجسته تر شده و از سوی دیگر در طرفین کیسه نگهداری تخم دو برجستگی کروی کوچک نیز ظاهر می شوند که این زائده در *A. urmiana* (شکل L ۶) برجسته تر از *A. parthenogenetica* است (شکل I ۶).

پنیس در افراد نر *A. urmiana* مورد بررسی قرار گرفت. در بخش پایه ای پنیس دو برجستگی خار مانند وجود دارد که تزئینات فلس مانند نوک آن در بزرگنمایی بالا کاملاً مشخص است (شکل E، F، G ۵). در بخش پایه ای ناحیه برگشت پذیر پنیس دو ردیف خار وجود دارد. ردیف اول در طرفین بخش پایه ای ناحیه برگشت پذیر ظاهر شده و پایه آنها کاملاً کروی و نوک آنها تیز می باشد. ردیف دوم خارها در موقعیت شکمی - جانبی قرار گرفته و ناحیه پایه ای آن ها مسطح است. نوک ناحیه انتهایی پنیس نیز انگشت مانند است (شکل H و I 5). در این مرحله حداکثر تعداد تارچه های روی چنگال دمی در *A. urmiana* چهار تا (شکل M ۶) و در *A. parthenogenetica* بیش از ۱۵ تار است (شکل N ۶).

بحث:

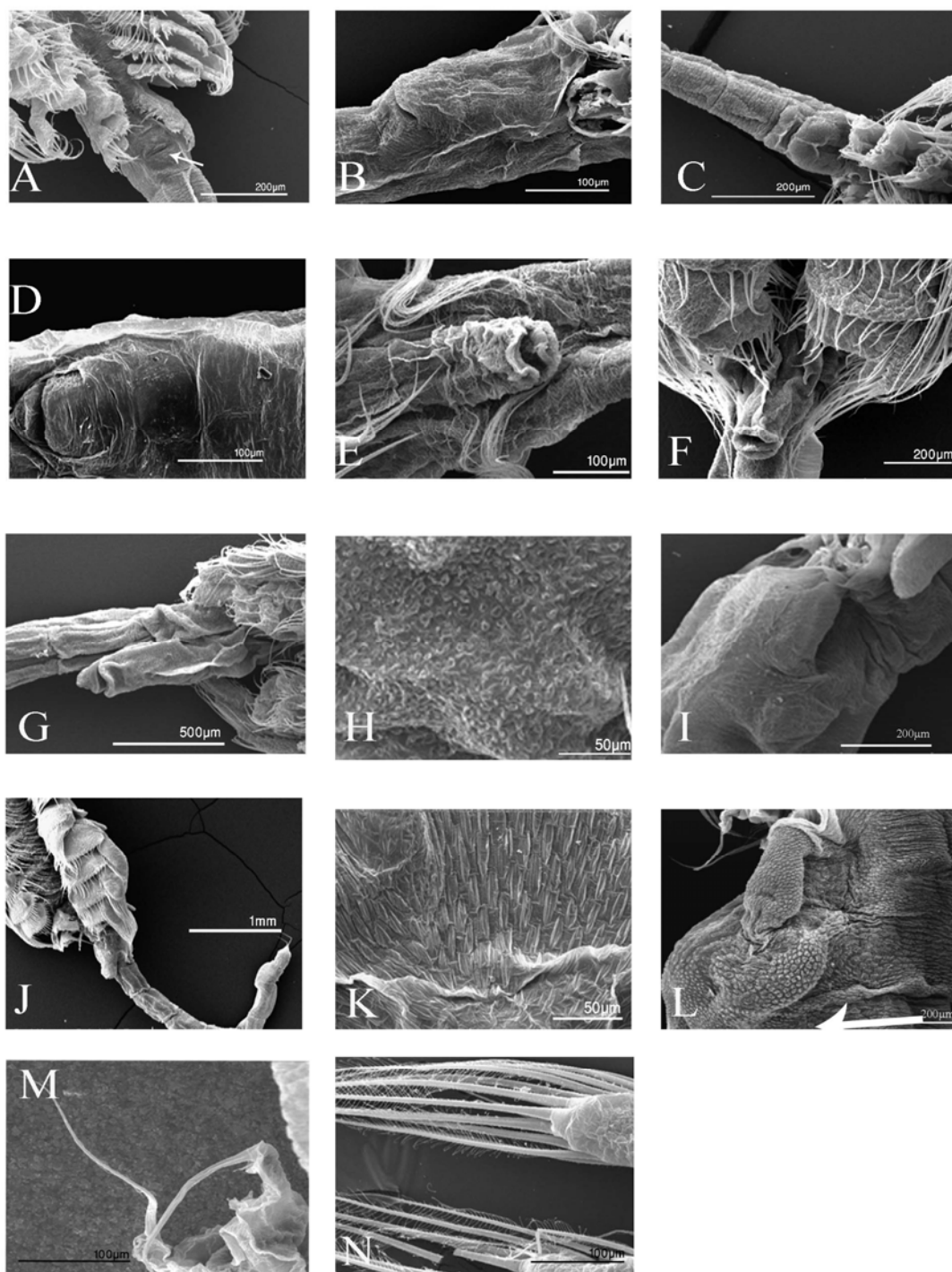
روند تکوین اندام های مختلف در دو گونه مورد مطالعه با یکدیگر و با این روندها، که قبلاً از *A. franciscana* و *A. persimilis* توصیف گردیده (Cohen et al. 1999; Schrehardt 1987b)، مقایسه شد.

شاخک اول در دو گونه مورد مطالعه در پژوهش حاضر، همانند *A. persimilis* (Cohen et. al 1999) در مرحله L10 به شکل نهایی خود می رسد، برخلاف *A. franciscana* که در مرحله LV به ساختار نهایی خود می رسد (Schrehardt 1987b).

از سوی دیگر در هر دو گونه *A. urmiana* و *A. parthenogenetica*، از مرحله L1 خارهای کوچکی در سطح شکمی شاخک حسی کوچک و ساختارهایی مشابه به منافذ موجود در سطح دندان دیده می شود، که در نمونه های مختلف تراکم آن ها متفاوت است. به وجود این خارها برای اولین بار در مطالعه حاضر اشاره شده است و در دیگر گونه های دو جنسی نیز به وجود آنها اشاره ای نشده است.

شاخک در مراحل مختلف نمو دچار تغییراتی می شود و بتدرج به ساختار نهایی خود می رسد. تغییرات شاخک در هر دو گونه مورد مطالعه در این پژوهش مشابه اند. در *A. urmiana* همانند *A. franciscana* (Schrehardt 1987b) اندوپود در مرحله L2 دارای چهار تار است، درحالیکه در *A. persimilis* در مرحله L2 اندوپود شاخک

دارای سه تار و در مرحله L4 دارای چهار تار می شود (Cohen et al. 1999).



شکل ۶: تصاویر نمو ناحیه تناسلی در مراحل L11-L17 در *A. urmiana* ماده، تزئینات کیسه نگهداری تخم، برجستگی جانبی کیسه نگهداری تخم و چنگال دمی در *A. urmiana* و *A. parthenogenetica* بالغ: A، مرحله L11، به برآمدگی تناسلی توجه شود (فلش)؛ B، مرحله L12، فلش برآمدگی تناسلی را نشان می دهد؛ C، مرحله L13، فلش برآمدگی تناسلی را نشان می دهد؛ D، مرحله L14، فلش برآمدگی تناسلی را نشان می دهد؛ E، مرحله L15، فلش برآمدگی تناسلی را نشان می دهد؛ F، مرحله L16، فلش برآمدگی تناسلی را نشان می دهد؛ G، مرحله L17 در *A. parthenogenetica*، فلش برآمدگی تناسلی را نشان می دهد؛ H، تزئینات کیسه نگهداری تخم در *A. parthenogenetica*؛ I، برجستگی جانبی در کیسه نگهداری تخم *A. parthenogenetica* بالغ (فلش)؛ J، مرحله L17 در *A. urmiana* ماده، فلش برآمدگی تناسلی را نشان می دهد؛ K، تزئینات کیسه نگهداری تخم در *A. urmiana* (فلش)؛ L، برجستگی جانبی در کیسه نگهداری تخم *A. urmiana* (فلش)؛ M، چنگال دمی *A. urmiana*؛ N، چنگال دمی *A. parthenogenetica*.

بخش انتهایی، یا ناحیه برگشت پذیر، دو گونه *A. franciscana* و *A. persimilis* را از یکدیگر تفکیک نموده و بر اهمیت استفاده از هر دو بخش پنیس در تفکیک گونه های آرتمیا تاکید نمودند. در مطالعه حاضر هر دو بخش پنیس در *A. urmiana* با استفاده از میکروسکوپ نوری و میکروسکوپ الکترونی نگاره برای اولین بار مورد بررسی قرار گرفتند. در بخش پایه ای پنیس برجستگی خار مانند دارای ضمام فلسی شکل وجود دارد. در ابتدای بخش برگشت پذیر پنیس، در *A. urmiana* نیز همانند *A. persimilis* دو ردیف خار وجود دارد. یک سری خار نوک تیز با پایه مدور در بخش جانبی و تعدادی خار با پایه های مسطح در بخش کناری-شکمی بخش برگشت پذیر پنیس دیده می شود. اما بخش انتهایی پنیس یک زائده انگشتی شکل دارد، که این ساختار در *A. franciscana* نیز وجود دارد. بنابراین بر اساس صفات بخش انتهایی پنیس، سه گونه *A. urmiana* و *A. persimilis* و *A. franciscana* از یکدیگر قابل تشخیص اند.

اما در دستگاه تناسلی خارجی ماده، تزئینات کیسه نگهداری تخم صفت مهمی به شمار می آید. این تزئینات در *A. urmiana* همان طور که در مطالعه Triantaphillidis et al. (1997) نیز توصیف شده است به شکل لوزی های باریک و برجسته است، اما این تزئینات در *A. parthenogenetica* به شکل برجستگی های کروی شکلند. شکل تزئینات کیسه نگهداری تخم در *A. urmiana* منحصر بفرد بوده و در هیچ کدام از گونه های دو جنسی دیگر دیده نمی شود (Triantaphillidis et al. 1997). دو برجستگی کناری کیسه نگهداری تخم در *A. urmiana* نسبت به *A. parthenogenetica* در مرحله مشابه، بزرگتر است که این اختلاف در اندازه احتمالا" به علت نقش این زائده در تشخیص جفت در طی فرایند جفتگیری در *A. urmiana* است.

تشکیل چنگال دمی در دو گونه *A. urmiana* و *A. parthenogenetica* در مراحل متفاوتی شروع شده و در مرحله بلوغ نیز کاملاً متفاوتند. در *A. urmiana* اولین تار روی چنگال دمی در مرحله L9 ظاهر شده و به تدریج رشد می کند، تا در نهایت در مرحله بلوغ حداکثر چهار تار روی آن دیده می شود. امادر مورد *A. parthenogenetica* اولین تار روی چنگال دمی در مرحله L5 ظاهر شده و در مراحل بعدی بتدریج بر تعداد این تارها افزوده می شود. تعداد این تارها در مرحله بلوغ بسیار زیاد و به بیش از ۱۵ تار می رسد.

در مجموع مطالعه حاضر با مطالعه ساختارها و صفات مورفولوژیکی خارجی دو گونه *A. urmiana* و *A. parthenogenetica* ضمن شناسایی و توصیف مراحل تکوین این ساختارها با مقایسه این یافته ها با یافته های مشابه در سایر گونه ها تفاوتها و شباهت هایی را مشخص کرد، که قابلیت استفاده در شناسایی و تمایز این گونه ها در مراحل لاروی را دارند.

در *A. urmiana* و *A. franciscana* (Schrehardt 1987b)، pep در مرحله L3 دو شاخه می شود، این در حالی است که در *A. persimilis* pep در مرحله L4 دو شاخه می شود (Cohen et al. 1999). در مرحله L11 *A. franciscana* pep و cs به شکل قیف های پایه ای (basal funnel) در می آیند (Schrehardt 1987b)، درحالیکه در *A. urmiana* و *A. persimilis* در این مرحله pep هنوز دو شاخه است و cs تحلیل رفته است (Cohen et al. 1999).

در *A. urmiana* برجستگی قدامی در مرحله L14 ظاهر می شود ولی در *A. persimilis* برجستگی قدامی در مرحله L11 نمایان می شود (Cohen et al. 1999). در مرحله L17 شاخک در نمونه های ماده، کوچک و در ناحیه پروتوپود دارای چندین تار می باشد. در نمونه های نر نیز پروتوپود دارای تارهایی می باشد. این تارها در *A. franciscana* (Schrehardt 1987b) و *A. persimilis* (Cohen et al. 1999) نیز مشاهده می شوند. در روی اگزوپود منافذ بسیار زیادی نیز دیده می شود. به وجود این منافذ در مطالعات قبلی در گونه های دیگر و دو گونه مورد مطالعه حاضر اشاره ای نشده است. برجستگی قدامی در همه گونه های دو جنسی آرتمیای دنیای قدیم و جدید نیم کروی است. گونه های دو جنسی آسیایی (*A. urmiana*، *A. sinica* و *A. tibetiana*) دارای تزئینات سطحی مشابه بوده و خارها و تارهای متراکمی دارند. *A. persimilis* برجستگی قدامی بزرگتر و تزئینات سطحی کمتری نسبت به *A. franciscana* دارد. در سطح برجستگی قدامی نیمه کروی در نرهای آرتمیای ارومیه خارها به شکل منفرد یا در دسته های دو یا سه تایی و تارها با یک سلول محافظ دیده می شوند.

ناحیه Post maxillary

جزئیات مراحل نموی بند های سینه ای و شکمی در دو گونه *A. urmiana* و *A. parthenogenetica* مشابه بوده و تفاوت قابل ملاحظه ای با یکدیگر ندارند. در هر دو گونه برجستگی های تناسلی از مرحله L11 قابل تشخیص بوده و سیر تحولات نیز در آن ها یکسان می باشد. پنیس در آرتمیاهای دوجنسی، دارای صفاتی است که در تشخیص گونه های دو جنسی آرتمیا قابلیت کاربرد دارد. (et al 1997) Triantaphillidis با استفاده از مرفولوژی پنیس و صفات ملکولی عنوان کرد که گونه های آرتمیای دوجنسی جنوب اروپا و شمال آفریقا همگی متعلق به گونه *A. salina* هستند. بخش پایه ای پنیس در جمعیت های دو جنسی مدیترانه ای (*A. salina*) فاقد برجستگی خار مانند است، در حالیکه در بقیه گونه های دو جنسی یک زائده خار مانند دارای دندانهای فلسی شکل در بخش پایه ای پنیس وجود دارد. (Torreterra and Belk 2002) با استفاده از مرفولوژی بخش قدامی و

تقدیر و تشکر:

صالحی، پارسا و کاظمی، پردیس علوم دانشگاه تهران، بخاطر همکاری آنها در مراحل مختلف کشت و پرورش و بخصوص جهت همامنگی امور ضمن تحقیق تشکر می نمایم

از جناب آقای وهاب زاده از دانشگاه ارومیه و آقای رضایی از دانشگاه تربیت مدرس، به ترتیب جهت فراهم نمودن سیستم های نمونه ها و تهیه تصاویر با میکروسکوپ الکترونی تشکر می گردد. از آقایان

منابع:

- آق ن.، نوری ف. ۱۳۷۶: معرفی یک گونه بکرزای آرتمیا از حوالی دریاچه ارومیه و مقایسه مرفولوژیکی آن با *A. urmiana* اولین کنگره جانور شناسی ایران، ۲۶ و ۲۷ شهریورماه ۷۶، تهران، صفحه ۸.
- Abatzopoulos, T.J., Agh, N., Van Stappen, G., Razavi Rouhani S.M., Sorgeloos P. 2006: *Artemia* sites in Iran. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* **86**: 299-307.
- 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
- Brendonck L., Belk D. 1997: On potentials and relevance of the use of copulatory structures in anostracan. *Hydrobiologia*. **158**: 201-214
- Cohen R. G., Gil S.G.R., Velez C.G. 1999: The post embryonic development of *Artemia persimilis* (Piccinelli and Prodoci). *Hydrobiologia*. **391**: 63-80
- Davoodi P., Rahimian H., Agh N. 2009: SEM study of the early development of the mandible of *A. urmiana* and *A. parthenogenetica* (Branchiopoda, Anostraca). *Crustaceana* **82** (3): 257-266
- 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
- Peterson A.J., Rosowski R. J. 1994: Scanning electron microscope study of molar surface development of *Artemia franciscana* Kellogg (Anostraca). *Journal of Crustacean Biology*. **14**: 97-112.
- Schrehardt A. 1987a: Ultrastructural investigations of the filter-feeding apparatus and the alimentary canal of *Artemia*. In: *Artemia Research and its Application*. Vol. 1, Sorgeloos, P., Bengeston, D. A., Declier, W., and E. Jasper (Eds.), Universa Press, Wetteren, Belgium. Pp.33-52.
- Schrehardt A. 1987b: A scanning electron microscope study of the post-embryonic development of *Artemia*. In: *Artemia Research and Its Application*. Vol. 1, P. Sorgeloos, D. A. Bengeston, W. Declier, and E. Jasper (Eds.), Universa Press, Wetteren, Belgium. Pp. 5-32
- Torrentera L., Belk D. 2002: New penis characters to distinguish between two American *Artemia* species. *Hydrobiologia*. **470**: 149-156.
- Triantaphyllidis G. V., Criel, G. R. J., Abatzopoulos, T. J., Thomas, K. M. J., Peleman, J. A. Beardmore and P. Sorgeloos, 1997: International Study on *Artemia*, L, VII. Morphological characters suggest conspecificity of all bisexual European and North African *Artemia* populations. *Marine Biology*. **129**: 477-487.
- Triantaphyllidis G. V., Criel G.R.J., Abatzopoulos T.J., Sorgeloos P. 1997. International study on *Artemia*, L, VII. Morphological study of *Artemia* with emphasis to Old World strains. I. Bisexual populations. *Hydrobiologia*. **357**: 139-153.
- Tyson G. E., Sullivan M. L. 1980: Scanning electron microscopy of the frontal knobs of the male brine shrimp. *Trans. Am. Microsc. Soc.* **99**(2):167-172.