مجلة الدراسات التربوية والعلمية - كلية التربية - الجامعة العراقية
العدد الثالث والعشرون - المجلد الثامن - علوم الحياة - تموز 2024 م
doi.org/10.52866/esj.2023.08.23.08

دراسة مظهرية وجزيئية لنوعين من متفرعة اللوامس Cladocera في محافظة بغداد

[1]بدور ستار عباس , [2]محمد مهدي جواد
1. الجامعة مستنصرية ، المركز العراقي لبحوث السرطان و الوراثية الطبية ، بغداد / العراق ،
bdoorstaat1989@uomustansiriyah.edu.iq
2. جامعة بغداد ، كلية التربية للعلوم الصرفة (ابن الهيثم)، بغداد / العراق.
muhammed.m.j@ihcoedu.uobaghdad.edu.iq

مستخلص

أجريت دراسة مظهرية وراثية لنوعين من عائلة براغيث الماء *Simocephalus* Family: Daphniidae, وهي *Simocephalus vetulus* , *Simocephalus congener* حيث جمعت العينات من مناطق مختلفة في مدينة بغداد (كورنيش الاعظمية، حي الشعلة)، إذ تم اعتماد الصفات المظهرية لتشخيص الانواع لغرض اجراء الدراسات الوراثية عليها والتمييز بينها في عدد من الاجزاء الجسمية مثل منطقة الرأس وشكل المنطقة الجبهية فيه shape of the frontal part of the head, ومنطقة نهاية البطن لاسيما المخلب البطني Abdomimal claw . اوضحت نتائج الدراسة ان نوع *S.vetulus* مسجل سابقاً في العراق اما النوع *S. Expinosus* بعد دراسته بالطرائق الوراثية الجزيئية واستناداً الى دراسات تشخيصية جزيئية تبين ان النوع *S. congener* والذي سجل لاول مرة في العراق. تضمن الجانب الوراثي تجارب مختبرية عديدة هدفت الى دراسة التنوع الوراثي بين الأنواع . وأظهرت النتائج الدراسة لجين COI ان حجم القطعة 709 زوج قاعدي، استعملت طريقة PCR-RFLP لقطع الدنا المضخم بتقانة PCR لتضخيم قطعة من الجين COI للمقارنة بين الانواع المدروسة والتابعة للجنس *Simocephalus* , إذ استعملت الانزيمات القاطعة SacI , BbsI وأظهرت نتائج الدراسة ان انزيم BbsI لايقطع في أي نوع من الأنواع المدروسة، بينما أنزيم SacI لم يقطع الدنا التابع لنوع S.vetulus اما في النوع الثاني *S.congener* فقد حصلنا على قطعتين الأولى حجمها 468 زوج قاعدي والثانية حجمها 241 زوج قاعدي، إذ اكدت نتائج عمل الانزيميين عدم وجود النوع *S. expinosus* في دراستنا الحالية وأن النوع المدروس هو *S. congener*.

كلمات مفتاحية : برغوث الماء العذب ، متفرعات اللوامس ، الحمض النووي للميتوكوندريا ، COI، الانزيمات القاطعة Sacl , Bbcl .

Study the phenotypic and molecular of two species of fresh water Cladocera in Baghdad city

[*]Budoor Sattar Abbas and , [**] Mohammed Mahdi Jawad
[*]Mustansiriyah University, Iraq Center for Cancer and Medical Genetic Research, *Baghdad /Iraq*,
Email: bdoorstaat1989@uomustansiriyah.edu.iq.
[**]*University of Baghdad, College of Education for Pure Science (Ibn Al-Haitham), Baghdad /Iraq.*
muhammed.m.j@ihcoedu.uobaghdad.edu.iq.

Abstract :

A genetic and morphology study was conducted for two species of the water flea family, Simocephalus Family: Daphniidae, namely Simocephalus vetulus and

Simocephalus congener. Samples were collected from different areas in Baghdad (Adhamiya Corniche, Al-Shu'la neighborhood), and the phenotypic characteristics

were adopted to diagnose the species and conduct genetic studies on them. And distinguishing between them in several body parts, such as the head area, the shape of the frontal part of the head, and the abdominal end area, especially the abdominal claw. The results of the study showed that there is a type S. vetulus recorded previously in Iraq, after studying it using molecular genetic methods based on our previous molecular diagnostic studies, it turned out to be S. congener, a species recorded for the first time in Iraq. The genetic aspect included many laboratory experiments aimed at studying the genetic diversity between species. The results of the study of the COI gene showed that the fragment size was 709 pairs. Basic. The PCR-RFLP method was used to cut DNA amplified using PCR technology to amplify a piece of the COI gene to compare between the species studied and those belonging to the genus Simocephalus. The cutting enzymes SacI and BbsI were used. The results of the study showed that the BbsI and SacI enzymes did not cut in any of the species studied. but in the second type S.congener we obtained two pieces, the first measuring 468 base pairs and the second measuring 241 base pairs. according the results of the two enzymes confirmed the absence of the S. expinosus type in our current study and the species studied was S. congener.

Key words: Daphnia, Simocephalus, mt DNA, COI gene, enzymes (SacI- BbsI), PCR (Polymerase chain reaction).

المقدمة

تعد رتبة متفرعات اللوامس Cladocera والمعروفة ببراغيث الماء Water fleas واحدة من اهم مجاميع الهائمات الحيوانية وهي ذات انتشار واسع في المسطحات المائية في انحاء العالم (Quenta وآخرون 2018)، تشكل هذه المجموعة جزءاً اساسياً من السلسلة الغذائية كما يتم استزراع افراد هذه المجموعة واكثارها بسهولة ليتم تغذية الاسماك والاحياء المائية بها (Sorf ،2017). يعتبر جنس Simocephalus من الاجناس المعروفة التي يطلق عليها اسم براغيث الماء Water fleas التي تضم اكثر من 100 نوع متباين في الشكل المظهري لذا فهي تعد نموذجاً جيداً لدراسة التباينات الوراثية (Brooks وآخرون 2011) ان فهم التأثيرات البيئية الواقعة على المجاميع السكانية يعد أمراً بالغ الاهمية لتوقع مدى تأثيرها في المادة الوراثية ومدى تغايرها وفهم كيفية مساهمة هذه العوامل في الاستجابة للتكيف (Barrientos وآخرون 2000)، اجريت إحدى الدراسات لتشخيص اربعة انواع تابعة لجنس Simo-cephalus وبعد استعمال تقانة PCR-RFLP على جين COl تم استعمال انزيمات تقييد منها BbsI ، SacI لتقطيع قطعة من الحامض النووي المايتوكوندري حجمها 709 زوج قاعدي ، اظهرت نتيجة الترحيل الكهربائي اختلافات واضحة بين الأنواع بسبب تأثير الانزيمات القاطعة وقد استعملت هذه الطريقة بشكل شائع لتشخيص الانواع التابعة لهذا الجنس (Kohout وآخرون 2014).

المواد وطرائق العمل

جمعت العينات من مناطق مختلفة في محافظة بغداد (كورنيش الاعظمية، حي الشعلة)، اذ تم جمع العينات من البرك المجاوره لأحد المبازل الزراعية، وهي برك مزدهرة بالنباتات المائية وخالية من الأسماك مع كثرة وجود الهائمات الحيوانية، تعتبر مياة نقية لا يتم فيها سكب مياه الصرف الصحي وبدأ الجمع العينات من تاريخ تشرين الاول 2018 الى اشباط 2019، بأستخدام شبكة الهائمات الحيوانية Zooplankton net ، بعدها وضعت في حاوية بلاستيكية حاوية على ماء النهر نفسه. ثم نقلت العينات الى المختبر لغرض تشخيصها بواسطة مجهر مركب compound micro-scope نوع Kruss , Germany لتشخيص الانواع spe-cies ، بأستعمال مفاتيح التصنيف (Olvera-Hernan-dez ،2001 ،pennak ، 1997) وشخص النوع الاول على انه D. magna والنوع الثاني هو Simocephalus vetulus وشخص النوع الثالث Simocephalus con-gener . اخذت الحيوانات بعد تشخيصها الى المختبر، نقلت الاناث الحوامل بعد ووضعها اليافعات الى حاويات اكبر حجماً وبعد عمل مزرعه نقية متكونه من اثنى حامل اخذت البالغات ووضعت في كحول 70٪ لغرض حفظ العينات الدراسة . *congener*.

الجانب الجزيئي

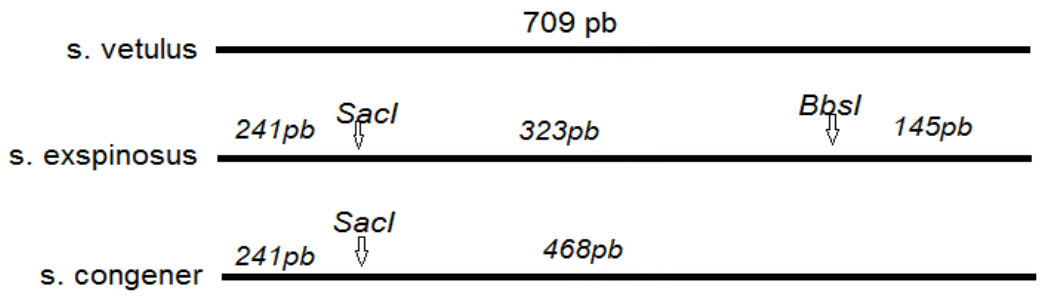
استعملت العدة (Geneaid, gSync TM DNA Extraction kit) والخاصة بعزل الدنا والمصنعة في شركة Geneaid التايوانية، وحسب طريقة العمل (protocol) المرفقة معها، بما ان الدراسة اجريت لغرض الحصول على التنوع الوراثي بين الافراد لذا تم اختيار الجين المناسبة للدراسة (Masclaux وآخرون 2017). ان زوج البوادئ التي استعملت لتضخيم القطعة والتي حجمها 709 زوج قاعدي بواسطة جهاز تقانة PCR هما البادئ LCO149 Forward GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG‘5)

3’) وهو بادئ متخصص بالمنطقة المدروسة (Young وآخرون 2016) ، أضيفت الكميات الاتية

من المواد المستخدمة لعمل جهاز تقانة PCR لغرض تضخيم منطقة الجين بإستخدم البادئ المذكور وكما يلي: 5µL من خليط PCR mix , 1+1 µL من كل بادئ (أمامي وراجع)، 13 µL من الماء المضاعف تقطيره , 5 µL من الدنا، للحصول على حجم الخليط الكلي 25 µL لكل انبوب (Young ولآخرون 2012)، وضع خليط pcr المذكور اعلى في جهاز Thermal cycler الخاص بتقانة PCR تم تشغيل البرنامج الخاص بجين COI (جدول1)، بعدها إستخدام انزيمين قاطعة (الجدول 2) لغرض معرفة التنوع الوراثي الموجود في المنطقة الجينية المدروسة من جزء من دنا المايتوكوندري المراد دراسته وهو جين COI بعد تفخيمة بإستخدام البادئ المناسب وحسب حدوث القطع بواسطة الأنزيم من عدمه . اذ استخدم الانزيمين SabI , BbsI على نفس القطعة اما تحضير الخليط الرئيسي لكل انزيم قاطع، ولقد تم استخدام الكميات الاتية من المواد المضافة وحسب النسب الموجودة في protocol , Restriction en- zymes 1 µL , 10 µL ناتج PCR المحتوي على الجين المطلوب BSA0.2 µL , RE buffer 2 µL, D. W.6.5 µL , ليصبح المجموع الكلي للخليط 20 µL ويحضن في جهاز تقانة PCR لغرض الحضن لمدة ساعتين وبدرجة حرارة 37 درجة مئوية حتى يتم الهظم بالكامل بعدها يضاف صبغة التحمل مباشرتآ الى الانبوب بعد اخراجها من الحاضنة لغرض ايقاف التفاعل ثم يتم تحميل الدنا على الهلام وكذالك استخدام الواصم الجزيئي المناسب بعدها يتم ترحيل الهلام لمدة ساعتين ثم يتم تصويرها لغرض معرفة حجم القطع المهظومة كما موضح في (الشكل1) .

جدول(1) البرنامج الخاص بالجين COI

التسلسل	المرحلة	درجة الحرارة المئوية	الوقت	عددالدورات
1	Initial Denaturation	94°C	3 دقائق	دورة واحدة
2	Denaturation DNA	94°C	40 ثانية	35 دورة
3	Annealing	45°C	45 ثانية	
4	Extention	72°C	دقيقة واحدة	
5	Find Extention	72°C	7 دقائق	دورة واحدة
6	Final	4°C	5 دقائق	–



الشكل(1) : خارطة التقييد للانزيمات القاطعة (SacI- BbsI) المستعملة في الدراسة توضح حجم القطع الناتجة لجين COI للانواع الثلاثة التابع لجنس Simocephalus , زوج قاعدي pb .

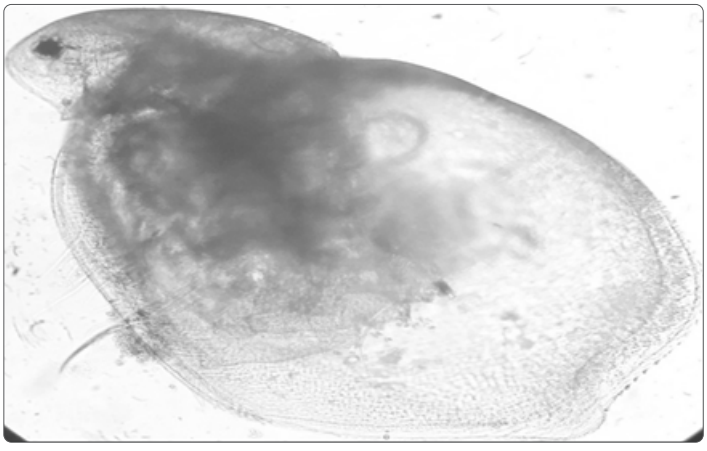
جدول(2) : حجم القطع للجين COI بأستعمال الانزيمات BbsI, SacI

زوج البوادئ المستعملة	الانزيمات المستعملة	حجم القطع الناتجة	حجم القطعة الأصلية	النوع
LCO 1498 HCO 2190	BbsI, SacI	bp 709	bp 709	S. vetulus
LCO 1498 HCO 2190	SabI, SacI	241+323+145bp	bp 709	S. exspinosus
LCO 1498 HCO 2190	BbsI, SacI	bp 241+468	bp 709	S. congener

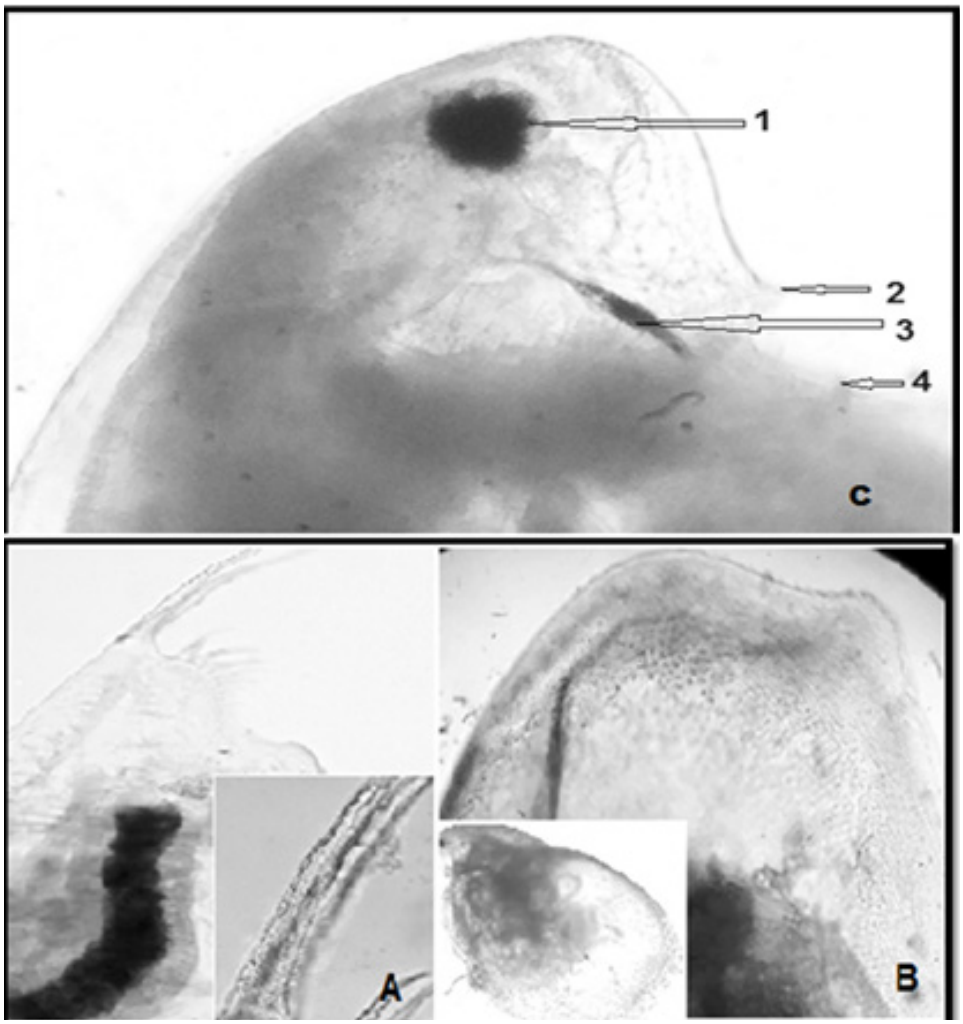
النتائج والمناقشة

دراسة التشخيص المظهري

شخصت في هذه الدراسة نوعان ينتمي الى الجنس Simocephalus ، شخصت العينات بأستعمال مفاتيح تصنيف خاصة بتصنيف هذه العائلة (Pen-nak,1978 ، Thorp وآخرون 2009، Olvera-Her-nandez وآخرون 2004)، وذلك لغرض عزل الاناث واستعمالها كنموذج في طريقة نسل الأم الواحدة Iso female line (Guo وآخرون 2018)، إذ تم تصنيف الانواع ابتداءً بالاعتماد على عدد من الصفات المظهرية للاجزاء الجسمية مثل منطقة الرأس Head وشكل المنطقة الجبهية فيه Shape of the frontal part of the head, ومنطقة نهاية البطن Postabdomen لاسيما المخلب البطني Abdominal claw (Thorp و Cov-ich 2009). تتصف النوع *Simocephalus vetulus* بأنه الجبهة الامامية للرأس مدورة Frontal part head rounded وتتميز بوجود عين بسيطة كبيرة الحجم وطولية Elongate Ocellus وهي صفة مميزة للنوع مع وجود عين مركبة واحدة Compound eye وزوج من اللوامس (شكل2). تكون النهاية الظهرية Dorso-pos-terior ذات زاوية غير حادة Blunt angle مع وجود بروز صغيرجداً Small prominence, ويتميز مخلب نهاية البطن Abdominal claw بأنه طويل نسبياً (Orlo-va-Bienkowskaja, 2001) , أما البكتين القاعدي Bas-al pecten فيكون على شكل شعيرات دقيقة Fine set-ules تمتد على السطحين الداخلي والخارجي للمخلب في نهاية البطن، كما توجد عشر اشواك مخرجية Anal Spines تتناقص من حيث الطول وصولاً الى المخلب (شكل3) وتعد هذه الميزة من اهم الصفات التشخيصية للنوع (Albhadlyو Jawad 2019).



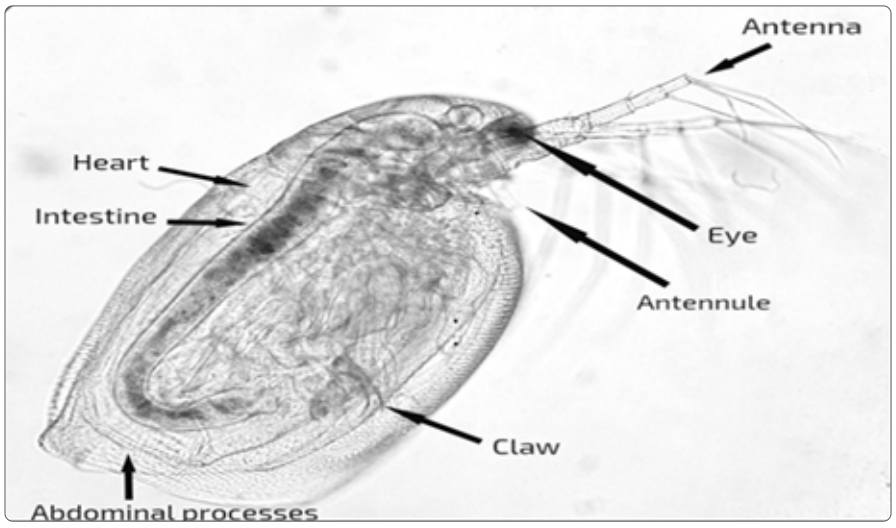
شكل(2) :
المظهر الخارجي
لأنثى
S. vetulus ،
قوة التكبير *10x*



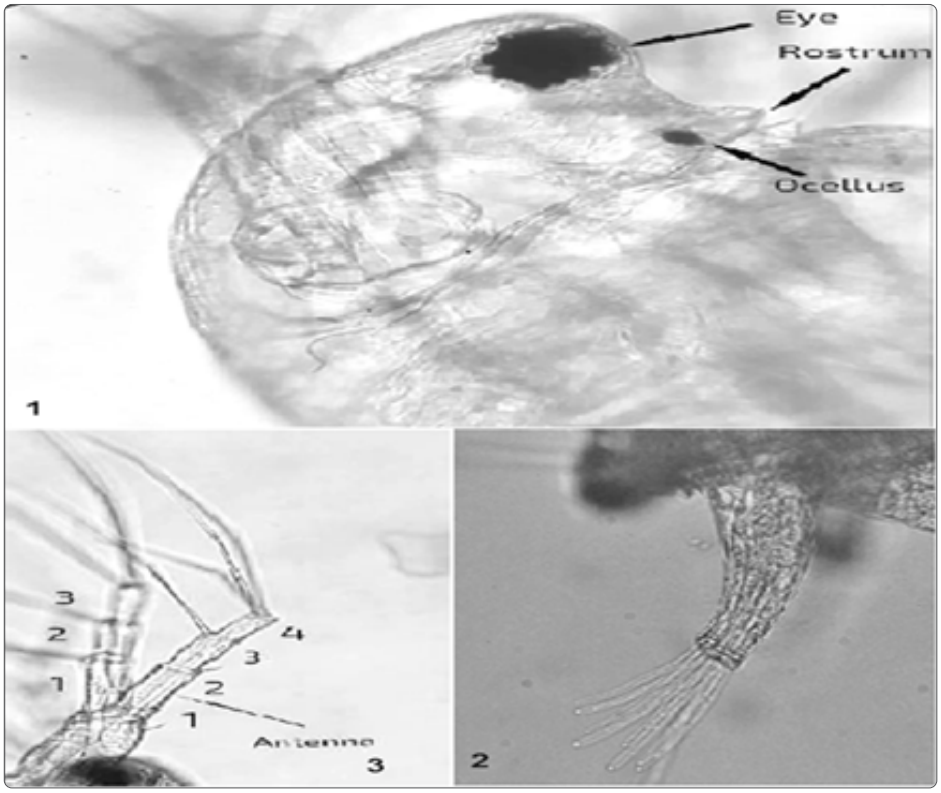
الشكل (3) : (C) أجزاء الرأس لأنثى *S. vetulus*
1. العين المركبة Compound eye 2. الخطم Rostrum 3. العين البسيطة Ocellus
4. الامس الاولي Antennules (A) مخلب البطن Abdominal claw (B,) النهاية الظهرية مع بروز صغير postero-dorsal valve small prominence, قوة التكبير 40x

يتصف النوع *S. congener* من الناحية المظهرية بأن الحافة الخلفية للمصراع تحتوي على عدد من الشعيرات التي تبدو وكأنها مخططة Dorsal posterior valve mar-gin with small tentacles , زاوية نهاية الجسم Pos-terior anal angle تميل لتكوين قمة ذات بروز منخفض (شكل 4)، الجزء الامامي من الرأس يحتوي على خطم مدور صغير Rostrum , تتصف العين المركبة Compound eye بأنها كبيرة الحجم اما العين البسيطة Ocellus صغيرة وغير منتظمة الشكل Short rhom-boid والامس الاولي Antennule يكون صغيراً انبوبي الشكل، يحتوي الامس الاولي في نهايته على عدد من الشعيرات seta (شكل 5) (Shu-Sen وآخرون 2015، Sine وآخرون 2015) .

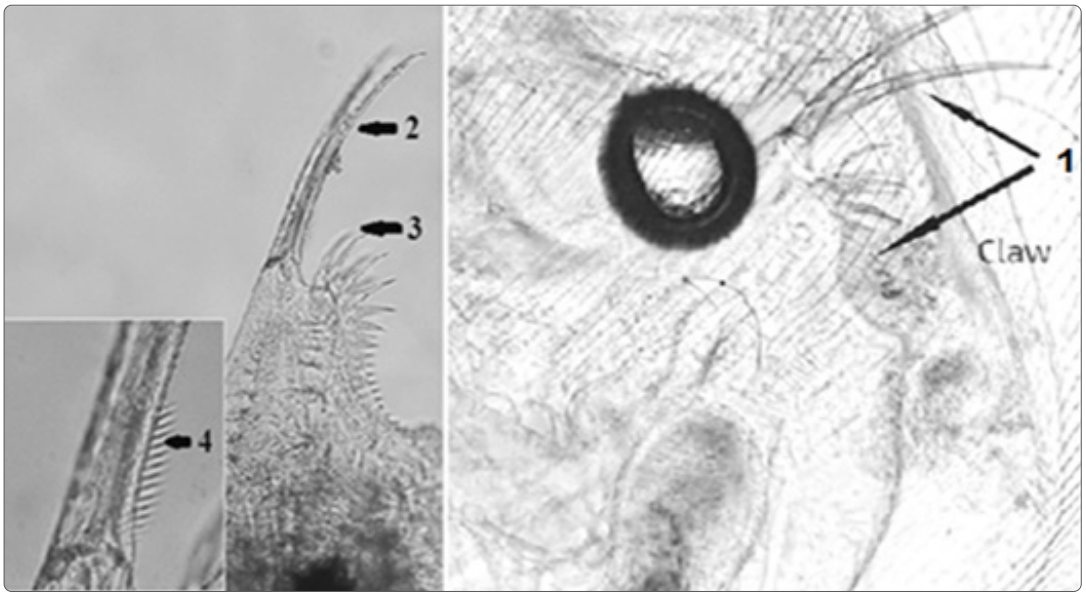
ان اهم الصفات التي يمكن ان تميز بها هذا النوع هو البكتين القاعدي القاعدي Basal pecten في مخلب نهاية البطن وهو يتكون من(9–20) من الشعيرات الصغيرة، أما الاشواك المخرجية Anal teeth فتتميز بأنها مفردة ويتراوح عددها بين(19 – 8)(شكل 6) وهي صفة مميزة للنوع (Albhadly و Jawad 2019).



شكل (4)
المظهر الخارجي لأنثى *S.congener* ,
قوة تكبير *10x*



شكل(5) : اجزاء الرأس لأنثى *S.congener*
1. العين المركبة Compound eye والعين البسيطة ocellus , 2. الوامس الاولي Antennules
3. زوج من الوامس الثانوية Antenna , قوة تكبير 40x.

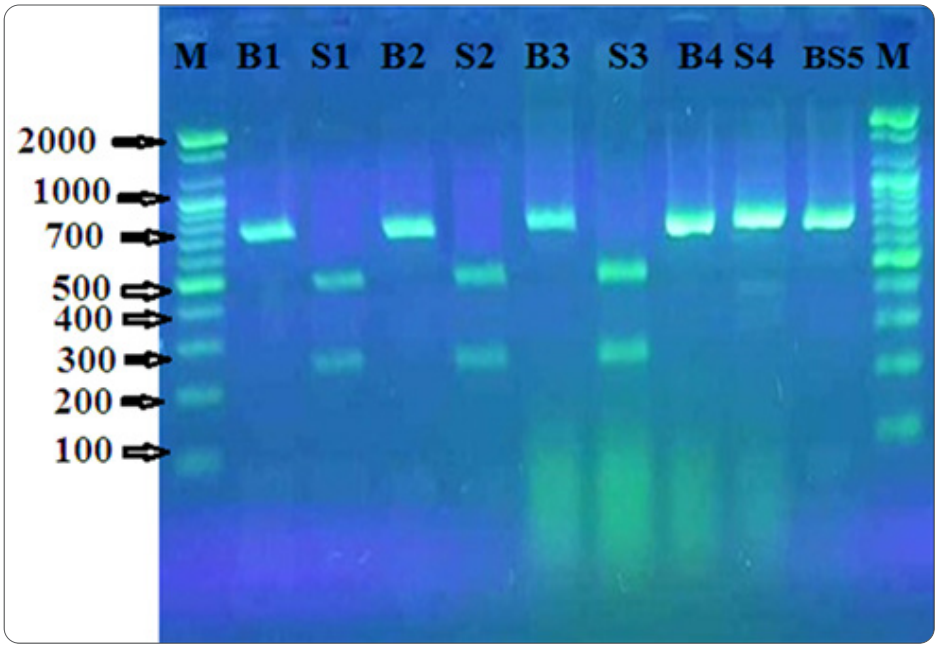


شكل(6) : منطقة نهاية البطن لأنثى *S. congener* ، 1. البروز البطني Abdominal processes
2. مخلب البطني Abdominal claw 3. الاشواك المخرجية Anal teeth
4. البكتين القاعدي Basal pecten on the post abdominal claw , قوة تكبير 40x .

الدراسة الجزيئية

اكدت اغلبية الدراسات الوراثية في العالم حصول الكثير من الاخطاء في التشخيص هذه الانواع بسبب كونها متقاربة جداً ويصعب التفريق بينها (Shu-sen وآخرون 2015، Jawad وآخرون 2017). ان استعمال طريقة PCR-RFLP مهم في دراستنا الحالية، ويتم في هذه الطريقة معاملة ناتج PCR مع الانزيمات القاطعة Restricition Enzymes والتي تخص حدوث قطع في قطعة الدنا المضخمة من عدمه (Pons وآخرون 2006)، وتم استعمال زوج البوادئ المتخصصة , HCO2190 LCO1498 لتضخيم قطعة من الجين المايتوكوندري COI للمقارنة بين الانواع المدروسة والتابعة للجنس Simocephalus, بسبب التقارب المظهري الكبير بين هذه الانواع لاسيما بين *S. expoinsus* , *S. congener* التي يصعب التفريق بينهما مظهرياً وكثيراً ما يعتمد على المفاتيح الخاصة بالتصنيف المظهري فقط (Guo وآخرون 2018)، ولاتوجد دراسة في العراق على المستوى الجزيئي تخص هذا الجنس، استعملت الانزيمات القاطعة SacI الذي يتعرف على التسلسل GAGCTC….-3 ….– 5 وهو لا يقطع هذه المنطقة في النوع *S.vetulus* إذ يبقى حجم القطعة الاصلية والذي هو 709 زوج قاعدي، على حاله، وهذا الأنزيم يقطع القطعة المدروسة في النوع *S.congener* في منطقة واحدة منتجاً قطعتين، الاولى حجمها 468 زوج قاعدي والثانية حجمها 241 زوج قاعدي بالنسبة لتشخيص النوع *S. congener* في حالة حدوث القطع (جدول2) في فصل مواد وطرائق العمل، اما الانزيم BbsI الذي يتعرف على التسلسل 5 - 3 -...GAAGACNN الموجود في قطعة الدنا المضخمة من الجين COI , فقد تبين ان هذا التسلسل بكامله غير موجود في نوع S.vetulus و S.congener لهذا لايحدث قطع بالانزيم، وهو يقطع في نوع اخر هو S.exspinosus , إذ تنتج القطعه الواحدة من

جزء الجين COI المقطوعة بالأنزيمين، ثلاثة قطع يكون حجمها 241 ، 323 ، 145 زوج قاعدي على التوالي، أي أن القطع إن حصل فأنه يدل على النوع الأخير وهو مالم يحدث في التجارب التي أجريت على هذا النوع في دراستنا الحالية . لقد اجريت اكثر من تجربة للتأكد من نتائج عمل الانزيم اذ تم تكرار العمل على 50 عينة تابعة لكلا النوعين *S.vetulus* و *S.congener* لغرض الحصول على افضل نتائج ممكنة، إذ تم استعمال كل انزيم لوحده في احدى التجارب، وأظهرت نتائج الدراسة ان انزيم BbsI لايقطع اي نوع من الأنواع المدروسة، إذ بقي حجم القطعة نفسها لكلا النوعين *S.vetulus* و *S.congener* الأمر الذي اكد لنا عدم وجود النوع S.exspinosus في العينات المدروسة في دراستنا الحالية، وأن هنالك نوع جديد يسجل لأول مرة في العراق هو النوع *S.congener* , بينما أنزيم SacI لم يقطع الدنا التابع لنوع *S.vetulus* اما النوع الثاني S.congener فقد حصلنا على قطعتين الأولى 468 زوج قاعدي والثانية حجمها 241 زوج قاعدي (الشكل7)، اما التجربة الثانية فقد اظهرت نتائج التجربة الأولى نفسها، إذ قمنا بخلط الانزيمين معاً حسب طريقة العمل الموجودة في البحث (Kohout وآخرون 2014) لمعرفة هل هناك تأثير في النتائج الدراسة (الشكل7)، وهذا يعني ان نتائج الدراسة الحالية تتفق في حجم القطقة المدروسة (Kohout وآخرون 2014). اذ اكدت النتائج على أهمية الدراسات الوراثية على هذه الكائنات نظراً لقدرتها على التكيف البيئي واستعمالها لكشف عن الاثار السلبية لمواد الكيميائية في بيئتنا. (Hader وآخرون 2018).



الشكل (7) توضح تقطيع قطع الجين COI بالانزيمينSacI , BbsI لأنواع تابعة للجنس Simocephalus مقارنة مع الواصم الجزيئيMarker Molecular من 100 – 2000 زوج قاعدي، 2٪ هلام الاكاروز وبفرق جهد كهربائي 70 فولت ولمدة ساعتين . B=BbsI, SacI , S. congener النوع = 3 - 1 , S. النوع = 4 , vetulus , BS5 = خلط الانزيمين معآ للنوع S. vetulus, M = الوصم الجزيئي .

الاستنتاجات والتوصيات

1- تسجيل نوع جديد تابع لعائلة Daphniidae لأول مره في العراق بالاعتماد على طرائق الوراثة الجزيئية وهو النوع Simocephalus congener العالمي في متحف التاريخ الطبيعي.

2- تشخيص بعض أنواع برغوث الماء S. vetu-lus, S. congener على المستوى الجزيئي لأول مرة في العراق.

3- التفريق بين الانواع المتقاربه التابعة لجنس Si-mocephalus عند دراسة قطعة من الدنا المايتوكوندري بأستعمال طريقة PCR-RFLP .

المصادر

- **Albhadly, B.** S.; Jawad, M.M.(2019) . Study of the Genetic Diversity in Three Species Belonging to Family: Daphniidae (Crustaceae, Cladocera) Collected from different Regions in Baghdad Province /Iraq . Journal of Global Pharma Technology . 2(11)56-65.
- **Barrientos,** A.; Muller, S.; Dey, R.; Weinberg, J. and Moraes, C. T. (2000) . Cytochrome c oxidase assembly in primates is-sensitive to small evolutionary variations in amino acid sequence. Molecular Biology and Evolution. 17, 1508–1519.
- **Brooks**, E.M.; Meester ,E.P.; Winfried ,L. and Nelson , G. H. (2011). Linking genes to communities and ecogenomic model . published online . 10 (14) : 1873-1882.
- **Guo, Z.;** Han, L.; Ding, Y.; Hou, X. and Liang, Z. (2018). Molecular characterisation of the complete nuclear ribosomal DNA sequence of the blacklip abalone Haliotis rubra. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research . (12):1-14.718,
- **Guo, Z.;** Han, L.; Ding, Y.; Hou, X. and Liang, Z. (2018). Molecular characterisation of the complete nuclear ribosomal DNA sequence of the blacklip abalone Haliotis rubra. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research . (12):1-14
- Hader, D. P. and Erzinger, G. S. (2018). Daphniatox. In Bioassays(pp. 221-240).
- **Jawad, M. M.**, Al-Asady, H. S., & Hussein, I. A. (2017). Study of Genetic Polymorphism in the Mitochondrial DNA of the Mediterranean Fruit Fly Ceratitis Capitata (Wiedemann, 1824) (Diptera: Tephritidae) Using the Method of PCR-RFLP in Three Governorates in the Middle Region of Iraq. Ibn AL-Haitham Journal For Pure and Applied Science . 25(3), 98-103.
- **Kohout,** J. ; Illyova, M. C. ; Iampor, F. C. and Iamporova-Zaovicova, Z. (2014) Discrimination between four Simocephalus species from Slovakia using a PCR-RFLP technique. Biologia 69: 76–79.
- **Masclaux,** H. and Richoux, N. B. (2017). Effects of temperature and food quality on isotopic turnover and discrimination in a cladoceran . Aquatic ecology. 51(1) : 33-44.
- **Olvera-Hernandez**, E. ; Martinez-Tabche, L. and Martinez-Jeronimo, F. (2004). Bioavailability and effects of malathion in artificial sediments on Simocephalus vetulus (Cladocera: Daphniidae). Bulletin of environmental contamination and toxicology . 73(1) : 197-204
- **Orlova-Bienkowskaja,** M. Y. (2001) Cladocera, Anomopoda: Daphniidae, genus Simocephalus. Leiden: Backhuys. 1–130.
- **Pennak,** R.W.(1978). Freshwater invertebrates of the United state. 3rded.John Wiley and Sons, New York: 387.

- **Young,** S. S.; Ni, M. H. and Liu, M. Y. (2012). Systematic study of the Simocephalus sensu stricto species group (Cladocera: morphometric and molecular analyses. Zoological Studies . 51(2) : 222-231
- **Zhang, Y. N.;** Zhu, X. Y.; Wang, W. P.; Wang, Y.; Wang, L.; Xu, X. X. and Deng, D. G. (2016). Reproductive switching analysis of Daphnia similoides between sexual female and parthenogenetic female by transcriptome comparison. Scientific reports . 6(4): 234-241
- Pons, J. ; Barraclough, T. G.; Gomez-Zurita, J.; Cardoso, A.; Duran, D.; Hazell, S. and Vogler, A. P. (2006). Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. Systematic biology . 55(4): 595-609.
- **Quenta Herrera**, E. ; Jacobsen, D.; Casas, J. and Dangles, O. (2018). Environmental and spatial filters of zooplankton metacommunities in shallow pools in high-elevation peatlands in the tropical Andes . Freshwater Biology . 63(5) : 432-442.
- **Shu-Sen** S. H. U.; Fei-Zhou, C. H. E. N.; Jun-Xing, Y. A. N. G. and Xiao-Yong, C. H. E. N. (2015). the first record of Simocephalus congener (koch, 1841) in china (Crustacean, Diplostraca, Daphniidae) . acta hydrobiologica sinica . 93 (4) : 850-852.
- **Sinev, A. Y.**, Gu, Y., & Han, B. (2015). Cladocera of Hainan Island, China Zootaxa . 4006(3) : 569-585.
- **Sorf, M.** ; Cabova, M. and Rychtecky, P.(2017). Environmentally-induced plasticity of life history parameters in the cladoceran Simocephalus vetulus. Limnologica-Ecology and Management of Inland Waters . 66 : 40-43.
- **Thorp,** J. H. and Covich, A. P. (Eds.). (2009). Ecology and classification of North American freshwater invertebrates. Academic press.
- **Wenping, W.** ; Kun , Z. and Shuixiu ,P.(2016). genetic diversity of daphnia pulex in the middle and lower reaches of the Yangtze rier. Journal pone . 25(8): 312-318.