

## معرفی گونه ۲۰۱۵ *Chondrilla* sp PG A از آب‌های ساحلی بوشهر (اولی جنوبی) با استفاده از ساختار مورفولوژی و روش ژنتیکی

- آرام روشن: گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، صندوق پستی: ۶۴۱۹۹-۴۳۱۷۵
- سیدمحمدباقر نبوی\*: گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، صندوق پستی: ۶۴۱۹۹-۴۳۱۷۵
- محمدعلی سالاری‌علی‌آبادی: گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، صندوق پستی: ۶۴۱۹۹-۴۳۱۷۵
- احمد سواری: گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، صندوق پستی: ۶۴۱۹۹-۴۳۱۷۵
- حسین ذوالقرنین: گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، صندوق پستی: ۶۴۱۹۹-۴۳۱۷۵

تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۹۴ تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۹۵

### چکیده

در این مطالعه برای اولین بار اسفنج‌های جنس *Chondrilla* از منطقه زیر جزر و مدی ساحل روستای اولی جنوبی (خلیج فارس)، با انجام عملیات غواصی در عمق ۸ متری، در آبان ماه ۱۳۹۳ جمع‌آوری گردیدند. موقعیت جغرافیایی منطقه  $27^{\circ} 49' 923'' N$ ،  $51^{\circ} 04' 130'' E$  می‌باشد. برای شناسایی مورفولوژیک نمونه‌های اسفنج، از روش هضم اسیدی استفاده گردید. نمونه‌ها فاقد ماکرواسپیکول بوده و فقط دارای دو نوع میکرواسپیکول *Oxyasters* و *Oxysphaerasters* می‌باشند که به صورت روکشی با ضخامت و رنگ‌های مختلف بر روی صخره‌ها دیده می‌شوند. برای شناسایی گونه‌های این جنس از روش مولکولی سیتوکروم اکسیداز  $CO_1$  استفاده شد. در این مطالعه ۴ نمونه از این جنس مورد شناسایی مورفولوژیک و مولکولی قرار گرفتند و یک گونه جدید به نام *Chondrilla* sp PGA ۲۰۱۵ شناسایی شد.

کلمات کلیدی: کندریلا، پوریفر،  $CO_1$ ، آنالیز مولکولی، طبقه‌بندی سنتی



## مقدمه

ناشناخته باقی‌مانده است و برخی از تغییرات عمده اخیر، بررسی سیستماتیکی در سطح گونه را پیشنهاد می‌دهد و داده‌های مولکولی به‌طور قابل توجهی به درک و فهم از سیستماتیک اسفنج کمک می‌کند (Van Soest و Hooper, ۲۰۰۲). علی‌رغم پیشرفت قابل توجه توسط داده‌های مولکولی، در ارتباط با تقسیم‌بندی فیلوژنیک از تمامی رده‌های اسفنج‌ها، چهارچوب طبقه‌بندی آن‌ها هنوز ناشناخته باقی‌مانده است. هم‌چنین آگاهی از تنوع زیستی (غناى گونه‌ای، بومی، پراکنش منطقه‌ای)، قرابت‌های تاریخی مربوط به جغرافیایی زیستی (Hooper و همکاران، ۲۰۰۲)، ابتدایی باقی‌مانده است و داده‌های کمی درباره تنوع ژنتیکی میان جمعیت‌های اسفنج وجود دارد. نسبت به دیگر گونه‌های بی‌مهرگان دریایی، گونه‌های اسفنج اغلب محدوده توزیع و پراکنش وسیع‌تری دارند. تنها فون اسفنج‌های چندین منطقه از جمله دریای کارائیب و استرالیا به‌خوبی شناخته شده‌اند، اما بیش‌ترین فون اسفنج‌های جهان هنوز ناشناخته باقی‌مانده‌اند. امروزه استفاده از مارکرهای مولکولی برای بررسی رابطه فیلوژنیک بین گونه‌ها کاربرد بسیاری پیدا کرده است. با این حال، تا امروز، تنها چند نشانگر توالی DNA برای مطالعه جمعیت‌های اسفنج استفاده شده است. DNA میتوکندری (mtDNA) فراوان‌ترین مارکر توالی DNA است که برای فیلوژنوگرافی بسیاری از گونه‌های حیوانات مورد استفاده قرار گرفته است، خصوصاً سیتوکروم اکسیداز (COI و COII)، زیرا به‌نظر می‌رسد این توالی‌ها بیش از حد در اسفنج‌ها حفظ شده است که برای ارائه اطلاعات کافی برای حل ارتباطات سطح جمعیتی بسیار مناسب است (Duran و همکاران، ۲۰۰۳).

سوابق و پیشینه تحقیق بیانگر این موضوع است که با وجود تنوع زیاد اسفنج‌ها در خلیج فارس، به‌دلیل شرایط خاص منطقه‌ای، تاکنون هیچ مطالعه‌ای در خصوص مباحث مورفولوژیکی و سیستماتیک مولکولی و بارکدینگ بر روی اسفنج‌های بسترهای صخره‌ای سواحل شمالی خلیج فارس انجام نشده است و این مطالعه می‌تواند باعث روشن کردن روابط فیلوژنی موجود بین گونه‌های جنس کندیلا این مناطق و دیگران مناطق جهان شود. ضمن این‌که احتمال معرفی گونه جدید نیز با این روش وجود دارد.

در سال‌های اخیر مطالعاتی بر روی اسفنج‌های خلیج فارس، به‌ویژه در منطقه جزر و مدی صورت گرفته است: sadeghi و همکاران (۲۰۰۸) هفت گونه *Callyspongia clavata*, *C. vasselli*, *Hyrtios erectus*, *Haliclona* sp., *Leucetta* sp., *Ircinia echinata*, *Dysidea cinerea* را در جزیره هنگام گزارش نمودند. همکاران Khoshkhou و همکاران (۲۰۱۲) نیز چهار گونه *Agelas* sp., *Haliclona* sp., *Ircinia* sp. را در جزیره لارک گزارش نمودند. هم‌چنین درخشش و همکاران (۱۳۹۲) میزان توده زنده و تولید را در اسفنج‌های خانواده

اسفنج‌ها شاخه متنوعی از جانوران بنتیک آبی هستند که اهمیت اکولوژیکی، تجاری و دارویی زیادی دارند و به‌عنوان یکی از مهم‌ترین گروه‌های اکولوژیکی اکوسیستم‌های ساحلی مطرح می‌باشند. آن‌ها اولین انشعاب تاکسونی چند یاخته‌ای هستند و به همین دلیل، اهمیت زیادی در بازسازی تکامل پریاخته‌ای اولیه دارند. با این وجود، فیلوژنی و سیستماتیک اسفنج‌ها هنوز تا حدود زیادی ناشناخته باقی‌مانده است و الگوهای دقیق این موجودات و روابطشان با دیگر جانوران غیرشعاعی در میان محققان هنوز مورد بحث است. در سال‌های اخیر پیشرفت‌های قابل توجهی در زمینه شناسایی اسفنج‌ها به‌دست آمده است. با توجه به جایگاه اسفنج‌ها در پایه درخت زندگی جانوران (Pick و همکاران، ۲۰۱۰)، از آن‌ها برای درک بهتر مدار اصلی تکامل جانوران اولیه و کشف Paleogenomics از آخرین جد مشترک، استفاده می‌گردد (Taylor و همکاران، ۲۰۰۷).

اسفنج‌ها میان ۲۸ شاخه بی‌مهر آبی، متنوع‌ترین و موفق‌ترین گروه هم در تعداد گونه‌ها و هم در رنج خصوصیات مورفولوژیکی‌شان هستند. هم‌چنین سازگاری بالایی در تغییرات موقتی فاکتورهای محیطی دارند. تعداد گونه‌های شناسایی شده اسفنج در مقالات مختلف، متفاوت است، اما به‌نظر می‌رسد تاکنون ۱۱۰۰۰ گونه به ثبت رسیده باشد که تقریباً ۸۵۰۰ گونه آن‌ها معتبر است (Soest و همکاران، ۲۰۱۲)، اما تخمین زده می‌شود دست کم، ۱۵۰۰۰ گونه زنده در همه دریاها و دریاچه‌های جهان، وجود دارد. اگرچه اسفنج‌ها نسبت به رسوبات معلق محیط اطراف خود بسیار حساس هستند اما مقاومت زیادی در برابر آلودگی‌های فلزات سنگین و هیدروکربنی از خود نشان داده و بسیاری از گونه‌های آن‌ها می‌توانند این نوع آلاینده‌ها را در خود جمع کنند، بدون این‌که صدمه آشکاری ببینند. اسفنج‌ها متحرک نیستند بنابراین نمی‌توانند از شکارچینی نظیر ماهی‌ها، لاک‌پشت‌ها، شکم‌پایان، خارپوستان، کرم‌های پهن و غیره فرار کنند (Hooper, ۲۰۰۰). از این‌رو با استفاده از مکانیسم‌های دفاعی چون مکانیسم‌های شیمیایی (ساختار اسکلتی یا اسپیکول‌ها) و بیوشیمیایی از خود محافظت می‌کنند. بسیاری از تولیدات بیوشیمیایی اسفنج‌ها به‌وسیله بیولوژیست‌ها، بیوشیمیست‌ها و بیوتکنولوژیست‌ها به‌دقت مورد مطالعه قرار گرفته و ترکیبات ضد میکروبی، ضد التهابی، ضد تومور، ضد درد و غیره از آن‌ها شناسایی شده است. این ترکیبات اغلب از طریق راه‌های بیوشیمیایی ناشناخته سنتز می‌شوند.

اسفنج‌ها نقش مهمی در تشخیص ارتباط تکاملی موجودات چند سلولی را برعهده دارند، اما بسیاری از جنبه‌های اساسی زیست‌شناسی و به‌خصوص روابط مربوط به جغرافیایی زیستی آن‌ها هنوز مبهم و

شهرستان دیر حد فاصل کنگان - دیر استان بوشهر قرار گرفته است. نمونه‌های اسفنج مورد مطالعه با انجام عملیات غواصی از مناطق زیر جزر و مدی E ۱۲۵' ۵۴" ۵۱ N. ۴۹' ۹۲۳" ۲۷ در عمق ۸ متری در آبان ماه ۱۳۹۳ جمع‌آوری گردید. علاوه بر ثبت مشخصات زیستگاه، موقعیت جغرافیایی منطقه، خصوصیات متریک و مریستیک هر نمونه هم‌چون: اندازه، رنگ، استحکام بافت و شکل رشد نمونه ثبت گردید. هم‌چنین از نمونه‌های جمع‌آوری شده عکس‌های میدانی تهیه گردید. بلافاصله بعد از جمع‌آوری، نمونه‌ها به همراه یخ خشک منتقل گردید، تا رنگ و مواد زنده آن‌ها سالم باقی بماند. برای جلوگیری از آلودگی اسپیکولی، نمونه‌ها در ظروف مجزا قرار داده شدند. پس از انتقال نمونه‌ها از محل نمونه‌برداری و ثبت خصوصیات مریستیک، بخشی از هر نمونه به اتانول ۹۶٪ جهت انجام آنالیزهای مولکولی و بخشی دیگر از نمونه جهت انجام آنالیزهای مورفولوژیک به اتانول ۷۰٪ منتقل گردید.

Haliclonidae در شمال غرب خلیج فارس بررسی نموده‌اند. مقصودلو و همکاران (۱۳۹۲) یازده گونه *Hyrtios erectus*; *Spongia arabica*; *C. Callyspongia* sp.; *Haliclona tuberosa*; *Ircinia echinata*; *Callyspongia clavata*; *Terpios viridis*; *Dysidea vasselli*; *Gelliodes carnosus*; *Leucetta* sp. *cinerea*; را در منطقه زیر جزر و مدی جزایر کیش، لارک و خلیج نایبند گزارش نمودند. هم‌چنین، Safaeian و Eisapor (۲۰۱۳) هفت گونه *Amphimedon viridis*; *fallax*, *Haliclona cinerea*, *Haliclona rosea*, *Cliona dioryssa* را در منطقه اینتر تاییدال در شمال جزیره هنگام مورد بررسی قرار دادند. در مطالعه حاضر، جنس *Chondrilla* از منطقه زیر جزر و مدی سواحل صخره‌ای خلیج فارس در منطقه اولی جنوبی استان بوشهر برای اولین بار شناسایی و معرفی گردید که از این جنس ۱ گونه جدید شناسایی و ثبت گردید.

## مواد و روش‌ها

در این مطالعه اسفنج‌های دریایی جنس کندریلا از منطقه زیر جزر و مدی ساحل اولی جنوبی جمع‌آوری شد. روستای اولی از توابع



شکل ۱: موقعیت جغرافیایی روستای اولی

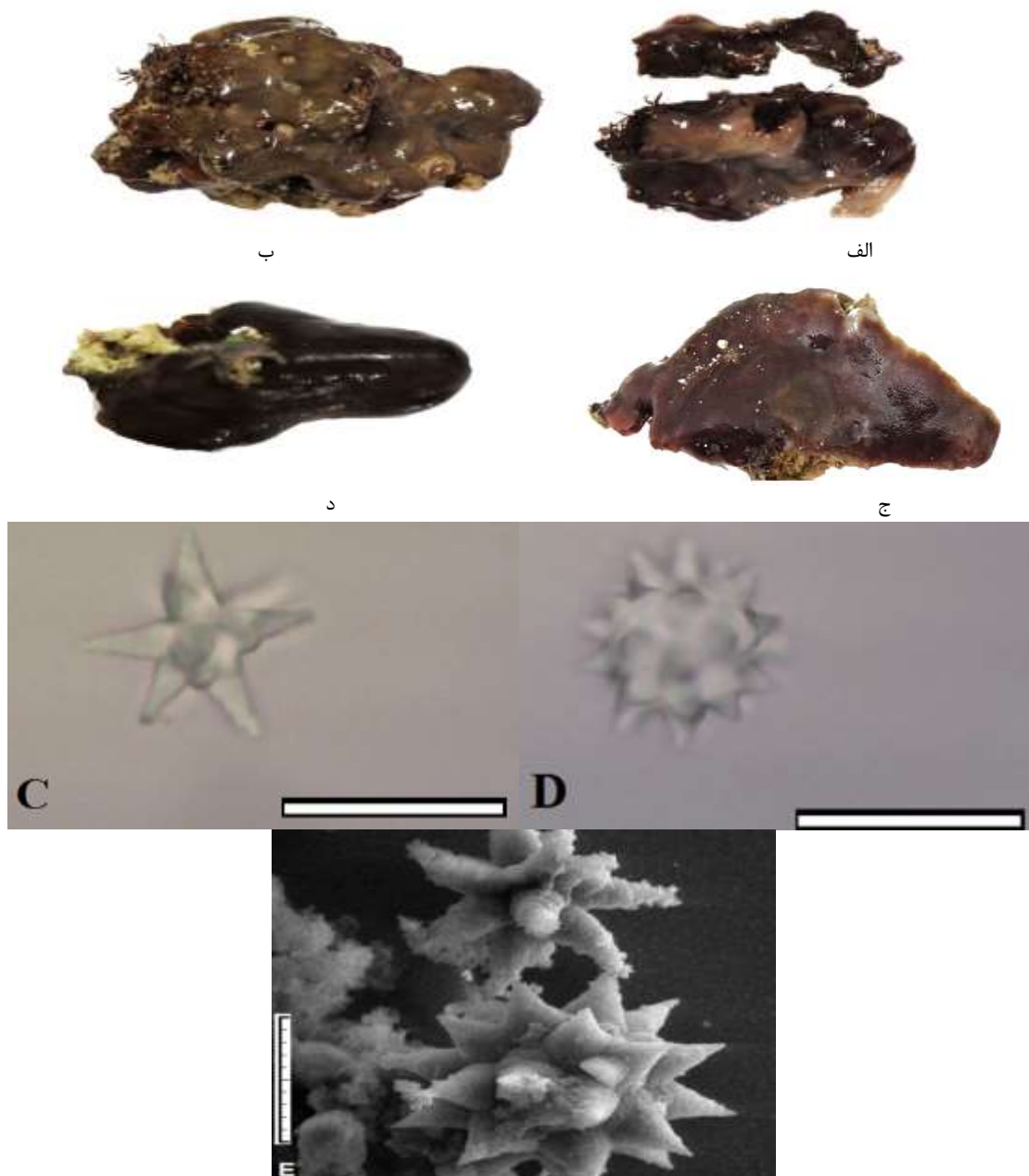
گذشت مدت زمانی کوتاه ترکیبات آلی حل شده و فقط اسکلت معدنی باقی می‌ماند. لوله‌ها در سانتریفیوژ با دور ۳۰۰۰ rpm به مدت ۳-۵ دقیقه قرار داده شدند. بعد از گذشت ۵ دقیقه اسپیکول‌ها رسوب کرده، سپس مایع سفیدکننده با دقت با پیپت برداشته شد و در نهایت بافت‌ها چندین بار با دقت شسته شدند، برای این کار، آب دو بار تقطیر و سپس اتانول ۹۶٪ جایگزین شد. در پایان، از سوسپانسیون اسپیکول

آماده‌سازی اسپیکول: تهیه اسپیکول براساس روش Hooper (۲۰۰۰) انجام شد که برای این منظور قطعات کوچک اسفنج را در لوله‌های سانتریفیوژ قرار داده و مقداری مایع سفیدکننده تجاری (هیپوکلریت سدیم) به آن‌ها اضافه گردید. بستگی به نوع بافت اسفنج زمان هضم مواد آلی نمونه‌های اسفنج متفاوت بوده به طوری که در برخی از نمونه‌ها هضم مواد آلی چندین ساعت به طول انجامید. بعد از



اسپیکول‌های نوع *Oxysphaerasters* و ۲۵ عدد از نوع *Oxyasters* اندازه‌گیری و میانگین آن‌ها محاسبه گردید. عکس‌برداری از نمونه‌ها با استفاده از دوربین Dino-Eye مدل X ۴۰۲۳ AM قابل اتصال به کامپیوتر انجام گردید. آماده‌سازی اسپیکول جهت تهیه تصاویر الکترونی SEM به روش ذکر شده انجام شد.

تمیز با پیپت برداشت شده و بر روی لام قرار داده شد. باید به این نکته مهم توجه شود که طی هر مرحله که با پیپت اسپیکول برداشت می‌شود لوله را به سمت چپ نگه داشته تا مانع از ریختن اتفاقی اسپیکول‌های کوچک‌تر شود. قطر اسپیکول‌هایی که با اسیدهیپوکلریک پاک‌سازی شدند با استفاده از میکروسکوپ نوری Olympus اندازه‌گیری شدند. برای انجام این کار از نرم‌افزار Digimizer قطر ۲۵ عدد از



شکل ۲: الف، ب، ج و د. نمونه‌های گونه *Chondrilla* sp PG A ۲۰۱۵. C. میکرواسپیکول نوع *Oxysphaerasters*. D. میکرواسپیکول نوع *Oxyasters* (مقیاس ۴۰× H&E). E. تصویر Scanning electron microscope (SEM) (مقیاس ۲۰ میکرومتر).

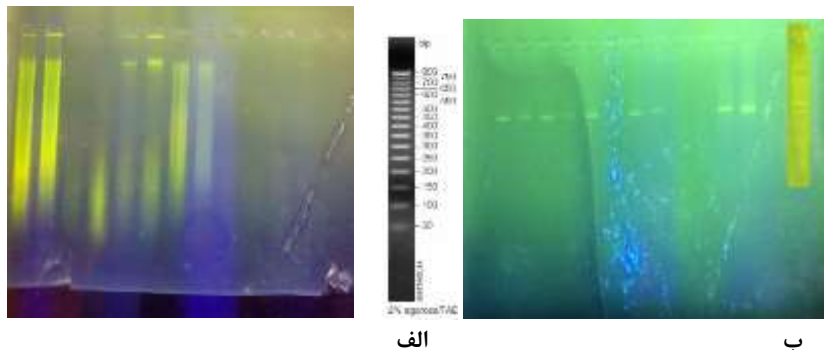
درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. سپس فاز رویی دور ریخته شده و جهت معلق‌سازی پلیت DNA، ۱ میلی‌لیتر از محلول ۱ mM (۱۰ mM Tris-HCl pH ۸.۰, EDTA, ۱ M NaCl) اضافه کرده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون می‌گردد. سپس جهت ته‌نشینی DNA، ۱ میلی‌لیتر از محلول ۹۶% ethanol/۳ M NaOAc به نسبت ۳۰:۱ اضافه گردید. مجدداً به مدت ۱۰ دقیقه و با دور ۱۲۰۰۰rpm و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. بعد از سانتریفیوژ، فاز رویی دور ریخته شده و به هر میکروتیوپ ۵۰۰ میلی‌لیتر الکل ۷۰٪ اضافه نموده و به مدت ۱۰ دقیقه و با دور ۱۲۰۰۰rpm و با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. بعد از سانتریفیوژ، الکل رویی به آرامی خارج گردید. نمونه‌ها را روی rach چیده و به مدت ۳۰ دقیقه در گوشه آزمایشگاه قرار داده تا الکل اضافی خارج گردد. بعد از طی زمان، به هر نمونه ۵۰ میکرولیتر آب استریل افزوده و به مدت ۱ شبانه‌روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید (Meixner و همکاران ۲۰۰۷).

#### تکثیر قطعه ژن هدف و انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

(PCR): ژنوم COI با تقریباً ۶۰۰ bp از توالی میتوکندری با استفاده از جفت پرایمر جهانی  
 ۵'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-۳' (LCOI۴۹۰)  
 ۵'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-۳' (LCO۲۱۹۸) تکثیر شدند (Flormar و همکاران، ۱۹۹۴). واکنش PCR در حجم‌های واکنشی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR، یک میکرولیتر  $MgCl_2$ ، یک میکرولیتر از هر پرایمر، ۰/۵ میکرولیتر dNTP، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq polymerase، ۱۷/۷ میکرولیتر آب، یک میکرولیتر DNA الگو انجام گردید. برنامه انجام PCR برای ژن COI طبق دستوالعمل تغییر یافته Meixner و همکاران (۲۰۰۷) انجام گردید و جهت توالی‌یابی به شرکت bioneer کره فرستاده شد.

#### استخراج ژنوم DNA: برای استخراج ژنوم DNA از روش تغییر

یافته CTAB استفاده گردید که بدین ترتیب می‌باشد. تکه‌های کوچکی از هر نمونه با قیچی استریل جدا و به مدت یک ساعت در آب نگهداری شد تا الکل موجود در نمونه‌ها خارج گردد. سپس جهت آگیری کامل، نمونه‌ها به مدت ۴ تا ۶ ساعت در دستگاه فریزدرایر قرار گرفتند. حدود ۵۰-۷۰ میلی‌گرم از هر نمونه را درون میکروتیوپ ۲ میلی‌لیتری ریخته و با قیچی هموزن تا به حالت پودری شکل تبدیل شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از بافر ۲% CTAB، ۱۰۰ mM Tris-HCl pH ۸.۰، ۲۰ mM EDTA، ۱.۴ M NaCl) را به آن افزوده و به مدت ۱۰ ثانیه با دور کم ورتکس شد. سپس به مدت ۱ ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد در حمام آب گرم نگهداری شده و بعد از آن ۱ میلی‌لیتر از مخلوط کلورفرم/ایزوامیل‌الکل (۱:۲۴) به آن افزوده شد و به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس گردیده و جهت فاز جداسازی، نمونه‌ها در دستگاه سانتریفیوژ قرار داده شدند. دستگاه روی دور ۱۲۰۰۰rpm، به مدت ۱۰ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. نمونه‌ها از دستگاه خارج گردید. محلول به دو فاز تقسیم شده است. فاز رویی را جدا نموده و در میکروتیوپ‌های جدید، طبق شماره‌گذاری قبل ریخته شد. به هر میکروتیوپ یک پنجم حجم نمونه، بافر ۵% CTAB / (۵% CTAB, ۰.۳۵ M NaCl) میکس کرده و در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ دقیقه انکوباسیون شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از مخلوط کلورفرم/ایزوامیل‌الکل به آن افزوده و به مدت ۱ دقیقه ورتکس گردید. نمونه‌ها با شرایط قبل (دور ۱۲۰۰۰rpm، ۱۰ دقیقه، ۴ درجه سانتی‌گراد) سانتریفیوژ گردیدند. نمونه‌ها از سانتریفیوژ خارج نموده، فاز رویی را جدا کرده و در میکروتیوپ‌های جدید ریخته شدند. به هر میکروتیوپ ۱-۱.۵ میلی‌لیتر از بافر ۱% CTAB، ۵۰ mM Tris-HCl، ۱۰ mM EDTA، ۸.۰ pH) به میکروتیوپ اضافه گردید. برای ته‌نشینی به مدت ۲ ساعت و نیم در دمای اتاق انکوباسیون شد. بعد از طی مدت زمان نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه و با دور ۱۲۰۰۰rpm و در دمای ۴



شکل ۳: الف) نمونه DNA استخراجی (ب) باند محصولات PCR



شد. آنالیز MP برای داده‌ها به همراه توالی‌های مرجع با استفاده از نرم‌افزار PAUP نسخه ۴b۱۰ (Sowfford, ۲۰۰۳) انجام گرفت. کلادهای MP با ۱۰۰۰ تکرار بوت استرپ بررسی شدند.

## نتیجه

در این مطالعه ۴ نمونه *Chondrilla* sp PG A ۲۰۱۵، *Chondrilla* sp PG D ۲۰۱۵، *Chondrilla* sp PG C ۲۰۱۵، *Chondrilla* sp PG B ۲۰۱۵ در تحقیق حاضر مورد مطالعه مورفولوژیک و توالی‌یابی قرار گرفتند. طول توالی به‌دست آمده بخشی از ژن COI میتوکندری برای شناسایی این نمونه‌ها در حدود ۶۰۰ جفت باز گزارش شد. تطبیق توالی‌های به‌دست آمده با توالی‌های موجود نمونه‌های مشابه که برای ژن COI در بانک جهانی NCBI ثبت شده بود؛ نشان داد، که هر ۴ توالی کاملاً یکسان هستند و هیچ کدام از توالی‌ها با توالی‌های گونه‌های مشابه در بانک جهانی، منطبق نیستند. این توالی با دریافت شماره پذیرش در بانک داده جهانی NCBI به‌عنوان گونه *Chondrilla* sp (Accession number LC۱۰۱۷۹۶) ۲۰۱۵ (PGA) معرفی شد. در مطالعات مورفولوژیک ۴ نمونه کندریلا از نوع روکشی بودند، اما از نظر ضخامت، رنگ، حالت ارتجاعی با هم اختلاف داشتند. نمونه‌ها در حالت زنده دارای لایه رویی در رنج بنفش-قهوه‌ای و قرمز-قهوه‌ای و یا کاملاً مشکی و حاشیه سفید و بخش تحتانی سفید رنگ بودند. سطح نمونه‌ها صاف (در یک نمونه برجستگی‌های ریزی مشاهده شد) و دارای اشکال نامنظم و حفرات اسکولوم نامشخص بودند. جنس بافت نمونه‌ها نرم و قابل انعطاف بود و در عمق ۸ متری بر روی بستر صخره‌ای زیست می‌کردند و به سختی از بستر کنده شدند. از نظر نوع اسپیکول نمونه‌ها دارای هر دو نوع میکرواسپیکول از نوع *Oxyasters* و *Oxysphaerasters* بودند. سائز اسپیکول‌های نمونه‌های مورد مطالعه در جدول ۲ آورده شده است.

## ترسیم درخت‌های فیلوژنی و آنالیز داده‌های توالی‌یابی:

جهت انجام آنالیزها ابتدا توالی‌های به دست آمده توسط نرم‌افزار ChromasPro. V۱.۵ (Technelysium Pty.Ltd., Australia) ویرایش شدند. به این ترتیب که الکتروفروگرام‌های هر توالی بررسی شد و نقاط خطا، اصلاح و یا حذف گردید. سپس به‌منظور مقایسه توالی‌های این مطالعه با توالی‌های سایر نقاط جهان و هم‌چنین تعیین دقیق محل قرارگیری آن‌ها در میان دیگر تاکسون‌ها و تفسیر بهتر روابط موجود بین آن‌ها و در عین حال شناسایی دقیق‌تر توالی‌های این مطالعه، توالی‌هایی از پایگاه داده‌های NCBI استخراج شد.

از سوی دیگر برای رسم درخت‌های ریشه‌دار و ایجاد توپولوژی صحیح درخت‌های فیلوژنی، برای قطعه ژنی COI، گونه اسفنج *Haliclona toxius* متعلق به جنس دیگری از شاخه اسفنج‌ها، به عنوان برون گروه انتخاب شد.

کلیه توالی‌ها در فرمت FASTA، جهت استفاده در نرم‌افزار MEGA۶ (Tamura و همکاران، ۲۰۱۱) و در فرمت Nexus، جهت استفاده در نرم‌افزار PAUP (Sowfford, ۲۰۰۳) مرتب شدند. جهت هم‌ردیف کردن توالی‌ها از نرم‌افزارهای (Thompson) Clustal W و همکاران، (۱۹۹۴) و (Larsson, ۲۰۱۴) AliView استفاده شد. پس از هم‌ردیفی توسط نرم‌افزار توالی‌ها به‌صورت چشمی مجدداً هم‌ردیف شدند. به‌علت کم بودن تعداد indelها در قطعه ژنی COI ردیف کردن می‌تواند توسط چشم نیز انجام شود (Haase و Zielska, ۲۰۱۵).

آنالیز فیلوژنی با استفاده از روش‌های بیشینه صرفه‌جویی (Maximum Parsimony) و بیشینه احتمال (Maximum Likelihood) انجام شد. پیش از انجام آنالیزهای MP، ML، با استفاده از برنامه MrModeltest v۲.۳ (Nylander, ۲۰۰۴) و براساس معیار اطلاعاتی برای برای داده‌های مورد نظر، انتخاب شدند (Nylander, ۲۰۰۴). طبق این آزمون مدل TPM۳ uf برای داده‌های این پژوهش انتخاب

جدول ۱: رده‌بندی مورفولوژیک نمونه‌های شناسایی شده در این مطالعه

Kingdom	Phylum	Class	Subclass	Order	Family	Genus	Species
Animalia	Porifera	Demospongiae	Tetractinomorpha	Hadromerida	Chondrillidae	Chondrillida	<i>Chondrilla australiensis</i>

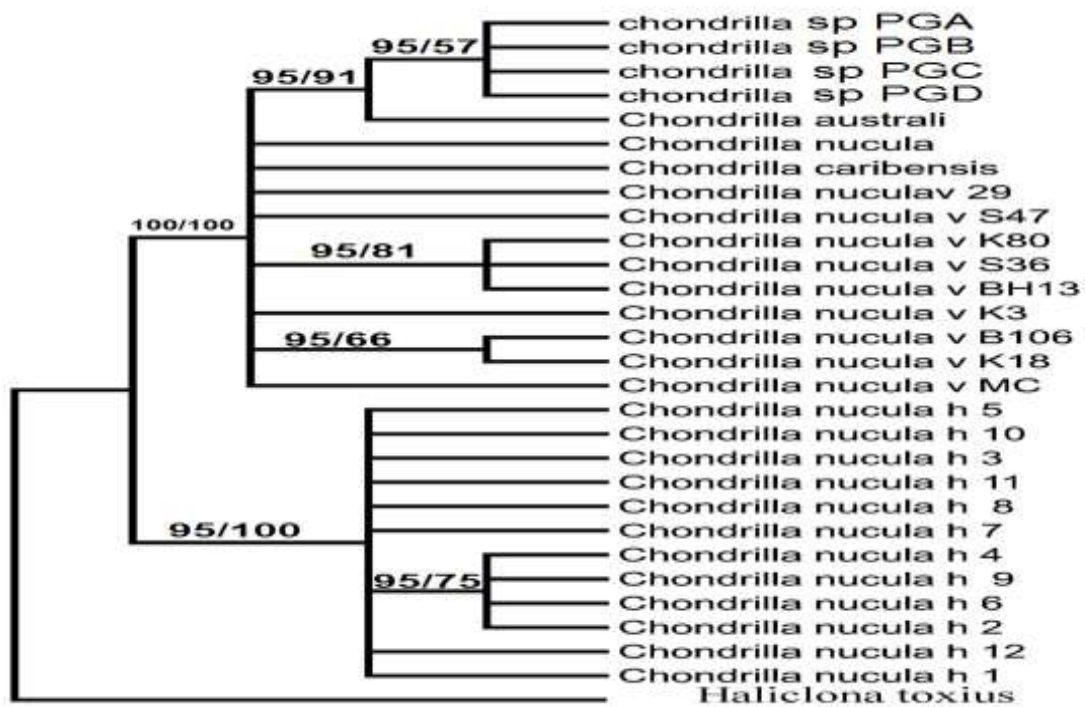
جدول ۲: سائز اسپیکول‌های نمونه‌های جنس *Chondrilla* شناسایی شده در این مطالعه

نوع اسپیکول (سائز بر حسب میکرومتر)							نمونه
Oxyasters			Oxysphaerasters				
Min	Mean	Max	Min	Mean	Max		
۷۰/۱۶۸۵	۱۰۰/۴۴۵۷	۱۱۸/۸۰۸	۶۸/۲۰۷	۱۰۲/۸۲۷۱	۱۱۸/۹۴۶	<i>Chondrilla</i> sp PG A ۲۰۱۵	
*	*	*	۶۳/۴۸۶	۱۰۳/۱۸۳۸	۱۲۷/۴۲۰	<i>Chondrilla</i> sp PG B ۲۰۱۵	
*	*	*	۶۲/۶۴۳	۱۰۴/۵۲۰۳	۱۳۴/۶۵۹	<i>Chondrilla</i> sp PG C ۲۰۱۵	
۸۰/۳۳۵	۹۷/۰۱۲۱	۱۲۱/۵۸۶	۸۴/۳۸۴	۱۱۳/۳۰۰۳	۱۳۳/۰۲۷	<i>Chondrilla</i> sp PG G ۲۰۱۵	

\*تعداد اسپیکول‌ها بسیار بسیار کم می‌باشد به طوری که اندازه‌گیری میانگین قطر آن‌ها مقدور نبود.

از توالی‌های گزارش شده از این جنس تطابق کامل نداشت. از لحاظ مورفولوژی این گونه بیش‌ترین شباهت را با گونه *Chondrilla australiensis* از استرالیا داشت اما اختلاف زیادی بین آن‌ها مشاهده شد. توپولوژی درختان تکاملی نشان داد کلاذ مربوط به نمونه‌های مطالعه حاضر با گونه *Chondrilla australiensis* رابطه خوهری دارد و این روابط مونوفیلیک با ارزش بوت استرپ بالا (MP=۹۱, ML=۹۵) حمایت شدند. هم‌چنین توپولوژی درختان تکاملی نشان داد گونه‌های مختلف *Chondrilla* منشا مونوفیلیک داشتند و با ارزش بوت استرپ بالا (MP=۱۰۰, ML=۱۰۰) حمایت شدند.

نتیجه محاسبات فیلوژنی و روابط تکاملی (MP, ML) الگوی توپولوژی یکسانی را برای هر دو درخت تکاملی نشان دادند. درخت فیلوژنی رسم شده از این توالی‌ها نشان داد که ۴ نمونه مطالعه شده با هم مطابق بودند و با هم تشکیل یک گروه مونوفیلیک (کلاذ مشترک) را دادند (ارزش بوت استرپ ۹۵=ML, ۵۷=MP). درحالی‌که در مطالعات مورفولوژی هر ۴ نمونه به‌عنوان گونه *Chondrilla australiensis* شناسایی شده بود، اما این نتیجه مطابق با شناسایی مورفولوژیک نبود و هر چهار نمونه از منطقه اولی به‌عنوان یک گونه می‌باشد، با این حال هیچ توالی از این گونه در بانک ژن وجود نداشت و طبیعتاً با هیچ‌یک



شکل ۴: درخت Maximum parsimony و Maximum likelihood جنس *Chondrilla*. درصد‌های بوت استرپ از ۱۰۰۰ درخت روی گره‌ها نشان داده شده است (ML/MP)

در این مطالعه برای نخستین بار سیستماتیک مولکولی جنس *Chondrilla* منطقه زیر جزر و مدی این بخش از خلیج فارس بررسی شد. تمامی مطالعات گذشته برای رده‌بندی و شناسایی آن‌ها، تنها با توجه به ویژگی‌های ریختی این موجودات صورت گرفته بود. از این‌رو هیچ توالی گزارش شده‌ای از آب‌های ایران برای مقایسه و مطالعه بیش‌تر در دسترس نبود. هم‌چنین به‌دلیل مطالعات مولکولی بسیار کمی که تاکنون بر روی شاخه اسفنج‌ها انجام گرفته است توالی‌های استفاده شده در درخت فیلوژنی، دارای تنوع گونه‌ای پایین می‌باشد.

## بحث

سیستماتیک مولکولی (بارکدینگ DNA) براساس توالی قطعه‌ای در ناحیه ۵' زیر واحد ژن سیتوکروم اکسیداز ۱ میتوکندری است. برای شناسایی، تاکنون تنها سیتوکروم اکسیداز I و II مورد بررسی قرار گرفته است و این احتمال وجود دارد که خیلی زود از DNA میتوکندری به‌عنوان مولکول حاوی اطلاعات مفید برای آنالیزهای فیلوژنوفرافی در اسفنج‌ها استفاده شود.



طبقه‌بندی اسفنج‌ها یک بحث چالش برانگیز است، زیرا که اسفنج‌ها مورفولوژی ساده و تغییرپذیر دارند، و حتی طبقه‌بندی آن‌ها در سطح گونه، نیز واضح و روشن نبوده است. طبقه‌بندی کلاسیک به‌طور سنتی براساس ساختار اسکلت و نوع و ابعاد اسپیکول می‌باشد، اما فواید آنالیز مورفومتری اسپیکولی مورد تردید می‌باشد، زیرا که سایز اسپیکول می‌تواند درون گونه‌ها متغیر باشد و توسط فاکتورهای محیطی از جمله نور و عمق، تحت تاثیر قرار گیرد. میانگین سایز اسپیکول‌های ۴ نمونه مورد بررسی در این مطالعه نشان داد که هر ۴ گونه *C. australiensis* و *C. nucula* از استرالیا و اقیانوس اطلس تفاوت زیادی دارند.

اگرچه اسفنج‌های جنس کندریلا ترکیبات مهم و فراوان صخره‌ها در هر دو اقیانوس‌های گرمسیری و معتدله در جهان هستند، اما تعداد واقعی گونه‌های کندریلا هنوز نامشخص باقی‌مانده است. طبقه‌بندی این جنس با توجه به اسکلت نسبتاً ساده و حضور انواع خیلی کم اسپیکول، مشکل است، به‌طوری‌که تنها دو نوع اسپیکول و برخی گونه‌ها یک نوع اسپیکول از نوع ستاره‌ای دارند. این جنس فاقد ویژگی‌های مورفولوژیک قابل تعریف می‌باشد به‌همین دلیل باعث ابهام و سردرگمی در طبقه‌بندی آن می‌شود. در حال حاضر از جنس کندریلا براساس روش‌های طبقه‌بندی سنتی و مولکولی، از آب‌های استرالیا ۴ گونه *C. nucula*، *C. australiensis*، *C. secunda* و *C. mixta* (Fromont و همکاران، ۲۰۰۸) و از اقیانوس‌های هند و آرام دو گونه *C. australiensis*، *C. nucula* و هم‌چنین از دریای سرخ و دریای مدیترانه گزارش شده‌اند. به‌رحال، با وجود توانایی پایین پراکنش گامت‌ها و لاروهای اسفنج‌ها بعید به‌نظر می‌رسد که این گونه‌ها در سراسر جهان توزیع داشته باشد. پرسش‌هایی درباره ماهیت پراکنش جهانی گونه‌های کندریلا تنها با استفاده از مطالعه داده‌هایی که از طریق تکنیک‌های مولکولی برای بررسی توزیع و پراکنش آن‌ها، انجام شده است.

به‌طور کلی می‌توان به این نتیجه رسید که بررسی‌های به‌عمل آمده در این مطالعه نشان داد که قطعه ژنی COI نشانگری کارآمد برای شناسایی نمونه‌ها در حد گونه می‌باشد. از سوی دیگر الگوهای مختلفی که در رسم درخت‌های فیلوژنی استفاده شد نشان داد که الگوی Maximum Likelihood و Maximum parsimony الگوهای کاربردی در رسم درخت بوده و نتایج واضح‌تر و صحیح‌تری از آن‌ها حاصل می‌شود. هم‌چنین می‌توان به این نتیجه رسید که شناسایی اسفنج‌ها که به‌طور سنتی براساس ویژگی‌های ساختاری (اسپیکول) با وجود سطوح بالای هم‌پلاسی میان اسپیکول‌های اسفنج‌ها انجام

در مطالعات مورفولوژی علت متفاوت بودن رنگ نمونه‌ها، میزان نور محیط‌زیست آن‌ها می‌باشد (Usher و همکاران، ۲۰۰۴).

بررسی‌های مولکولی در مورد نمونه‌های مطالعه حاضر، که مطالعات مورفولوژیک بیان می‌کرد که هر ۴ نمونه متعلق به گونه *Chondrilla australiensis* می‌باشند، در درخت‌های فیلوژنی رسم شده، این نمونه‌ها در کلادی مجزا از توالی این گونه قرار گرفتند و هر ۴ نمونه با وجود اختلاف مورفولوژیک با یکدیگر شباهت بسیاری با گونه *Chondrilla australiensis* از استرالیا نشان دادند که با ارزش بوت استرپ بالا حمایت می‌شود. به‌علت عدم وجود توالی این گونه در بانک ژن، گونه‌های دیگر از این جنس جهت مقایسه در درخت فیلوژنی استفاده شدند. با این حال، تمامی توالی‌های موجود در بانک ژن برای این گونه‌ها متعلق به کشور استرالیا بوده و امکان مقایسه این گونه با توالی‌های سایر نقاط جهان فراهم نشد. هم‌چنین به‌علت عدم ثبت توالی سایر گونه‌های این جنس از آب‌های اطراف خلیج فارس، امکان بررسی شباهت این گونه با آب‌های اطراف فراهم نبود. این در حالی است که این گونه تاکنون از ایران گزارش نشده است. در این مورد به علت وجود توالی‌های *C. australiensis*، *C. nucula* در بانک ژن و عدم تطابق این نمونه‌ها با هیچ‌یک از توالی‌های این گونه، می‌توان احتمال حضور گونه‌ای جدید را در نظر گرفت که مسلماً قطعیت بیش‌تر در این مورد نیازمند بررسی‌های دقیق‌تر مورفولوژیک و استفاده از نشانگرهای مولکولی دیگر می‌باشد.

مطالعات مورفولوژیک بیان می‌کند که گونه *Chondrilla nucula* به‌میزان فراوان در اقیانوس اطلس جنوب‌غربی، دریای Caribbean، دریای مدیترانه، فرانسه، دریای آدریاتیک، دریای Ligarian و تمامی آب‌های استرالیا توزیع شده است (Klatau و همکاران، ۱۹۹۹)، و آن‌ها بر روی صخره‌ها و پایه علف‌های دریایی در اعماق کم‌تر از ۱ متر یا بیش‌تر رشد می‌کنند، رنگ قهوه‌ای تیره و ضخامت تقریباً ۵ میلی‌متر دارند. افراد معمولاً خیلی کوچک که دارای طول ۱ تا ۳ سانتی‌متر و عرض ۰/۵ تا ۱ سانتی‌متر بودند. اسپیکول‌های آن‌ها از نوع Oxysphaerasters که ۲۵ تا ۳۰ میکرومتر قطر دارند که با طول اسپیکول‌های نمونه‌های مطالعه شده بسیار متفاوت است و کوچک‌تر از آن‌ها می‌باشد. هم‌چنین گونه *Chondrilla australiensis* نیز در گسترده‌ای از مناطق گرمسیری تا معتدله که شامل تمام آب‌های کشور استرالیا به‌جز مناطق سرد جنوبی استرالیا، اقیانوس‌های هند، آرام و هم‌چنین دریای سرخ و مدیترانه، و آلز جنوبی می‌باشند، توزیع شده‌اند. آن‌ها در سطوح افقی و عمودی صخره‌ها و در اعماق ۱ تا ۲۵ متر زیست می‌کنند. رنگ افراد آن، متغیر و رنجی از قرمز قهوه‌ای تا زرد/قهوه‌ای دارند و دارای هر دو نوع اسپیکول Oxysphaerasters و Oxyasters می‌باشد.



۱۰. **Khoshkhou, Z.; Nazemi, M.; Motalebi, A.; Mahdabi, M.; Ardalan, A.A. and Matin, R.H., ۲۰۱۲.** First Record of Siliceous and Calcareous Sponges from Larak Island, Persian Gulf-Iran. Middle-East Journal of Scientific Research. Vol. ۱۱, No. ۷, pp: ۸۸۷-۸۹۳.
۱۱. **Klautau, M.; Russo, C.A.; Lazoski, C.; Boury Esnault N. and Thorpe, J.P., ۱۹۹۹.** Does cosmopolitanism results from overconservative systematics? A case study using the marine sponge *Chondrilla nucula*. Evolution. Vol. ۵۳, pp: ۱۴۱۴-۱۴۲۲. doi: ۱۰.۲۳۰۷/۲۶۴۰۸۸۸.
۱۲. **Larsson, A., ۲۰۱۴.** AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets, bioinformatics. Vol. ۳۰, No. ۲۲, pp: ۲۲۷۶-۲۲۷۸. doi: ۱۰.۱۰۹۳/bioinformatics/btu۵۳۱.
۱۳. **Meixner, W. and Hess, R., ۲۰۰۷.** Phylogenetic analysis of freshwater sponges provide evidence for endemism and radiation in ancient lakes. Molecular Phylogenetics and Evolution. Vol. ۴۵, pp: ۸۷۵-۸۸۶.
۱۴. **Nylander, J.A.A., ۲۰۰۴.** MrModeltest v۲. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre. Uppsala University, Sweden.
۱۵. **Pick, K.S.; Philippe, H.; Schreiber, F.; Erpenbeck, D.; Jackson, D.J.; Wrede, P.; Wiens, M.; Alie, A.; Morgenstern, B.; Manuel, M. and Wo'rheide, G., ۲۰۱۰.** Improved phylogenomic taxon sampling noticeably affects non-bilaterian relationships. Molecular Biology and Evolution. Vol. ۲۷, pp: ۱۹۸۳-۱۹۸۷.
۱۶. **Sadeghi, P.; Savari, A.; Yavari, V. and Devin, M.L., ۲۰۰۸.** First record of sponge distribution in the Persian Gulf (Hengam Island, Iran). Pakistanish Journal of Biological Science. Vol. ۱۱, No. ۲۱, pp: ۲۵۲۱-۲۵۲۴.
۱۷. **Safaeian, S.; Hosseini, H.; Farmohamadi, S.; Mohtarami, P.; Abaspour asadolah, A. and Nejatkhah, A., ۲۰۰۹.** First study of marine sponge species of nay Band Bay & Bustaneh, Persian Gulf, Iran. Iran Journal of marine Sciences and technology research. pp: ۷۵-۹۰.
۱۸. **Taylor, M.W.; Thacker, R.W. and Hentschel, U., ۲۰۰۷.** Genetics. Evolutionary insights from sponges. Science. Vol. ۳۱۶, pp: ۱۸۵۴-۱۸۵۵.
۱۹. **Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M. and Kumar, S., ۲۰۱۱.** MEGA۵: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biolody and Evolution. Vol. ۲۸, pp: ۲۷۳۱-۲۷۳۹.
۲۰. **Thompson, G.D.; Higgins, D.G. and Gibson, T.j., ۱۹۹۴.** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and

می‌گرفت، شناسایی خوب و دقیقی برای این شاخه نمی‌باشد. به طوری که در این مورد شناسایی مورفولوژیک انجام شده با نتایج مولکولی دارای اختلاف است و بدین ترتیب رده‌بندی‌های گذشته با پیشرفت روش‌های مولکولی تا حدی دچار تغییر می‌شوند.

## منابع

۱. درخشش، ن.؛ سواری، ا.؛ دوست‌شناس، ب.؛ دهقان‌مدیسه، س. و دورقی، ع.، ۱۳۹۲. بررسی میزان توده زنده و تولید در اسفنج‌های دریایی خانواده Halicionidae در مناطق احداث سازه‌های مصنوعی واقع در شمال غربی خلیج فارس. نشریه اقیانوس‌شناسی. سال ۴، شماره ۱۴، صفحات ۷۷ تا ۸۴.
۲. **Duran, S.; Pascual, M. and Turon, X., ۲۰۰۳.** Low levels of genetic variation in mtDNA sequences over the western Mediterranean and Atlantic range of the sponge *Crambe crambe* (Poecilosclerida). Mar. Biol. Vol. ۱۴۴, pp: ۳۱-۳۵.
۳. **Eisapor, S. and Safaeian, S.H., ۲۰۱۳.** Identification of sponges of inter tidal zone in North of Hengam Island, Persian Gulf. Int. J. Mar. Sci. Eng. Vol. ۳, No. ۳, pp: ۱۴۵-۱۴۸.
۴. **Folmer, O.; Black, M.; Hoeh, W.; Lutz, R. and Vrijenhoek, R., ۱۹۹۴.** DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Molecular Marine Biology and Biotechnology. Vol. ۳, No. ۵, pp: ۲۹۴-۲۹۹.
۵. **Fromont, J.; Usher, K.L.; Sutton, D.C.; Toze, S. and Kuo, J., ۲۰۰۸.** Species of the sponge genus *Chondrilla* (Demospongiae: Chondrosida: Chondrillidae) in Australia. Records of the Western Australian Museum. Vol. ۲۴, pp: ۴۶۹-۴۸۶.
۶. **Haase, M. and Zietske S., ۲۰۱۵.** Molecular phylogeny and a modified approach of character-based barcoding refining the taxonomy of New Caledonian freshwater gastropods (Caenogastropoda, Truncatelloidea, Tateidae). Molecular Phylogenetics and Evolution. Vol. ۸۹, pp: ۱۷۱-۸۱.
۷. **Hooper, J.N.A., ۲۰۰۰.** Sponguide: Guide to Sponge Collection and Identification. Queensland Museum. ۲۸۵ p.
۸. **Hooper, J.N.A. and van Soest, R.W.M., ۲۰۰۲a.** Systema porifera, a guide to the classification of sponges. Kluwer Academic/ Plenum Publishers, New York.
۹. **Hooper, J.N.A.; Kennedy, J.A. and Quinn, R.J., ۲۰۰۲.** Biodiversity 'hotspots,' patterns of richness and endemism, and taxonomic affinities of tropical Australian Sponges (Porifera). Biodiv. Cons. Vol. ۱۱, pp: ۸۵۱-۸۸۵.



- weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. Vol. ۲۲, No. ۲۲, pp: ۴۶۷۳-۴۶۸۰.
۲۱. **Swofford, D.L.**, ۲۰۰۲. PAUP. Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods). Version ۴. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
۲۲. **Usher Kayley, M.; David, C.; Toze, S.; Kuo, J. and Fromont, J.**, ۲۰۰۴. Biogeography and phylogeny of *Chondrilla* species (Demospongiae) in Australia. *Marine ecology progress series Mar Ecol Prog Ser*. Vol. ۲۷۰, pp: ۱۱۷-۱۲۷.
۲۳. **Van Soest, R.W.M.; Boury-Esnault, N.; Vacelet, J.; Dohrmann, M.; Erpenbeck, D.; de Voogd, N.J.; Santodomingo, N.; Vanhoorne, B.; Kelly, M. and Hooper, J.N.A.**, ۲۰۱۲. Global diversity of sponges (Porifera). *PLoS One*. Vol. ۷, No. ۴, e۳۵۱۰۵ p.

