معرفی گونه *Chondrilla* sp PG A 2015 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 وفنون دریایی خرمشهر
- **سیدمحمدباقر نبوی*:** گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم وفنون دریایی خرمشهر
- **محمدعلی سالاری‌علی‌آبادی:** گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم وفنون دریایی خرمشهر
- **احمد سواری:** گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم وفنون دریایی خرمشهر
- **حسین ذوالقرنین:** گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم وفنون دریایی خرمشهر

تاریخ دریافت: اسفند 1394 تاریخ پذیرش: خرداد 1395

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 8 متری، در آبان ماه 1393 جمع آوری گردیدند. موقعیت جغرافیایی منطقه °51 '54 ''135 E، '49 °27 ''923 N می‌باشد. برای شناسایی مورفولوژیک نمونه‌های اسفنج، از روش هضم اسیدی استفاده گردید. نمونه‌ها فاقد ماکرواسپیکول بوده و فقط دارای دو نوع میکرواسپیکول Oxysphaerasters و Oxyasters می‌باشد 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 4 نمونه از این جنس مورد شناسایی مورفولوژیک و مولکولی قرار گرفتند و یک گونه جدید به نام *Chondrilla sp* PGA 2015 شناسایی شد.

کلمات کلیدی: کندریلا، پوریفرا، CO_1، آنالیز مولکولی، طبقه‌بندی سنتی

مقدمه

اسفنج‌ها شاخه متنوعی از جانوران بنتیک آبزی هستند که اهمیت اکولوژیکی، تجاری و دارویی زیادی دارند و به عنوان 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 باقی مانده 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 بدست آمده است. با توجه به جایگاه اسفنج‌ها در پایه درخت زندگی جانوران(Pick و همکاران، 2010)، از آن‌ها برای درک بهتر مدار اصلی تکامل جانوران اولیه و کشف Paleogenomics از آخرین جد مشترک، استفاده می‌گردد(Taylor و همکاران، 2007).

اسفنج‌ها میان 28 شاخه بی‌مهره آبزی، متنوع‌ترین و موفق‌ترین گروه هم در تعداد گونه‌ها و هم در رنج خصوصیات مورفولوژیکیشان هستند. و همچنین سازگاری بالایی در تغییرات موقتی فاکتورهای محیطی دارند. تعداد گونه‌های شناسایی شده اسفنج در مقالات مختلف، متفاوت است، اما به نظر می‌رسد تا کنون 11000 گونه به ثبت رسیده باشد که تقریبا 8500 گونه آن‌ها معتبر است (Soest و همکاران، 2012) اما تخمین زده می‌شود دست کم، 15000 گونه زنده در همه دریاها و دریاچه‌های جهان، وجود دارد. اگر چه 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

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: nabavishiba@yahoo.com

بسیاری از گونه‌های آن‌ها می‌توانند این نوع آلاینده‌ها را در خود جمع کنند، بدون اینکه صدمه آشکاری ببینند. اسفنج‌ها متحرک نیستند بنابراین نمی‌توانند از شکارچیانی نظیر ماهی‌ها، لاک‌پشت‌ها، شکم‌پایان، خارپوستان، کرم‌های پهن و غیره فرار کنند (Hooper, 2000). 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 بوسیله بیولوژیست‌ها، بیوشیمیست‌ها و بیوتکنولوژیست‌ها به دقت 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.

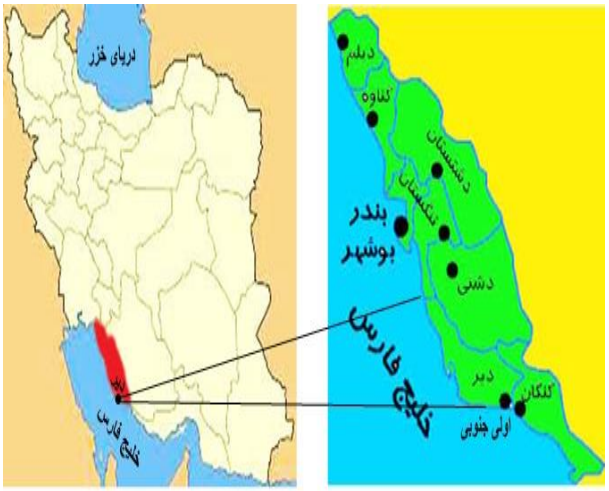
اسفنج‌ها نقش مهمی در تشخیص ارتباط تکاملی موجودات چند سلولی را بر عهده دارند، اما بسیاری از جنبه‌های اساسی زیست‌شناسی و به خصوص روابط مربوط به جغرافیایی زیستی آن‌ها هنوز مبهم و ناشناخته باقی مانده است و برخی از تغییرات عمده اخیر، بررسی سیستماتیکی در سطح گونه را پیشنهاد می‌دهد و داده‌های مولکولی به طور قابل توجهی به درک و فهم ما از سیستماتیک اسفنج کمک می‌کند (Van Soest و Hooper, 2002) و داده‌های مولکولی به طور قابل توجهی به درک و فهم ما از سیستماتیک اسفنج کمک می‌کند. علی‌رغم پیشرفت قابل توجه توسط داده‌های مولکولی، در ارتباط با تقسیم‌بندی فیلوژنیک از تمامی رده‌های اسفنج‌ها، چهارچوب طبقه‌بندی آن‌ها هنوز ناشناخته باقی مانده است. همچنین آگاهی از تنوع‌زیستی (غنای گونه‌ای، بومی، پراکنش منطقه‌ای)، قرابت‌های تاریخی مربوط به جغرافیایی زیستی (Hooper و همکاران، 2002) ابتدایی باقی مانده است و داده‌های کمی درباره تنوع ژنتیکی میان جمعیت‌های اسفنج وجود دارد. نسبت به دیگر گونه‌های بی‌مهرگان دریایی، گونه‌های اسفنج اغلب رنج توزیع و پراکنش وسیع‌تری دارند. تنها فون اسفنج‌های چندین منطقه از جمله دریای کارائیب و استرالیا به خوبی شناخته شده‌اند، اما بیشترین فون اسفنج‌های جهان هنوز ناشناخته باقی مانده‌اند. امروزه استفاده از مارکرهای مولکولی برای بررسی رابطه فیلوژنیک بین گونه‌ها کاربرد بسیاری پیدا کرده است. با این حال، تا به امروز، تنها چند نشانگر توالی DNA برای مطالعه جمعیت‌های اسفنج استفاده شده است. DNA میتوکندری (mtDNA) فراوان‌ترین مارکر توالی DNA است که برای فیلوژئوگرافی بسیاری از گونه‌های حیوانات مورد استفاده قرار گرفته است، خصوصا سیتوکروم اکسیداز(COII و COI)، زیرا به نظر 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، 2003).

سوابق و پیشینه تحقیق بیانگر این موضوع است که با وجود تنوع زیاد اسفنج‌ها در خلیج‌فارس، به دلیل شرایط خاص منطقه‌اي، تاکنون هیچ مطالعه‌اي در خصوص مباحث مورفولوژیکی و سیتماتیك مولکولي و بارکدینگ بر روي اسفنج‌های بسترهاي صخره‌اي سواحل شمالي خلیج‌فارس انجام نشده است و این مطالعه مي‌تواند باعث روشن‌کردن روابط فیلوژني موجود بین گونه‌هاي جنس کندریلا این مناطق و دیگران مناطق جهان شود. ضمن این که احتمال معرفي گونه جدید نیز با این روش وجود دارد.

در سال‌های اخیر مطالعاتی بر روی اسفنج‌های خلیج‌فارس، به ویژه در منطقه جزر و مدی صورت گرفته است: sadeghi و همکاران (2008) هفت گونه *Callyspongia clavata, C. vasselli, Hyrtios erectus, Haliclona* sp., *Leucetta* sp., *Ircinia echinata, Dysidea cinerea* را در جزیره هنگام گزارش نمودند. خوشخو و همکاران (2012) نیز چهار گونه *Haliclona* sp., *Agelas* sp., *Ircinia* sp., *Niphates* sp. را در جزیره لارك گزارش نمودند. همچنین درخشش و همکاران (1392) میزان توده زنده و تولید را در اسفنج‌هاي خانواده Haliclonidae در شمال‌غرب خلیج‌فارس بررسي نموده‌اند. مقصودلو و همکاران (1392) یازده گونه *Haliclona Ircinia echinata*; *Hyrtios erectus*; *Spongia arabica*; *Callyspongia clavata*; *C. vasselli*; *Callyspongia* sp.; *tuberosa*; *Gelliodes Leucetta* sp. *Terpios viridis*; *Dysidea cinerea*; *carnosa*; را در منطقه زیر جزر و مدی جزایر کیش، لارک و خلیج نایبند گزارش نمودند. همچنین، عیسی‌پور و همکاران(2013) هفت گونه *Haliclona*، *Amphimedon viridis fallax, Haliclona cinerea,* ،*rosea,* Cliona *dioryssa Siphonochalina* sp., *Callyspongia* sp., *Callyspongia* را در منطقه اینتر تایدال در شمال جزیره هنگام مورد بررسی قرار دادند. در مطالعه حاضر، جنس *Chondrilla* از منطقه زیر جزر و مدی سواحل صخره‌ای خلیج‌فارس در منطقه اولی جنوبی استان بوشهر برای اولین بار شناسایی و معرفی گردید که از این جنس 1 گونه جدید شناسایی و ثبت گردید.

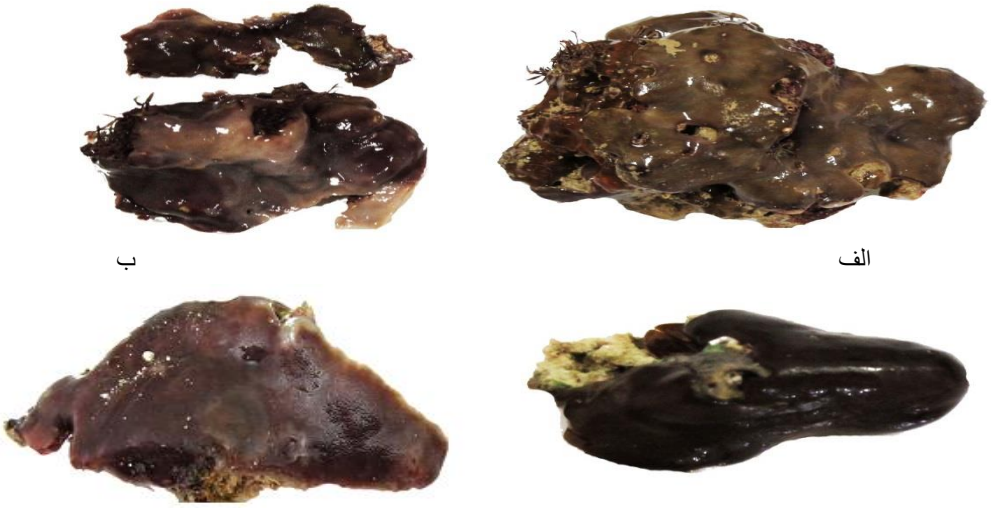
مواد و روش‌ها

در این مطالعه اسفنج های دریایی جنس کندریلا از منطقه زیر جزر و مدی ساحل اولی جنوبی جمع‌آوری شد. روستای اولی از توابع 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 135" E 54' 51° ، 49' 27° 923" N در عمق 8 متری در آبان ماه 1393 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 مریستمیک، بخشی از هر نمونه به اتانول 96% درصد جهت انجام آنالیزهای مولکولی و بخشی دیگر از نمونه جهت انجام آنالیزهای موروفولوژیک به اتانول 70% منتقل گردید.



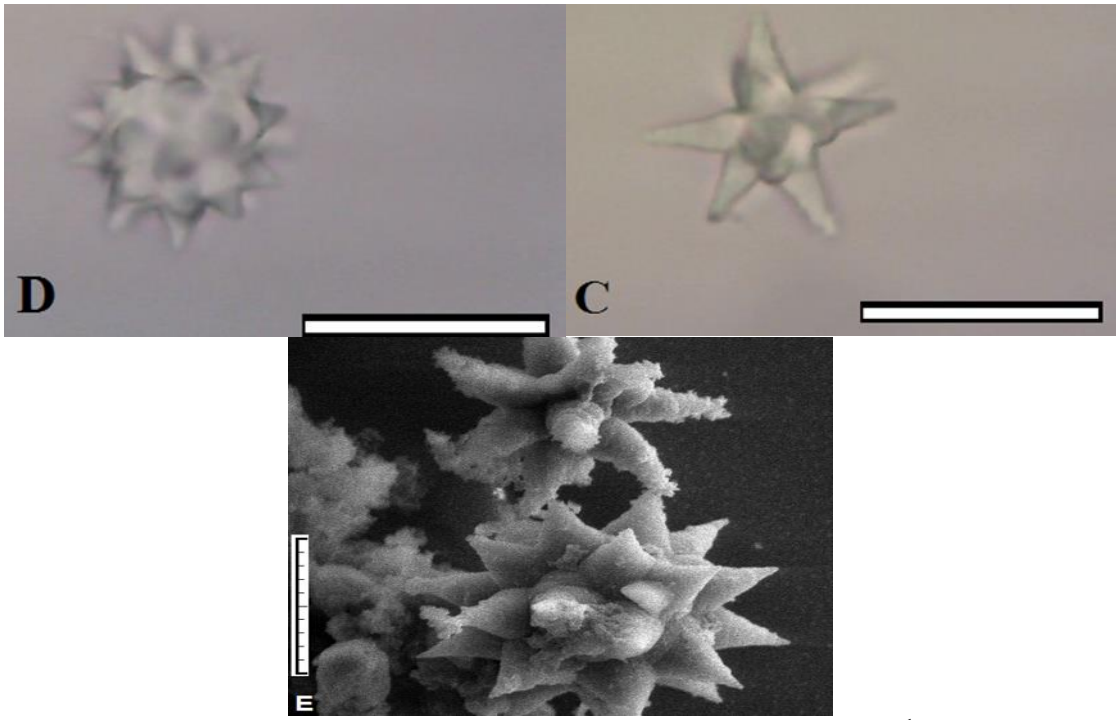
شکل 1: موقعیت جغرافیایی روستای اولی

آماده‌سازی اسپیکول: تهیه اسپیکول بر اساس روش Hooper (2000) 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 به‌طوری‌که در برخی از نمونه‌ها هضم مواد آلی چندین ساعت به طول انجامید. بعد از گذشت مدت زمانی کوتاه ترکیبات آلی حل شده و فقط اسکلت معدنی باقی می‌ماند. لوله‌ها در سانتریفیوژ با دور 3000 rmp به مدت 5-3 دقیقه قرار داده شدند. بعد از گذشت 5 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 96% جایگزین شد. در پایان، از سوسپانسیون اسپیکول 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 این‌کار از نرم‌افزار Digimizer قطر 25 عدد از اسپیکول‌های نوع Oxysphaerasters و 25 عدد از نوع Oxyasters اندازه‌گیری و میانگین آن‌ها محاسبه گردید. عکس‌برداری از نمونه‌ها با استفاده از دوربین Dino-Eye مدل AM4023 X قابل اتصال به کامپیوتر انجام گردید. آماده-سازی اسپیکول جهت تهیه تصاویر الکترونی SEM به روش ذکر شده انجام شد.



الف ب

ج د

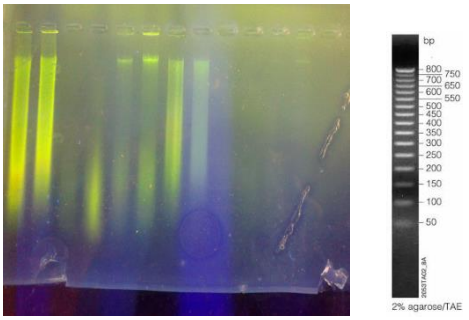


شکل2:الف، ب، ج و د. نمونه های گونه*Chondrilla sp* PGA 2015. C. میکرواسپیکول نوع Oxysphaerasters. D. میکرواسپیکول نوع Oxyasters (H&E×40) (اسکیل بار D،C 20میکرومتر).E. تصویر Scanning electron microscope (SEM) (اسکیل بار10میکرومتر)

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 آبگیری کامل، نمونه‌ها به مدت 4 تا 6 ساعت در دستگاه فریزدرایر قرار گرفتند. حدود70-50 میلی‌گرم از هر نمونه را درون میکروتیوپ 2 میلی‌لیتری ریخته و با قیچی هموژن تا به حالت پودری شکل تبدیل شد. سپس میزان 1 میلی-لیتر از بافر 2% CTAB, 100 mM Tris–HCl pH 8.0, 2% CTAB 20 mM EDTA, 1.4) (M NaCl را به آن افزوده و به مدت 10 ثانیه با دور کم ورتکس شد. سپس به مدت 1 ساعت در دمای 65 درجه سانتی‌گراد در حمام آب گرم نگهداری شده و بعد از آن 1 میلی‌لیتر از مخلوط کلروفرم/ایزوآمیل الکل(1:24) را به آن افزودیم و به مدت30 ثانیه ورتکس گردیده و جهت فاز جداسازی، نمونه‌ها در دستگاه سانتریفیوژ قرار داده شدند. دستگاه روی دور 12000rpm، به مدت 10 دقیقه و دمای 4 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، بافرCTAB 5% (5% CTAB, 0.35 M NaCl)، میکس کرده و در دمای 65 درجه سانتی گراد به مدت 40 دقیقه انکوباسیون شد. سپس 1 میلی‌لیتر از مخلوط کلروفرم/ایزوآمیل الکل به آن افزوده و به مدت 1 دقیقه ورتکس گردید. نمونه‌ها با شرایط قبل(دور 12000 rpm، 10 دقیقه، 4 درجه سانتی‌گراد) سانتریفیوژ گردیدند. نمونه‌ها از سانتریفیوژ خارج نموده، فاز رویی را جدا کرده و در میکروتیوپ‌های جدید ریخته شدند. به هر میکروتیوپ 1.5-1 میلی‌لیتر از بافر 1% CTAB, 1% CTAB 50 mM Tris–HCl pH) (8.0, 10 mM EDTA به میکروتیوپ اضافه گردید. برای ته‌نشینی به مدت 2 ساعت و نیم در دمای اتاق انکوباسیون شد. بعد از طی مدت زمان نمونه‌ها به مدت 20 دقیقه و با دور 12000rpm و در دمای 4 درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. سپس فاز رویی دور ریخته شده و جهت معلق-سازی پلیت DNA، 1 میلی‌لیتر از محلول1 M mM EDTA, 1 HS-TE (10 mM Tris–HCl pH 8.0, NaCl) اضافه کرده و به مدت 10 دقیقه در دمای 65 درجه سانتی‌گراد انکوباسیون می-گردد. سپس جهت ته‌نشینی DNA، 1میلی‌لیتر از محلول 96% ethanol/3 M NaOAc به نسبت 30:1 اضافه گردید. مجددا به مدت 10 دقیقه و با دور 12000rpm و در دمای 4 درجه سانتی-گراد سانتریفیوژ گردید. بعد از سانتریفیوژ، فاز رویی دور ریخته شده و به هر میکروتیوپ 500 میلی‌لیتر الکل 70% اضافه نموده و به مدت 10 دقیقه و با دور 12000rpm و با دمای 4 درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. بعد از سانتریفیوژ، الکل رویی به آرامی خارج گردید. نمونه‌ها را روی rach چیده و به مدت 30 دقیقه در گوشه آزمایشگاه قرار داده تا الکل اضافی خارج گردد. بعد از طی زمان، به هر نمونه 50 میکرولیتر آب استریل افزوده و به مدت 1 شبانه‌روز در دمای 4 درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید (Meixner و همکاران 2007).

تکثیر قطعه ژن هدف و انجام واکنش زنجیره‌اي پلیمراز (PCR): ژنوم COI با تقریبا 600 bp از توالی میتوکندری با استفاده از جفت پرایمر جهانی (LCOI490):5´-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3´ (LCO2198):5´-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3´ تکثیر شدند (Flormar و همکاران، 1994). واکنش PCR در حجم‌های واکنشی 25 میکرولیتر حاوی 2/5 میکرولیتر بافر PCR، یک

میکرولیتر $MgCl_2$، یک میکرولیتر از هر پرایمر، 0/5 میکرولیتر dNTP، 0/3 میکرولیتر آنزیم Taq polymerase، 17/7 میکرولیتر آب، یک میکرولیتر DNA الگو انجام گردید. برنامه انجام PCR برای ژن COI طبق دستوالعمل تغییر یافته Meixner و همکاران (2007) انجام گردید و جهت توالی یابی به شرکت bioneer کره فرستاده شد.



الف ب

شکل3: الف) نمونه DNA استخراجی ب) باند محصولات PCR

ترسیم درخت‌های فیلوژنی و آنالیز داده‌های توالی‌یابی: جهت انجام آنالیزها ابتدا توالی‌های به دست آمده توسط نرم-افزار ChromasPro. V1.5 (Technelysium Pty.Ltd., Australia) ویرایش شدند. به این ترتیب که الکتروفروگرام‌های هر توالی بررسی شد و نقاط خطا، اصلاح و یا حذف گردید. سپس به منظور 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 درخت های 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 نرم MEGA6 (Tamura و همکاران، 2011) و در فرمت Nexus، جهت استفاده در نرم‌افزار(Sowfford, 2003) PAUP مرتب شدند. جهت هم‌ردیف‌کردن توالی‌ها از نرم‌افزارهای Clustal W (Thompson و همکاران، 1994) و AliView (Larsson، 2014) استفاده شد. پس از هم‌ردیفی توسط نرم‌افزار توالی‌ها به صورت چشمی مجددا هم ردیف شدند. به علت کم بودن تعداد indelها در قطعه ژنی COI ردیف‌کردن می‌تواند توسط چشم نیز انجام شود (Zielska و Haase، 2015).

آنالیز فیلوژنی با استفاده از روش‌های بیشینه صرفه جویی (Maximum Parsimony) و بیشینه احتمال (Maximum Likelihood) انجام شد. پیش از انجام آنالیزهای ML، MP، با استفاده از برنامه MrModeltest v2.3 (Nylander، 2004) و بر اساس معیار اطلاعاتی (Akaike Information Criterrion) AIC و AICc مدل‌های مناسب برای برای داده‌های مورد نظر، انتخاب شدند (Nylander,2004). طبق این آزمون مدل TPM3 uf برای داده‌های این پژوهش انتخاب شد. آنالیز MP برای داده‌ها به همراه توالی‌های مرجع با استفاده از نرم‌افزار PAUP نسخه 4b10 (Sowfford، 2003) انجام گرفت. کلادهای MP با 1000 تکرار بوت استرپ بررسی شدند.

نتایج

در این مطالعه 4 نمونه *Chondrilla* sp PGA2015، *Chondrilla* sp PGB2015، *Chondrilla* sp PGC2015، *Chondrilla* sp PGD2015 در تحقیق حاضر مورد مطالعه مورفولوژیک و توالی‌یابی قرار گرفتند. طول توالی به دست آمده بخشی از ژن COI میتوکندری برای شناسایی این نمونه‌ها در حدود 600 جفت باز گزارش شد. تطبیق توالی‌های به دست آمده با توالی‌های موجود نمونه‌های مشابه که برای ژن COI در بانک جهانی NCBI ثبت شده بود؛ نشان داد، که هر 4 توالی کاملا 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 به عنوان گونه *Chondrilla* sp PGA 2015(Accession number LC101796) معرفی شد. در مطالعات مورفولوژیک 4 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 - قهوه ای و قرمز- قهوه‌ای و یا کاملا مشکی و حاشیه سفید و بخش تحتانی سفید رنگ بودند. سطح نمونه‌ها صاف (در یک نمونه برجستگی-های ریزی مشاهده شد) و دارای اشکال نامنظم و حفرات اسکولوم نامشخص بودند. جنس بافت نمونه‌ها نرم و قابل انعطاف بود و در عمق 8 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 Oxysphaerasters و Oxyasters بودند. سایز اسپیکول‌های نمونه‌های مورد مطالعه در جدول 2 آورده شده است.

جدول 1: رده‌بندی مورفولوژیک نمونه‌های شناسایی شده در این مطالعه

Kingdom	Phylum	Class	Subclass	Order	Family	Genus	Species

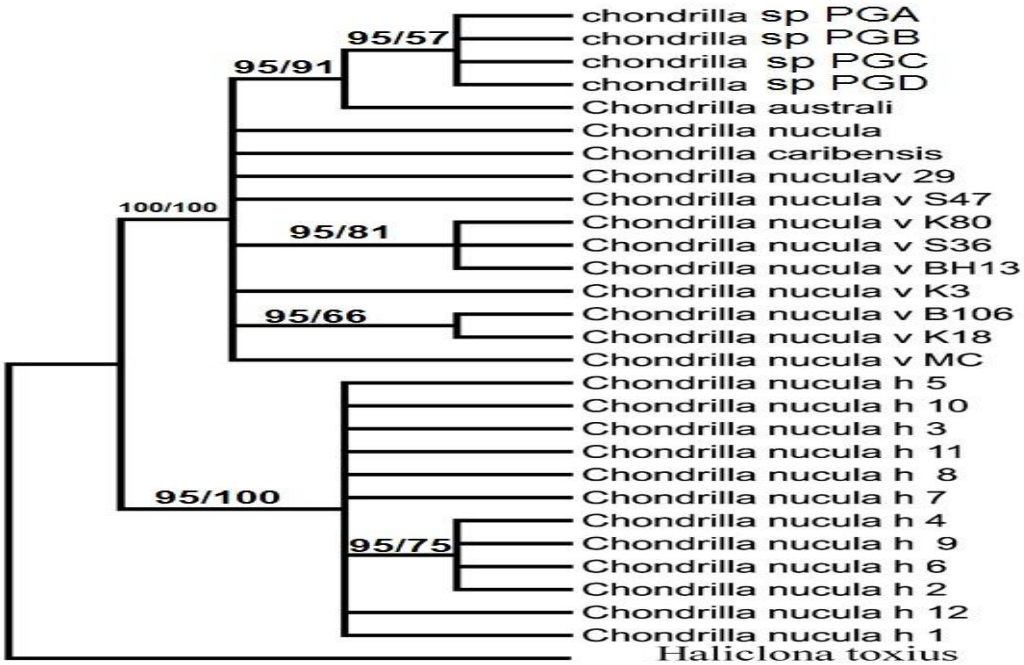
Animalia	Porifera	Demospongiae	Tetractinomorpha	Hadromerida	Chondrillidae	Chondrillida	*Chondrilla australiensis*

جدول2: سایز اسپیکول‌های نمونه‌های جنس Chondrilla شناسایی شده در این مطالعه

نمونه	نوع اسپیکول(سایز بر حسبμm)					
	Oxysphaerasters			Oxyasters		
	Max	Mean	Min	Max	Mean	Min
Chondrilla sp PGA2015	118/946	102/8271	68/207	118/808	100/4457	70/685
Chondrilla sp PGB2015	127/420	103/1838	63/486	*	*	*
Chondrilla sp PGC2015	134/659	104/5203	62/643	*	*	*
Chondrilla sp PGG2015	133/027	113/3003	84/384	121/586	97/0121	80/335

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

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 4 نمونه مطالعه شده با هم مطابق بودند و با هم تشکیل یک گروه مونوفیلیک (کلاد مشترک) را دادند (ارزش بوت استرپ95=ML، 57=MP). در حالی‌که در مطالعات مورفولوژی هر 4 نمونه به عنوان گونه *Chondrilla australiensis* شناسایی شده بود، اما این نتیجه مطابق با شناسایی مورفولوژیک نبود و هر چهار نمونه از منطقه اولی به عنوان یک گونه می‌باشد، با این حال هیچ توالی از این گونه در بانک ژن وجود نداشت و طبیعتا با هیچ یک 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 کلاد مربوط به نمونه‌های مطالعه حاضر با گونه *Chondrilla australiensis* رابطه خواهری دارد و این روابط مونوفیلیک با ارزش بوت استرپ بالا(MP=91, ML=95) حمایت شدند. همچنین توپولوژی درختان تکاملی نشان داد گونه‌های مختلف *Chondriila* منشا مونوفیلتیک داشتند و با ارزش بوت استرپ بالا(MP=100,ML=100) حمایت شدند.



شکل 4: درخت Maximum parsimony و Maximum likelihood جنس *Chondrilla*. درصدهای بوت استراپ از1000 درخت روی گره‌ها نشان داده شده است (ML/MP).

بحث

سیستماتیك مولكولي (بارکدینگ DNA) بر اساس توالي قطعه‌اي در ناحیه ′5 زیر واحد ژن سیتوکروم اکسیداز 1 میتوکندری است. برای شناسایی، تاکنون تنها سیتوکروم اکسیداز Й و I مورد بررسی قرار گرفته است، و این احتمال وجود دارد که خیلی زود از DNA میتوکندری به عنوان مولکول حاوی اطلاعات مفید برای آنالیزهای فیلوژئوگرافی در اسفنج‌ها استفاده شود.

در این مطالعه برای نخستین بار سیستماتیک مولکولی جنس *Chondrilla* منطقه زیر جزر و مدی این بخش از خلیج‌فارس بررسی شد؛ تمامی مطالعات گذشته برای رده‌بندی و شناسایی آن‌ها، تنها با توجه به ویژگی‌های ریختی این موجودات صورت گرفته بود. از این رو هیچ توالی گزارش شده‌ای از آب‌های ایران برای مقایسه و مطالعه بیشتر در دسترس نبود. همچنین به دلیل مطالعات مولکولی بسیار کمی که تاکنون بر روی شاخه اسفنج‌ها انجام گرفته است توالی‌های استفاده شده در درخت فیلوژنی، دارای تنوع گونه‌ای پایین می‌باشد. در مطالعات مورفولوژی علت متفاوت بودن رنگ نمونه‌ها، میزان نور محیطزیست آن‌ها می‌باشد(Usher و همکاران، 2004).

بررسی‌های مولکولی در مورد نمونه‌های مطالعه حاضر، که مطالعات مورفولوژیک بیان می‌کرد که هر 4 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 4 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. به علت 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 به علت عدم ثبت توالی سایر گونه‌های این جنس از آب‌های اطراف خلیج‌فارس، 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 هیچ یک از توالی‌های این گونه، می‌توان احتمال حضور گونه‌ای جدید را در نظر گرفت که مسلما قطعیت بیشتر در این مورد نیازمند بررسی‌های دقیق‌تر مورفولوژیک و استفاده از نشانگرهای مولکولی دیگر می‌باشد.

مطالعات مورفولوژیک بیان می‌کند که گونه *Chondrilla nucula* به میزان فراوان در اقیانوس اطلس جنوب‌غربی، دریای Caribbean، دریای مدیترانه، فرانسه، دریای آدریاتیک، دریای Ligarian و تمامی آب‌های استرالیا توزیع شده است(Klautau و همکاران، 1999)، و آن‌ها بر روی صخره‌ها و پایه علف‌های دریایی در اعماق کمتر از 1 متر یا بیشتر رشد می‌کنند، رنگ قهوه‌ای تیره و ضخامت تقریبا 5 میلی‌متر دارند. افراد معمولا خیلی کوچک که دارای طول 1 تا 3 سانتی‌متر و عرض 0/5 تا 1 سانتی‌متر بودند. اسپیکول‌های آن‌ها از نوع Oxysphaerasters که 25 تا 30 میکرومتر قطر دارند که با طول اسپیکول‌های نمونه های مطالعه شده بسیار متفاوت است و کوچک‌تر از آن‌ها می باشد. همچنین گونه *Chondrilla australiensis* نیز در گسترده‌ای از مناطق گرمسیری تا معتدله که شامل تمام آب‌های کشور استرالیا به جز مناطق سرد جنوبی استرالیا، اقیانوس‌های هند، آرام و همچنین دریای سرخ و مدیترانه، والز جنوبی می باشند، توزیع شده‌اند. آن‌ها در سطوح افقی و عمودی صخره‌ها و در اعماق 1 تا 25 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.

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 وروشن نبوده است. طبقه‌بندی کلاسیک به طور سنتی بر اساس ساختار اسکلت و نوع و ابعاد اسپیکول می‌باشد، اما فواید آنالیز مورفومتریک 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 4 نمونه مورد بررسی در این مطالعه نشان داد که هر 4 نمونه رنج سایزی تقریبا یکسانی دارند اما با سایز اسپیکول دو گونه *C. australiensis* و *C. nucula* از استرالیا و اقیانوس اطلس تفاوت زیادی دارند.

اگر چه 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 باقی مانده است. طبقه‌بندی این جنس با توجه به اسکلت نسبتا ساده و حضور انواع خیلی کم اسپیکول، مشکل است، به طوری‌که تنها دو نوع اسپیکول و برخی گونه‌ها یک نوع اسپیکول از نوع ستاره‌ای دارند. این جنس فاقد ویژگی‌های مورفولوژیک قابل تعریف می‌باشد به همین دلیل باعث ابهام و سر در گمی در طبقه‌بندی آن می‌شود. در حال حاضر از جنس کندریلا بر اساس روش‌های طبقه‌بندی سنتی و مولکولی، از آب‌های استرالیا 4 گونه *C. secunda, C. australiensis, C. nucula* و *C. mixta*. (Fromont و همکاران، 2008) و از اقیانوس‌های هند و آرام دو گونه *C. australiensis, C. nucula* و همچنین از دریای سرخ و دریای مدیترانه گزارش شده‌اند. به هر حال، با وجود توانایی پایین پراکنش گامت‌ها و لاروهای اسفنج‌ها بعید به نظر 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 به عمل 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 به طور سنتی بر اساس ویژگی‌های ساختاری (اسپیکول) با وجود سطوح بالای هموپلاسی میان اسپیکول‌های اسفنج‌ها انجام 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 روش-های مولکولی تا حدی دچار تغییر می‌شوند.

منابع

1. **درخشش، ن.؛ سواري، ا.؛ دوست شناس، ب.؛ دهقان مديسه، س. و دورقي، ع.، 1392**. بررسي ميزان توده زنده و توليد در اسفنج‌هاي دريايي خانوده Haliclonidae در مناطق احداث سازه‌هاي مصنوعي واقع در شمال‌غربي خليج‌فارس. نشريه اقيانوس‌شناسي، سال چهارم، شماره 14.
2. **Duran, S.; Pascual, M. and Turon, X., 2003**. Low levels of geneticvariation in mtDNA sequences over the western Mediterraneanand Atlantic range of the sponge Crambe crambe (Poecilosclerida) Mar. Biol. Vol. 144, pp: 31–35.
3. **Eisapor, S. and Safaeian, Sh., 2013**. Identification of sponges of inter tidal zone in North of Hengam Island, Persian Gulf. Int. J. Mar. Sci. Eng., Vol. 3, No. 3, pp: 145-148.
4. **Folmer, O.; Black, M.; Hoeh, W.; Lutz, R. and Vrijenhoek, R., 1994**. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Molecular Marine Biology and Biotechnology. Vol. 3, No. 5, pp: 294-299.
5. **Fromont, J.; Usher, K.L.; Sutton, D.C.; Toze, S. and Kuo, J., 2008.** Species of the sponge genus *Chondrilla* (Demospongiae: Chondrosida: Chondrillidae) in Australia. Records of the Western Australian Museum Vol. 24, pp: 469–486.
6. **Haase, M. and Zielske S., 2015**. 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. 89, pp:171-81.
7. **Hooper, J.N.A., 2000**. Sponguide: Guide to Sponge Collection and Identification. Queensland Museum, 285 p.
8. **Hooper, J.N.A. and van Soest, R.W.M., 2002a**. Systema porifera, A guide to the classification of sponges. Kluwer Academic/ Plenum Publishers, New York.
9. **Hooper, J.N.A.; Kennedy, J.A. and Quinn, R.J., 2002**. Biodiversity '-hotspots,' patterns of richness and endemism, and taxonomicaffinities of tropical Australian Sponges (Porifera). Biodiv. Cons. Vol. 11, pp: 851–885.
10. **Khoshkhoo, Z.; Nazemi, M.; Motalebi, A.; Mahdabi, M.; Ardalan, A.A. and Matin, R.H., 2012**. First Record of Siliceous and Calcareous Sponges from Larak Island, Persian Gulf-Iran. Middle-East Journal of Scientific Research, Vol. 11, No. 7, pp: 887-893.
11. **Klautau, M.; Russo, C.A.; Lazoski, C.; Boury-Esnault N. and Thorpe, J.P., 1999.** Does cosmopolitanism results from overconservative systematics? A case study using the marine sponge Chondrilla nucula. Evolution. Vol. 53, pp: 1414-1422. doi:10.2307/2640888.
12. **Larsson, A., 2014**. AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets, bioinformatics, Vol. 30, No. 22, pp: 3276–3278. doi:10.1093/bioinformatics/btu531.
13. **Meixner, Wolfgang R. Hess., 2007**. Phylogenetic analysis of freshwater sponges provide evidence for endemism and radiation in ancient lakes. Molecular Phylogenetics and Evolution, Vol. 45, pp: 875–886.
14. **Nylander, J.A.A., 2004**. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, Sweden.
15. **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., 2010.** Improved phylogenomic taxon sampling noticeably affects non-bilaterian relationships. Molecular Biology and Evolution. Vol. 27, pp: 1983–1987.
16. **Sadeghi, P.; Savari, A.; Yavari, V. and Devin, M.L., 2008.** First record of sponge distribution in the Persian Gulf (Hengam Island, Iran). Pakistanish Journal of Biological Science, Vol. 11, No. 21, pp: 2521-2524.
17. **Safaeian, S.; Hosseini, H.; Farmohamadi, S.; Mohtarami, P.; Abaspour asadolah, A. and Nejatkhah, A., 2009.** First study of marine sponge species of nay Band Bay & Bustaneh, Persian Gulf, Iran. Iran Journal of marine Sciences and technology research, pp: 75-90.
18. **Taylor, M.W.; Thacker, R.W. and Hentschel, U., 2007.** Genetics. Evolutionary insights from sponges. Science, Vol. 316, pp: 1854–1855.
19. **Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M. and Kumar, S., 2011.** MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biolidy and Evolution, Vol. 28, pp: 2731-2739.
20. **Thompson, G.D.; Higgins, D.G. and Gibson, T.j., 1994.** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research, Vol. 22, No. 22, pp: 4673-4680.
21. **Swofford, D.L., 2003**. PAUP. phylogenetic analysis using parsimony (and other methods).

Version 4. Sinature Associates, Sunderland, Massachusetts.

22. **Usher Kayley, M.; David, C.; Toze, S.; Kuo, J. and Fromont, J., 2004.** Biogeography and phylogeny of Chondrilla species (Demospongiae) in Australia. MARINE ECOLOGY PROGRESS SERIES Mar Ecol Prog Ser. Vol. 270, pp: 117–127.
23. **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., 2012**. Global diversity of sponges (Porifera). PLoS One. Vol. 7, No. 4, e35105 p.