معرفی گونه *Chondrilla* sp PG A ۲۰۱۵ 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، صندوق پستی : ٦٤١٩٩-٤٣١٧٥
- **سیدمحمدباقر نبوی***: گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم وفنون دریایی خرمشهر، صندوق پستی : ٦٤١٩٩-٤٣١٧٥
- **محمدعلی سالاری‌علی‌آبادی**: گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم وفنون دریایی خرمشهر، صندوق پستی : ٦٤١٩٩-٤٣١٧٥
- **احمد سواری**: گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم وفنون دریایی خرمشهر، صندوق پستی : ٦٤١٩٩-٤٣١٧٥
- **حسین ذوالقرنین**: گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم وفنون دریایی خرمشهر، صندوق پستی : ٦٤١٩٩-٤٣١٧٥

تاریخ دریافت: اسفند ١٣٩٤ تاریخ پذیرش: خرداد ١٣٩٥

چکیده

در این مطالعه برای اولین‌بار 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 جمع آوری گردیدند. موقعیت جغرافیایی منطقه E ''۱۳۵ '٥٤ ٥١، N ''۹۲۳ '٤۹ ۲۷ 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 می‌باشند که به‌صورت 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 ٤ 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*، پوریفرا، CO_1، آنالیز مولکولی، طبقه‌بندی سنتی

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: nabavishiba@yahoo.com

مقدمه

اسفنج‌ها شاخه متنوعی از جانوران بنتیک آبزی 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 می گردد (Taylor و همکاران، ۲۰۰۷).

اسفنج‌ها میان ۲۸ شاخه بی‌مهره آبزی، 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 شکارچیانی 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 ضدمیکروبی، ضدالتهابی، ضدتومور، 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 زیست شناسی و به‌خصوص روابط مربوط به جغرافیایی زیستی آن‌ها هنوز مبهم و 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 تنوع‌زیستی (غنای 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 بی‌مهره‌گان دریایی، گونه‌های اسفنج اغلب محدوده توزیع و پراکنش وسیع‌تری دارند. تنها فون اسفنج‌های چندین منطقه ازجمله دریای کارائیب و استرالیا به‌خوبی 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 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، خصوصاً سیتوکروم اکسیداز (COII و COI)، 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).

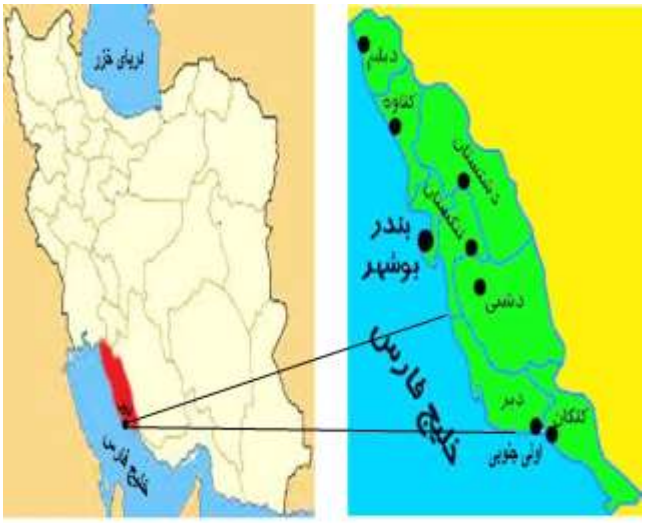
سوابق و پیشینه تحقیق بیانگر این موضوع است که با وجود تنوع زیاد اسفنج‌ها در خلیج‌فارس، به‌دلیل شرایط خاص منطقه‌ای، تاکنون هیچ مطالعه‌ای در خصوص مباحث مورفولوژیکی و سیتماتیک مولکولی و بارکدینگ بر روی اسفنج‌های بسترهای صخره‌ای سواحل شمالی خلیج‌فارس انجام نشده است و این مطالعه می‌تواند باعث روشن کردن روابط فیلوژنی موجود بین گونه‌های جنس *کندریلا* 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 خلیج‌فارس، 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. Khoshkhoo و همکاران (۲۰۱۲) نیز چهار گونه *Agelas* sp.,*Haliclona* sp., *Ircinia* sp., *Niphates* sp. را در جزیره لارک گزارش نمودند. هم‌چنین درخشش و همکاران (۱۳۹۲) میزان توده زنده و تولید را در اسفنج‌های خانواده

Haliclonidae در شمال‌غرب خلیج‌فارس 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 carnosa*; *Leucetta* sp. *cinerea*; را در منطقه زیر جزر و مدی جزایر کیش، لارک و خلیج نایبند گزارش نمودند. هم‌چنین، Eisapor و Safaeian (۲۰۱۳) هفت گونه *Amphimedon viridis*، *fallax*, *Haliclona cinerea*, *Haliclona 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 اولین‌بار شناسایی و معرفی گردید که از این جنس ۱ گونه جدید شناسایی و ثبت گردید.

مواد و روش‌ها

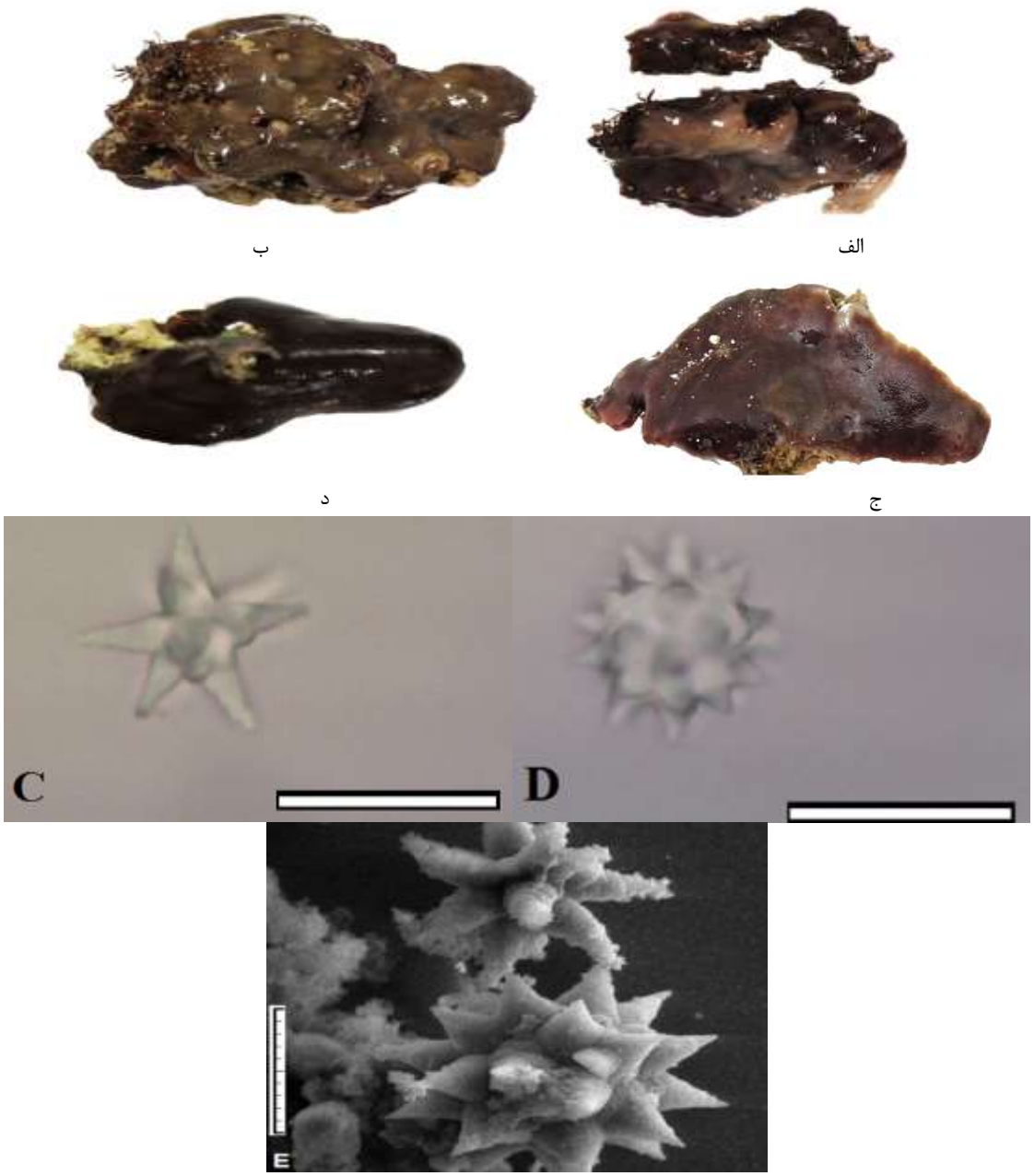
در این مطالعه اسفنج های دریایی جنس *کندریلا* از منطقه زیر جزر و مدی ساحل اولی جنوبی جمع‌آوری شد. روستای اولی از توابع شهرستان دیر حد فاصل کنگان - دیر استان بوشهر قرار گرفته است. نمونه‌های اسفنج مورد مطالعه با انجام عملیات غواصی از مناطق زیر جزر و مدی E "۱۳۵ '۵۴ ۵۱، N "۹۲۳ '۴۹ ۲۷ در عمق ۸ متری در آبان 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 مریستمیک، بخشی از هر نمونه به اتانول ۹۶٪ جهت انجام آنالیزهای مولکولی و بخشی دیگر از نمونه جهت انجام آنالیزهای موروفولوژیک به اتانول ۷۰٪ منتقل گردید.



شکل ۱: موقعیت جغرافیایی روستای اولی

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 به‌طوری‌که در برخی از نمونه‌ها هضم مواد آلی چندین ساعت به‌طول انجامید. بعد از گذشت مدت زمانی کوتاه ترکیبات آلی حل شده و فقط اسکلت معدنی باقی می‌ماند. لوله‌ها در سانتریفیوژ با دور rmp ۳۰۰۰ به مدت ۵-۳ 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

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 ۲۵ عدد 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 AM۴۰۲۳ X قابل اتصال به کامپیوتر انجام گردید. آماده‌سازی اسپیکول جهت تهیه تصاویر الکترونی SEM به‌روش ذکر شده انجام شد.



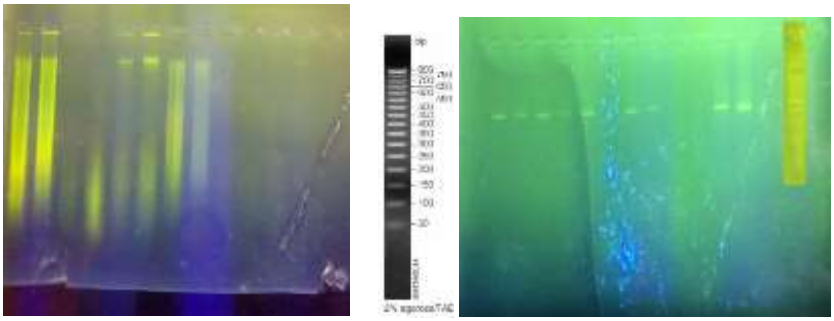
شکل۲:الف، ب، ج و د. نمونه‌های گونه *Chondrilla* sp PGA ۲۰۱۵. C. میکرواسپیکول نوع Oxysphaerasters. D. میکرواسپیکول نوع Oxyasters (H&E×۴۰) (مقیاس D.C ۲۰میکرومتر).E. تصویر Scanning electron microscope (SEM) (مقیاس۱۰میکرومتر)

استخراج ژنوم DNA: برای استخراج ژنوم DNA از روش تغییر یافته CTAB استفاده گردید که بدین‌ترتیب می‌باشد. تکه‌های کوچکی از هر نمونه با قیچی استریل جدا و به‌مدت یک ساعت در آب نگه‌داری شد تا الکل موجود در نمونه‌ها خارج گردد. سپس جهت آبگیری کامل، نمونه‌ها به‌مدت ۴ تا ۶ ساعت در دستگاه فریزدرایر قرار گرفتند. حدود ۷۰-۵۰ میلی‌گرم از هر نمونه را درون میکروتیوپ ۲ میلی‌لیتری ریخته و با قیچی هموژن تا به حالت پودری شکل تبدیل شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از بافر CTAB ٪۲ (۲ % CTAB, ۱۰۰ mM Tris–HCl pH ۸,۰, ۲۰ mM EDTA, ۱,۴ M NaCl) را به آن افزوده و به‌مدت ۱۰ ثانیه با دور کم ورتکس شد. سپس به‌مدت ۱ ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد در حمام آب گرم نگه‌داری شده و بعد از آن ۱ میلی‌لیتر از مخلوط کلروفرم/ایزوآمیل الکل(۱:۲۴) به آن افزوده شد و به‌مدت 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 CTAB ٪۵ (۵٪ CTAB, ۰,۳۵ M NaCl)، میکس کرده و در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد به‌مدت ۴۰ دقیقه انکوباسیون شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از مخلوط کلروفرم/ایزوآمیل الکل به آن افزوده و به‌مدت ۱ دقیقه ورتکس گردید. نمونه‌ها با شرایط قبل (دور ۱۲۰۰۰ rpm، 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 ۱.۵-۱ میلی‌لیتر از بافر CTAB ٪۱ (۱% CTAB, ۵۰ mM Tris–HCl pH ۸,۰, ۱۰ mM EDTA) به میکروتیوپ اضافه گردید. برای ته‌نشینی به‌مدت ۲ ساعت و نیم در دمای اتاق انکوباسیون شد. بعد از طی مدت زمان نمونه‌ها به‌مدت ۲۰ دقیقه و با دور ۱۲۰۰۰rpm و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. سپس فاز رویی دور ریخته شده و جهت معلق‌سازی پلیت DNA، ۱ میلی‌لیتر از محلول ۱ mM HS-TE (۱۰ mM Tris–HCl pH ۸,۰, EDTA, ۱ M NaCl) اضافه کرده و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون می‌گردد. سپس جهت ته‌نشینی DNA، ۱میلی‌لیتر از محلول ۹۶% ethanol/۳ M NaOAc به نسبت ۱:۳۰ اضافه گردید. مجدداً به‌مدت 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 به‌مدت 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 به‌مدت 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 به‌مدت ۱ شبانه‌روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری گردید (Meixner و همکاران ۲۰۰۷).

تکثیر قطعه ژن هدف و انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR): ژنوم COI با تقریباً ۶۰۰ bp از توالی میتوکندری با استفاده از جفت پرایمر جهانی

(LCOI۴۹۰):۵´-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-۳´

(LCO۲۱۹۸):۵´-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-۳´ 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 توالی یابی به شرکت bioneer کره فرستاده شد.



ب الف

شکل۳: الف) نمونه DNA استخراجی ب) باند محصولات PCR

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

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

نتایج

در این مطالعه ۴ نمونه *Chondrilla* sp PGA۲۰۱۵، *Chondrilla* sp PGB۲۰۱۵، *Chondrilla* sp PGC۲۰۱۵، *Chondrilla* sp PGD۲۰۱۵ 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 هیچ‌کدام 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 PGA ۲۰۱۵(Accession number LC۱۰۱۷۹۶) 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- قهوه ای 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 Oxysphaerasters و Oxyasters بودند. سایز اسپیکول‌های نمونه‌های مورد مطالعه در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۱: رده‌بندی مورفولوژیک نمونه‌های شناسایی شده در این مطالعه

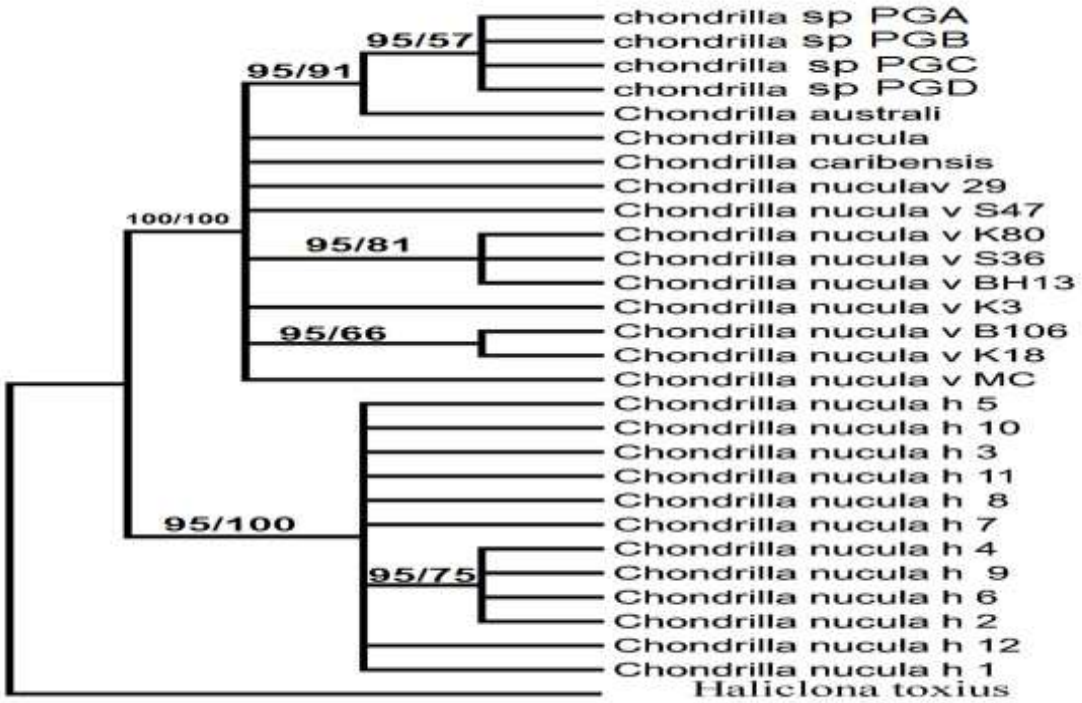
Kingdom	Phylum	Class	Subclass	Order	Family	Genus	Species
Animalia	Porifera	Demospongiae	Tetractinomorpha	Hadromerida	Chondrillidae	Chondrillida	*Chondrilla australiensis*

جدول۲: سایز اسپیکول‌های نمونه‌های جنس *Chondrilla* شناسایی شده در این مطالعه

نمونه	نوع اسپیکول(سایز بر حسب میکرومتر)					
	Oxysphaerasters			Oxyasters		
	Max	Mean	Min	Max	Mean	Min
Chondrilla sp PGA۲۰۱۵	۱۱۸/۹۴۶	۱۰۲/۸۲۷۱	۶۸/۲۰۷	۱۱۸/۸۰۸	۱۰۰/۴۴۵۷	۷۰/۶۸۵
Chondrilla sp PGB۲۰۱۵	۱۲۷/۴۲۰	۱۰۳/۱۸۳۸	۶۳/۴۸۶	*	*	*
Chondrilla sp PGC۲۰۱۵	۱۳۴/۶۵۹	۱۰۴/۵۲۰۳	۶۲/۶۴۳	*	*	*
Chondrilla sp PGG۲۰۱۵	۱۳۳/۰۲۷	۱۱۳/۳۰۰۳	۸۴/۳۸۴	۱۲۱/۵۸۶	۹۷/۰۱۲۱	۸۰/۳۳۵

*تعداد اسپیکول‌ها بسیار بسیار کم می‌باشد به‌طوری‌که 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 ۴ نمونه مطالعه شده باهم مطابق بودند و با هم تشکیل یک گروه مونوفیلیک (کلاد 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 این‌حال هیچ توالی از این گونه در بانک ژن وجود نداشت و طبیعتاً با هیچ‌یک 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(۹۵=ML ,۹۱=MP) حمایت شدند. هم‌چنین توپولوژی درختان تکاملی نشان داد گونه‌های مختلف *Chondriila* منشا مونوفیلتیک داشتند و با ارزش بوت استرپ بالا(۱۰۰=ML,۱۰۰=MP) حمایت شدند.



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

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 Ï و I مورد بررسی قرار گرفته است و این احتمال وجود دارد که خیلی زود از DNA میتوکندری به‌عنوان 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 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.

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 این‌حال، 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 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 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 (Klautau 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 گستره‌ای 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، والز 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.

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 به‌طور سنتی براساس 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 ازجمله نور و عمق، تحت تاثیر قرار گیرد. میانگین سایز اسپیکول‌های ۴ نمونه مورد بررسی در این مطالعه نشان داد که هر ۴ نمونه محدوده اندازه تقریباً یکسانی دارند اما با اندازه اسپیکول دو 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 سر در گمی در طبقه‌بندی آن می‌شود. در حال حاضر از جنس *کندریلا* براساس روش‌های طبقه‌بندی سنتی و مولکولی، از آب‌های استرالیا ۴ گونه *C. secunda, C. australiensis, C. nucula* 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. به‌هرحال، 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 هموپلاسی میان اسپیکول‌های اسفنج‌ها انجام

می‌گرفت، شناسایی خوب و دقیقی برای این شاخه نمی‌باشد. به‌طوری که در این مورد شناسایی مورفولوژیک انجام شده با نتایج مولکولی دارای اختلاف است و بدین‌ترتیب 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 خانوده Haliclonidae در مناطق احداث سازه‌های مصنوعی واقع در شمال‌غربی خلیج‌فارس. نشریه اقیانوس‌شناسی. سال ۴، شماره ۱۴، صفحات ۷۷ تا ۸۴.

۲. **Duran, S.; Pascual, M. and Turon, X., ۲۰۰۳**. Low levels of geneticvariation in mtDNA sequences over the western Mediterraneanand 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 Zielske 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 taxonomicaffinities of tropical Australian Sponges (Porifera). Biodiv. Cons. Vol. ۱۱, pp: ۸۵۱-۸۸۵.

۱۰. **Khoshkhoo, 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: ۳۲۷۶-۲۷۸. 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 Biolidy 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

weight matrix choice. Nucleic Acids Research. Vol. ۲۲, No. ۲۲, pp: ۴۶۷۳-۴۶۸۰.

۲۱. **Swofford, D.L., ۲۰۰۳**. PAUP. Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods). Version ۴. Sinature 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.