



Original Research Paper

Morphological identification and phylogenetic analysis of Asteroidea (Echinodermata) in the northern coast of the Persian Gulf

*Behjat Adeli, Pargol Ghavam Mostafavi *, Seyed Mohammad Reza Fatemi*

Department of Marine Sciences, Faculty of Natural Resources and Environment, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Key Words

Asteroidae
mt 16S rRNA
Persian Gulf
phylogeny

Abstract

Introduction: Asteroidae, or starfish, have about 1900 extant species as one of the classes of phylum Echinodermata.

Materials & Methods: Thirty specimens of starfishes were collected from the northern islands of the Persian Gulf for morphological identification, molecular analysis and phylogeny. The first starfish samples were distinguished morphologically then they were identified after DNA extraction by CTAB and Chelex 5% and its amplification based on 16S rRNA gene in molecular analysis. The phylogenetic relationships of asteroids were analyzed using maximum likelihood, maximum parsimony and Bayesian methods.

Result: The morphological and molecular identifications displayed 6 species of *Luidia hardwicki*, *Astropecten indicus*, *Aquilonastra watersi*, *Aquilonastra iranica*, *Linckia laevigata* and *Pentaceraster mammillatus* belonging to 5 genera and 2 families. Our results showed *Luidia hardwicki* and *Astropecten indicus* species were grouped with sequences of the same species from GenBank in separate clades.

Conclusion: As *Aquilonastra watersi* and *Pentaceraster mammillatus* in 16S rRNA gene are reported for the first time so their sequences were placed in sister groups with *Aquilonastra yairi* and *Pentaceraster cumingi*, respectively.

* Corresponding Author's email: mostafavi_pa@srbiau.ac.ir

مقاله پژوهشی

شناسایی مورفولوژیک، مولکولی و بررسی روابط فیلوژنی ستاره‌های دریایی رده Asteroidea غالب جزایر شمالی خلیج فارس با استفاده از قطعه ژن *Mt 16S rRNA*

بهجت عادل، پرگل قوام مصطفوی*، سیدمحمد رضا فاطمی

گروه علوم دریایی، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

کلمات کلیدی

Asteroidea
Mt 16S rRNA
خلیج فارس
فیلوژنی

مقدمه: ستاره‌های دریایی به‌عنوان یکی از رده‌های شاخه خارپوستان دارای ۱۹۰۰ گونه زنده هستند.

مواد و روش‌ها: تعداد ۳۰ نمونه ستاره دریایی جهت انجام شناسایی مورفولوژیک، آنالیز مولکولی و فیلوژنی از جزایر شمالی خلیج فارس (قشم، هرمز، هنگام و ساحل بندرعباس) جمع‌آوری شد. نمونه‌ها ابتدا با استفاده از ویژگی‌های مورفولوژیک شناسایی شدند و پس از استخراج DNA با روش CTAB و 5% Chelex و تکثیر ژن هدف 16S rRNA، شناسایی مولکولی انجام گرفت. روابط فیلوژنی رده Asteroidea با استفاده از سه روش Maximum Likelihood، Maximum Parsimony و Bayesian آنالیز شد.

نتایج: نتایج به‌دست آمده از شناسایی مورفولوژیک و مولکولی، ۶ گونه ستاره دریایی که به ۵ جنس و ۲ خانواده تعلق دارند شامل: *Pentaceraster mammillatus* می‌باشند. توالی‌های گونه‌های *Luidia hardwicki* و *Astropecten indicus* با توالی‌های هم‌گونه‌شان در بانک ژن در شاخه‌های جدا قرار می‌گیرند. توالی‌های 16S rRNA گونه‌های *Aquilonastra watersi* و *Pentaceraster mammillatus* برای اولین بار در بانک ژن گزارش می‌شوند و به ترتیب در گروه‌های خواهری با *Aquilonastra yairi* و *Pentaceraster cumingi* قرار می‌گیرند. از آنجایی که گونه *Linckia laevigata* (سبز-نارنجی) براساس آنالیزهای مولکولی شناسایی گردید، این تکنیک می‌تواند در کنار مشاهدات مورفولوژیک نتایج کامل‌تری ارائه کند.

نتیجه‌گیری و بحث: رده‌بندی Asteroidea ها در سطح جنس و خانواده نشان داد درخت فیلوژنی قطعه 16S rRNA براساس روش Bayesian با نتایج فیلوژنتیک پیشین منطبق است.

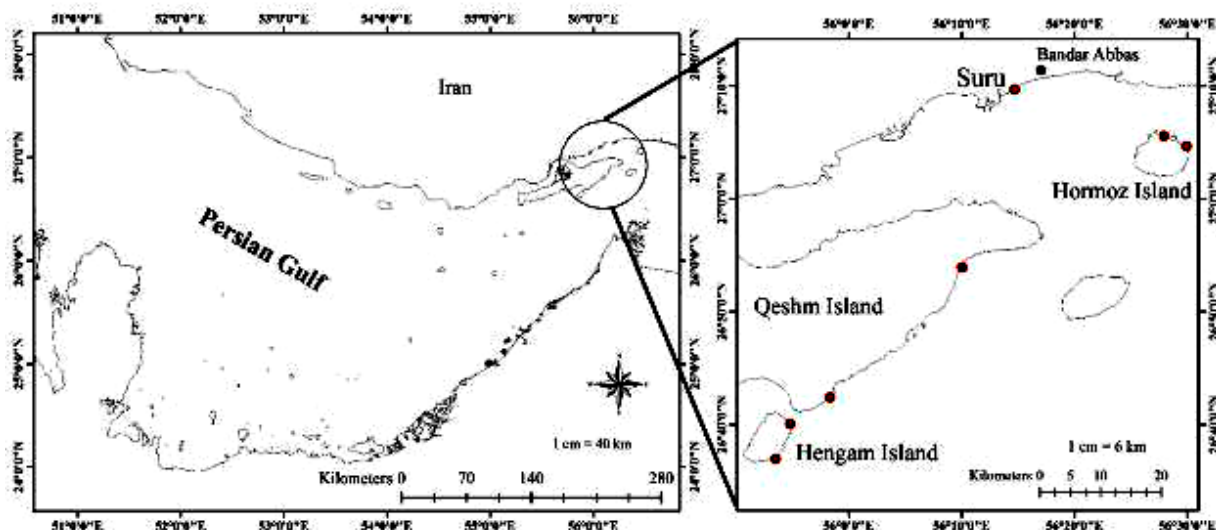
مقدمه

موضوعات تکاملی، لاروی و تولیدمثلی مورد مطالعه قرار می‌گیرند (۲). خانواده‌های Ophidiasteridae و Oreasteridae در تجارت زینتی و صنعت اکواریوم همواره مورد توجه می‌باشند (۴) همچنین به دلیل دارا بودن خواص دارویی و متابولیت‌های ثانویه از قبیل گلیکوزیدها که دارای خواص سمیت سلولی، ضدباکتریایی و... می‌باشند، مورد بررسی قرار می‌گیرند (۸ و ۹). اگرچه ستاره‌های دریایی عموماً از طریق خصوصیات مورفولوژیک شناسایی می‌شوند، اما برخی گونه‌ها تنوع فنوتیپی زیادی دارند (۶، ۱۰ و ۵). گونه‌های جنس *Linckia* که متعلق به خانواده Ophidiasteridae است، به وسیله بازوهای سیلندری، دیسک دهانی کوچک، گرانول‌ها و منافذ واقع در سطح دهانی شناسایی می‌شوند. برخی ویژگی‌های مورفولوژیک در برخی گونه‌های مربوط به جنس *Linckia* مانند الگوی رنگ و تعداد مادرپورایت در بین گونه‌ها یکسان است. بنابراین شناسایی گونه‌ها تنها از طریق ویژگی‌های مورفولوژیک، تعیین مرزهای تاکسونومیک را با مشکل مواجه خواهد کرد. مطالعات مختلفی در شناسایی مورفولوژیک Asteroidهای خلیج فارس انجام شده است (۱۱، ۱۲ و ۱۳). اولین گزارش خارپوستان خلیج فارس توسط Mortensen انجام شد. در این مطالعه ۱۰ گونه ستاره دریایی از آب‌های ایرانی خلیج فارس شناسایی شد (۱۱). Clark و Row در بررسی خارپوستان مناطق Indo-pacific، ۱۳ گونه ستاره دریایی خلیج فارس را شناسایی کردند (۱۴). Price، ۱۴ گونه را از آب‌های عربی خلیج فارس شناسایی کرد (۱۲) و اخیراً Pourvali، ۶ گونه ستاره دریایی را در جزیره هرمز شناسایی کرد (۱۳). اما تاکنون مطالعه جامعی بر اساس شناسایی مولکولی و بررسی روابط فیلوژنتیک ستاره‌های دریایی این منطقه انجام نگرفته است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری: ۳۰ نمونه ستاره دریایی از خرداد ۱۳۹۶ تا آبان ۱۳۹۷ از ۷ منطقه (شکل ۱) در جزایر شمالی خلیج فارس با عملیات غواصی از نواحی زیر جزر و مدی جمع‌آوری شد. نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل شدند و جهت شناسایی مورفولوژیک، ویژگی‌های مورفولوژیک شان از جمله فرم رنگ، تعداد و طول بازوها، تعداد مادرپورایت، پاپولا، پاکسیلا، صفحات دهانی، خارهای فارو و آمبولاکرال صفحات و خارهای حاشیه فوقانی و تحتانی با استفاده از استریومیکروسکوپ (Leica Ez40) عکس گرفته شد.

ستاره‌های دریایی به‌طور معمول دارای یک دیسک مرکزی و ۵ بازو می‌باشند. سطح بالایی شان ممکن است صاف، دانه‌ای یا خاردار باشد و با صفحاتی که با یکدیگر هم‌پوشانی دارند، پوشیده شده باشد. بسیاری از گونه‌ها در رنگ‌های مختلف قرمز یا نارنجی هستند و گونه‌های دیگری هم به رنگ آبی، خاکستری یا قهوه‌ای می‌باشند. این موجودات دارای پاهای لوله‌ای و یک دهان در مرکز سطح دهانی هستند (۱). بازوها در ستاره‌های دریایی دارای یک سری استخوانچه‌های آمبولاکرال جفت شده می‌باشند که در امتداد هر بازو ایجاد می‌شوند. پاهای لوله‌ای از منافذ موجود بین استخوانچه‌های آمبولاکرال به داخل یک شیار بزرگ شکمی خارج می‌شوند. این شیارها در ناحیه دهان در سطح شکمی دیسک به یکدیگر می‌پیوندند (۲). ستاره‌های دریایی یکی از متنوع‌ترین رده‌های شاخه خارپوستان می‌باشند و حدود ۱۹۰۰ گونه زنده، ۳۶ خانواده و تقریباً ۳۷۰ جنس زنده را شامل می‌گردند (۳). Asteroidها در همه اعماق اقیانوس از منطقه بین جزر و مدی تا مناطق بسیار عمیق تقریباً ۶۰۰۰ متر پراکنده شده‌اند و در تمام اقیانوس‌های جهان حضور دارند. اما بیش‌ترین تنوع آن‌ها در مناطق گرمسیری اقیانوس اطلس و مناطق Indo-pacific می‌باشد (۲). رده Asteroidea شامل سه فوق راسته Valvatacea، Forcipulatacea و Spinulosasea می‌باشند. فوق راسته Valvatacea عمدتاً در مناطق گرمسیری Indo-pacific پراکنش دارند و شامل خانواده‌های Oreasteridae، Luidiidae، Astropectinidae (راسته Paxillosida) و Ophidiasteridae (راسته Valvatida) می‌باشند که از لحاظ اکولوژیک اهمیت دارند (۴). با وجود این که جنس *Astropecten* از خانواده Astropectinidae دارای یک مرحله لاروی پلانکتونی طولانی مدت می‌باشند و انتظار می‌رود که دارای نرخ گونه‌زایی کمی باشند، اما این خانواده با بیش از ۱۵۰ گونه توصیف شده، دارای بیش‌ترین میزان گونه در میان ستاره‌های دریایی می‌باشند (۵). جنس *Luidia* تنها جنس زنده از خانواده Luidiidae عمدتاً در بسترهای شنی و گلی آب‌های سطحی نواحی گرمسیری و نیمه‌گرمسیری و گروهی در آب‌های معتدل گسترش دارند (۶). خانواده‌های Astropectinidae و Luidiidae در مطالعات روابط تکاملی و فیلوژنی رده Asteroidea همواره مورد بحث بوده‌اند (۲). ستاره‌های دریایی خانواده Asterinidae با بدنی ۵ وجهی و سطحی صاف، مناسب برای چسبیدن به بسترهای سخت آب‌های کم‌عمق جهان هستند (۷). این خانواده خصوصاً در



شکل ۱: موقعیت جغرافیایی ایستگاه‌های نمونه برداری

انتخاب شد. طبق این آزمون مدل GTR+G+I به دست آمد. آنالیز Maximum likelihood در نرم افزار MEGA 7 (۲۰) براساس مدل به دست آمده و با تکرار بوت استرپ ۱۰۰۰ انجام شد. و آنالیز Maximum parsimony در نرم افزار PAUP نسخه 4b10 (۲۱) و با تکرار بوت استرپ ۱۰۰۰ انجام گرفت. برای انجام آنالیز Bayesian از الگوریتم میادله شاخه به روش دو نیمه سازی درخت و اتصال مجدد (TBR=Tree Bisection Reconnection) و روش جستجوی اکتشافی (heuristic search) استفاده شد که به صورت تصادفی ۱۰۰ توالی اضافی را نیز بررسی می کند. آنالیز Bayesian در نرم افزار MrBayes نسخه ۳/۲ (۲۲) انجام شد. حمایت شاخه ها در روش Bayesian با اعداد مربوط به احتمال پسین بیان می گردد. درخت ترسیم شده طی آنالیزهای فیلوژنتیک، در نرم افزار TreeView مشاهده شد. برای رسم درخت فیلوژنی از توالی های دو گونه *Leptasterias leptodom* (AY548869) و *Asterias forbesi* (AY548858) از راسته Forcipulatacea به عنوان گروه های خارجی استفاده شد.

نتایج

مشاهدات مورفولوژیک: ۳۰ نمونه جمع آوری شده ستاره دریایی که متعلق به ۶ گونه می باشند، براساس کلید شناسایی موجود، شناسایی مورفولوژیک شدند که ویژگی های مورفولوژیک شان در ادامه ارائه شده است (۱۴).

***Astropecten indicus* Döderlein:** دارای ۵ بازو می باشند با نسبت $R/T=40/12$ میلی متر. پاکسیلا در سطح پشتی بازوها در ردیف های منظم قرار گرفته است. سه تا چهار صفحه دهانی در

استخراج DNA و تکثیر PCR: DNA ژنومی از بافت های پاهای لوله ای یا نوک بازو با استفاده از محلول 5% Chelex (۱۵) یا با استفاده از بافر استخراج CTAB-پروتئیناز K (۱۶) استخراج گردید. ۱۳۰۰ bp از قطعه ژن 16S DNA میتوکندریایی با استفاده از توالی پرایمرهای (CGTAGGATTTTAATGGTCGAACAGA) AST16SL2 (۷) و (TGTGAAGGAAAGTTGAAATAATGTG) AST16SR2 (۱۷) تکثیر شد. فرایند PCR در حضور مسترمیکس، پرایمرها، آب و نمونه های DNA در پروتکل دمایی زیر انجام شد: یک مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ °C برای ۵ دقیقه، سیکل تکثیر DNA در ۳۰ تکرار مرحله واسرشت سازی در دمای ۹۴ °C برای ۳۰ ثانیه، مرحله الحاق در دمای ۴۹ °C برای ۳۰ ثانیه و مرحله بسط دمای ۷۲ °C به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله بسط نهایی در دمای ۷۲ °C به مدت ۵ دقیقه انجام شد. محصول PCR به دست آمده در الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ مورد ارزیابی قرار گرفت. توالی یابی محصولات PCR در شرکت بایونیر کره جنوبی و توسط آنالیزر ABI- 3730XL انجام گرفت.

شناسایی مولکولی و آنالیز فیلوژنتیک: توالی های به دست آمده از نمونه های ستاره های دریایی در NCBI شناسایی شدند و در بانک ژنی ثبت شدند و شماره های شناسایی شان دریافت شد (MT375396-MT375427, MT396681-MT396710). برای آنالیز فیلوژنی، توالی های به دست آمده از ژن 16S rRNA و توالی های مورد نظر در بانک ژن، با استفاده از نرم افزار Clustal W (۱۸) هم ردیف شدند. جهت رسم درخت فیلوژنیک با آنالیزهای Maximum likelihood و Bayesian ابتدا مدل مناسب برای هر آنالیز در نرم افزار MrModeltest (۱۹) و براساس معیار اطلاعاتی (Akaike Information Criterion:AIC)

کوچک تر بعد از اولین صفحات، یک سری خارهای کوتاه در بخش میانی صفحات حاشیه فوقانی دارند. شیار آمبولاکرال با دو ردیف خار حاشیه دار شده است. خارهای ساب آمبولاکرال از خارهای فارو بزرگ تر هستند و خارهای فارو میانی از دیگر خارها بزرگ ترند (شکل ۲).

نواحی بین شعاعی هستند. صفحات حاشیه بالایی زمانی که از بالا دیده می شوند، عرض بیش تری نسبت به طول دارند. در نمونه هایی که $R=40$ میلی متر خارهای حاشیه بالایی به طور برجسته ای از حاشیه داخلی صفحات حاشیه بالایی پروکسیمال به وجود می آیند. نمونه های



شکل ۲: *Astropecten indicus* الف، سطح فوق دهانی. ب، سطح دهانی. ج، (۱) مادرپورایت. (۲) خارهای حاشیه بالایی در بخش میانی ($R=40$), د، (۱) پاکسیلا در ردیف های منظم. (۲) خارهای حاشیه بالایی در بخش میانی بازو ($R<40$). و، صفحات دهانی. ی، (۱) خارهای ساب آمبولاکرال. (۲) خارهای فارو

پروکسیمال می باشند. صفحات دهانی دارای ۴ تا ۶ خارچه کلفت و مخروطی در بخش بین شعاعی می باشند. هر کدام از صفحات حاشیه فوقانی دارای ۶ خارچه در لبه سطح دهانی هستند. ۶ خارچه در صفحات بین شعاعی دیستال، ۷ خار دهانی، ۶ زیردهانی و ۶ فارو در سطح دهانی وجود دارد. رنگ سطح فوق دهانی طوسی با لکه های قرمز یا قهوه ای است (شکل ۴).

Aquilonastra watersi O'Loughlin and Rowe, 2006

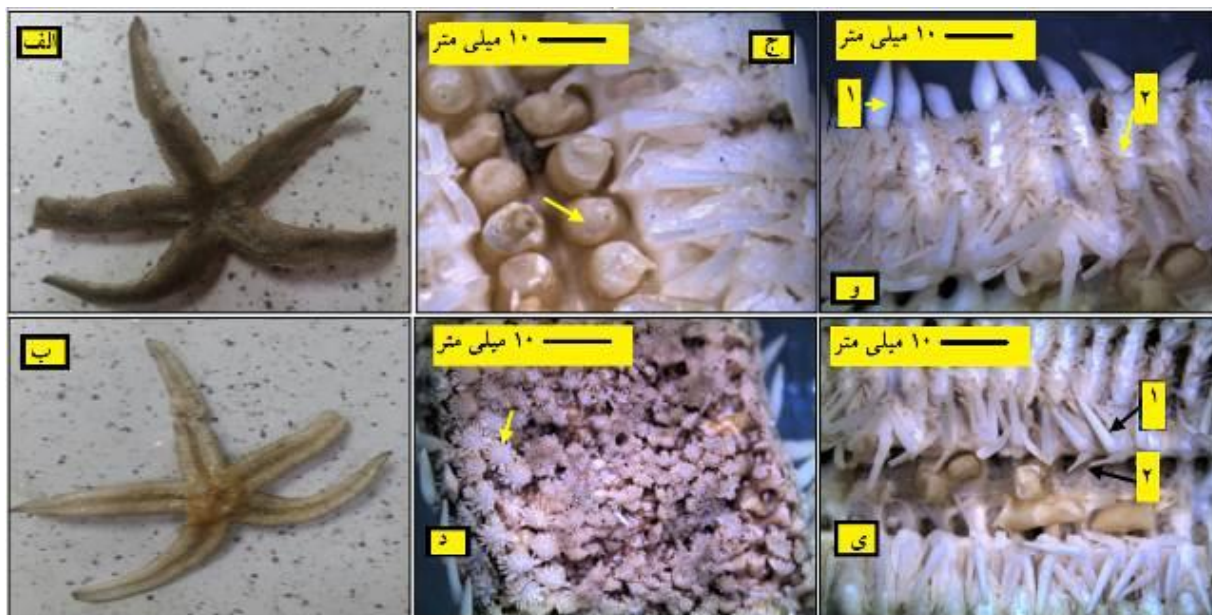
دارای ۵ بازو و نسبت $R/r=26/13$ میلی متر می باشند. بازوها مخروطی شکل اند و در نوک مدورند. یک مادرپورایت مشخص در سطح فوق دهانی دارند. ۶ تا ۷ صفحه فوق دهانی پروکسیمال دارای ۲ پاپولا در بخش های میانی می باشند. صفحات ثانویه کوچکی بین صفحات فوق دهانی وجود دارد. صفحات فوق دهانی پروکسیمال در ردیف های نامنظم قرار گرفته است. هر صفحه فوق دهانی دارای خارچه های بلند و نازک در ۴ دسته می باشند که تعداد ۱۵ خارچه در هر دسته وجود دارد. ۳ تا ۵ خارچه در صفحات بین شعاعی دیستال و ۶ خار دهانی، ۶ زیردهانی، ۵ فارو و ۵ خار ساب آمبولاکرال در سطح دهانی وجود دارد. این نمونه ها در دو الگوی رنگی می باشند: طوسی با لکه های قرمز و طوسی با لکه های سبز (شکل ۵).

Luidia hardwicki Gray, 1840: ۵ بازو دارند. نسبت $R/r=70/13$

میلی متر می باشد. بازوها مسطح شده اند و رنگ در نمونه های زنده در خطوط میانی بازو و مرکز دیسک تیره تر از دیگر بخش ها می باشد. مادرپورایت توسط پاکسیلا پنهان شده است. پاکسیلاهای بزرگ دارای ۱۰ تا ۱۵ گرانول مرکزی و ۲۰ تا ۲۵ خارچه اطراف می باشند و در ردیف های منظم در بخش های جانبی به طور مورب قرار گرفته اند. پاکسیلاهای کوچک تر با گرانول های کم تر در مرکز دیسک قرار دارند. صفحات حاشیه بالایی با پاکسیلای جانبی پوشیده شده است. صفحات حاشیه پایینی دارای یک ردیف خارهای حاشیه ای برجسته در لبه خارجی و خارچه های فراوان در بخش شکمی هستند. طول خارهای حاشیه پایینی جانبی برابر با طول دو صفحه حاشیه پایینی است. صفحات آمبولاکرال دارای سه خار می باشند: دو خار ساب آمبولاکرال صاف و یک فارو خمیده (شکل ۳).

Aquilonastra iranica O'Loughlin and Waters, 2006

دارای ۵ بازو هستند. نسبت $R/r=20/10$ میلی متر است. دارای ۵ صفحه فوق دهانی پروکسیمال بین صفحات دهانی هستند. صفحات دهانی دارای خارچه های کلفت، کوتاه و مخروطی در دستجات کوچک هستند. دارای تقریباً ۱۲ خارچه در صفحات فوق دهانی



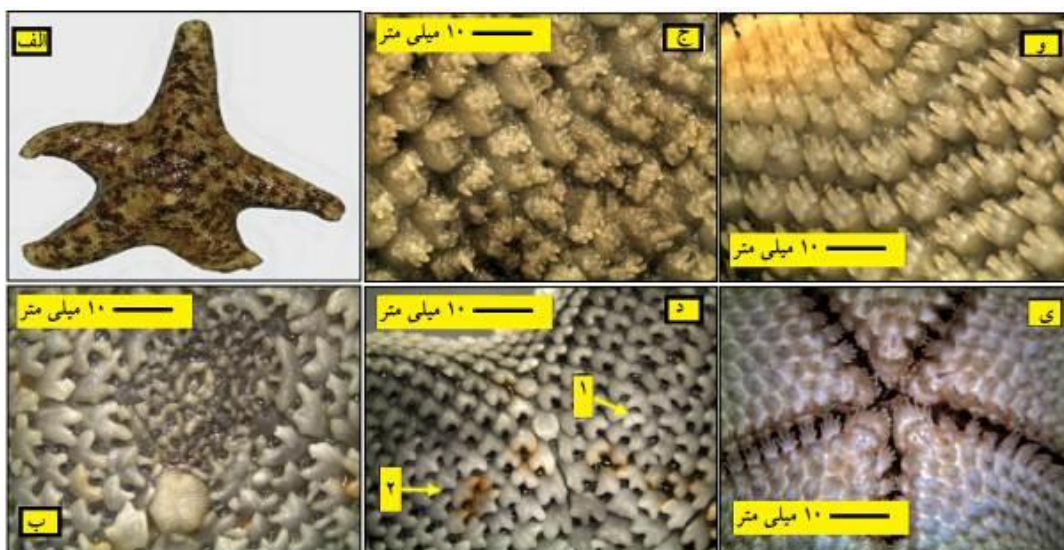
شکل ۳: *Luidia hardwicki*. الف، سطح فوق دهانی. ب، سطح دهانی. ج، (۱) پاهای لوله‌ای. د) صفحات حاشیه فوقانی پوشیده شده از پاکسیلا. و، (۱) صفحات حاشیه تحتانی. (۲) خارچه‌ها در بخش شکمی. ی، (۱) خارهای ساب آمبولاکرال. (۲) خارهای فارو



شکل ۴: *Aquilonastra iranica*. الف، سطح فوق دهانی. ب، سطح دهانی. ج، خارچه‌های صفحات فوق دهانی. د، خارچه‌های صفحات دهانی. و، صفحات حاشیه فوقانی در لبه سطح فوق دهانی. ی، پاپولای مضاعف در یک صفحه کارینال و فقدان صفحات ثانویه

خارها یا برجستگی‌های ساب آمبولاکرال به وسیله گرانول‌ها از خارهای فارو جدا می‌شوند. خارهای فارو در دو اندازه با طول غیر یکسان دیده می‌شوند. رنگ آبی با لکه‌های سبز است (شکل ۶).
Linckia sp. دارای ۵ بازو و نسبت $R/r=47/5$ میلی‌متر. این گونه هم دارای ۲ مادریورایت می‌باشد و از لحاظ گرانول‌ها، خارهای فارو و ساب آمبولاکرال با گونه *laevigata* مشابه است. رنگ در نمونه‌های زنده نارنجی با لکه‌های سبز می‌باشد (شکل ۷).

Linckia laevigata Linnaeus, 1758: تعداد بازوها ۵-۶ عدد با نسبت $R/r=45/5$ میلی‌متر. این ستاره‌های دریایی دارای دیسک کوچک و ۲ مادریورایت می‌باشند. بازوها لوله‌ای و در انتها کند هستند. همه صفحات در سطح دهانی و فوق دهانی با گرانول‌ها پوشیده می‌شوند. دارای ۵ تا ۱۵ منفذ در سطح فوق دهانی هستند که این منافذ در صفحات حاشیه فوقانی و تحتانی بزرگ‌تر از صفحات دیگر است و گرانول‌ها در بخش‌های متورم بزرگ‌تر از بخش‌های فرورفته است.



شکل ۵: *Aquilonastra watersi*. الف، سطح فوق دهانی. ب، مادرپورایت. ج، خارچه‌های صفحات فوق دهانی. د، (۱) صفحات ثانویه. (۲) پاپولای مضاعف در یک صفحه کارینال. و، خارچه‌های صفحه دهانی. ی، خارهای دهانی، زیردهانی، فارو و ساب آمبولاکرال



شکل ۶: *Linckia laevigata*. الف، سطح فوق دهانی. ب، سطح دهانی. ج، مادرپورایت. د، (۱) نواحی منفذدار. (۲) گرانول‌ها. و، (۱) خارهای ساب آمبولاکرال. (۲) خارهای فارو. ی، خارهای فوق دهانی

فوقانی و تحتانی مشابه به یکدیگرند. صفحات امبولاکرال دارای ۸ خار فارو بلند و باریک‌اند که میانی‌ها بزرگ‌تر از خارهای دیگر است. این صفحات دو یا سه خار ساب آمبولاکرال با طول غیرمساوی را در برمی‌گیرند. صفحات دهانی دارای ۱۲ خار فارو می‌باشند که به سمت دهان طول‌شان افزایش می‌یابد و سه یا چهار خار ساب آمبولاکرال بزرگ دارند (شکل ۸).

Pentaceraster mammillatus Audouin, 1826: دارای ۵ بازوی توسعه یافته با نسبت $R/r=150/60$ میلی‌متر. صفحات در ردیف‌های منظم در سطوح دهانی و فوق دهانی قرار دارند. نمونه‌هایی که بیش‌تر خاردار شده‌اند، دارای خارهایی هستند که در پایه منقبض‌اند و در نوک برآمده‌اند. در نمونه‌هایی که خار کم‌تری دارند، خارهای جانبی کوچک‌تر از خارهای بخش کارینال هستند. سطوح دهانی با گرانول‌های مدور و چندوجهی پوشیده شده است. صفحات حاشیه



شکل ۷: *Linckia* sp. الف، سطح فوق دهانی. ب، سطح دهانی. ج، مادرپورایت. د، (۱) خارهای آمبولاکرال. (۲) خارهای فارو



شکل ۸: *Pentaceraster mammillatus*، الف، سطح فوق دهانی. ب، سطح دهانی. ج، صفحات حاشیه فوقانی و تحتانی. د، گرانول‌ها در سطح دهانی. و، (۱) خارهای ساب آمبولاکرال (۲) خارهای فارو در صفحات ادآمبولاکرال. ی، (۱) خارهای فارو و (۲) خارهای ساب آمبولاکرال در صفحات دهانی

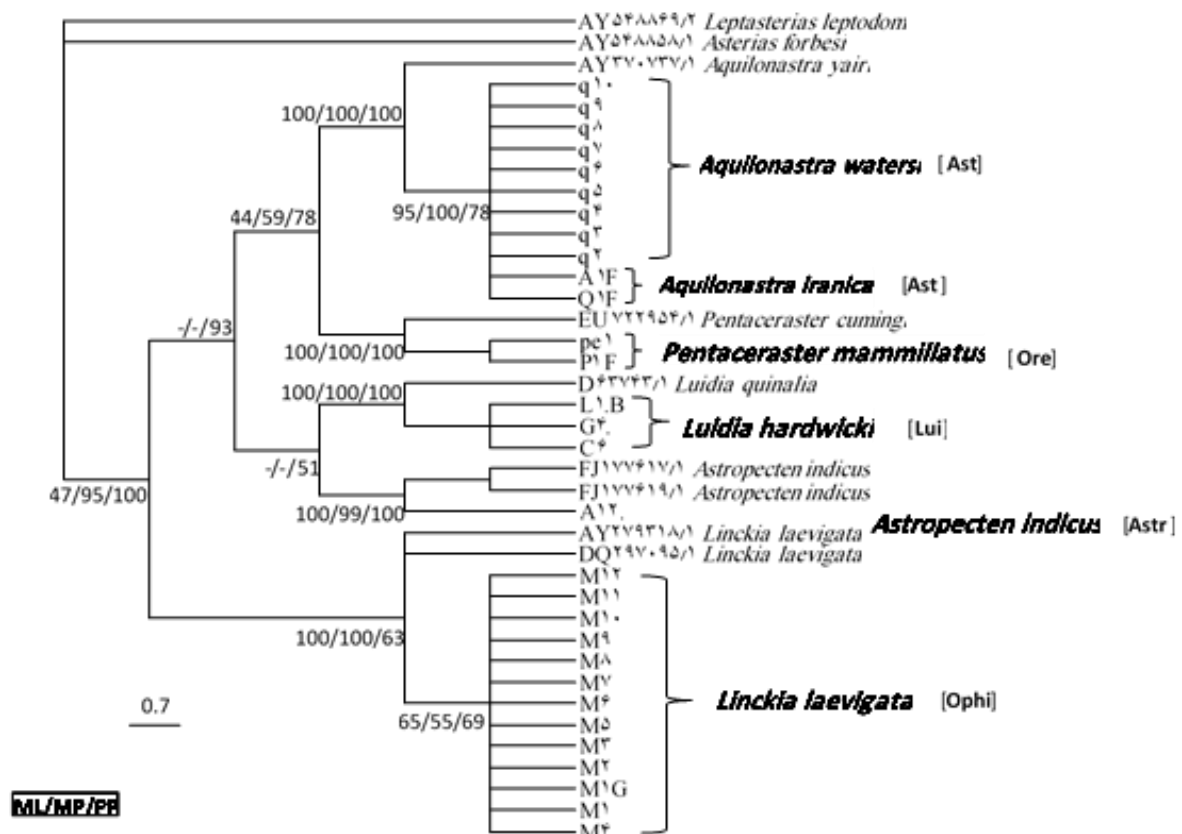
ژنی گزارش شد. توالی A12 با توالی‌های *Astropecten indicus* (FJ177617 و FJ177619) از آب‌های پاکستان و تایلند به‌طور کامل منطبق نیستند اما با ارزش بوت استرپ $MP=0.99$ و $ML=0.100$ و احتمال پسین ۱۰۰٪ در یک گروه خواهری قرار گرفتند و احتمال دارد این نمونه، گونه *Astropecten indicus* باشد. توالی‌های q2-q10 و A1F و Q1F با گونه *Aquilonastra yairi* (AY3707371) $ML=0.100$ و $MP=0.100$ و $PP=0.100$ به‌طور کامل منطبق نیستند اما در یک

شناسایی مولکولی: توالی‌های قطعه ژنی 16S از ۳۰ نمونه Asteroid جمع‌آوری شده از جزایر شمالی خلیج فارس، به‌دست آمد. نتایج شناسایی توالی‌های C6، G4 و L1B نشان داد این گونه با ارزش بوت استرپ $MP=0.100$ و $ML=0.100$ و احتمال پسین ۱۰۰٪ با گونه *Luidia quinaria* (D63743) از آب‌های ژاپن گروه خواهری تشکیل داد. گزارشی در بانک ژنی از توالی 16S گونه *Luidia hardwicki* وجود نداشت و این گونه برای اولین بار با قطعه ژنی 16S در بانک

داده‌اند. دو جنس *Aquilonastra* (از خانواده Asterinidae) و *Pentacaster* (از خانواده Oreasteridae) که هر دو مربوط به راسته Valvatida می‌باشند، با احتمال بوت استرپ $ML=0.44$ و $MP=0.59$ و احتمال پسین 78% در یک گروه خواهری قرار می‌گیرند. در درخت *Luidia* و *Maximum parsimony* و *Maximum Likelihood* و *Astropecten* که مربوط به دو خانواده *Luidiidae* و *Astropectinidae* و هر دو از راسته Paxillosida می‌باشند در یک شاخه قرار نمی‌گیرند و مونوفیلیک نیستند. اما این دو خانواده در درخت Bayesian، با احتمال پسین متوسط 51% در یک شاخه قرار می‌گیرند و مونوفیلیک هستند. شاخه *Pentacaster+Aquilonastra* و شاخه *Astropecten+Luidia* با احتمال پسین 93% تشکیل یک گروه خواهری را می‌دهند. جنس *Linckia* از خانواده Ophidiasteridae با ارزش بوت استرپ $ML=0.47$ و $MP=0.95$ و احتمال پسین 100% با گروه Valvatida و Paxillosida (*Astropecten + Luidia + Pentacaster+Aquilonastra*) در یک گروه خواهری قرار می‌گیرند.

گروه خواهری قرار گرفتند. توالی‌های M1-M12 و M1G با توالی‌های *Linckia laevigata* با حمایت ارزش بوت استرپ $ML=0.100$ و $MP=0.100$ و احتمال پسین 63% با *Linckia laevigata* AY279318 و DQ297095 از آب‌های هند به‌طور کامل منطبق نبود و در یک گروه خواهری قرار گرفت و احتمال دارد این توالی‌ها گونه *Linckia laevigata* باشد. توالی‌های P1F و pe1 با حمایت بوت استرپ $ML=0.100$ و $MP=0.100$ و احتمال پسین 100% با گونه *Pentacaster cumingi* EU722954 در یک گروه خواهری قرار گرفت. گزارشی از ژن 16S گونه *Pentacaster mammillatus* در بانک ژنی وجود نداشت و این گونه برای اولین بار گزارش شد.

روابط فیلوژنتیک در سطح جنس و خانواده: همان‌گونه که در شکل ۹ مشاهده می‌شود، ۵ جنس *Pentacaster*، *Aquilonastra*، *Luidia*، *Astropecten* و *Linckia* که از دو راسته Valvatida و Paxillosida و فوق شاخه Valvatacea می‌باشند، در مقابل برون گروه‌هایی از فوق شاخه Forcipulatacea تشکیل یک گروه مونوفیلیک



شکل ۹: درخت فیلوژنی گونه‌های asteroid براساس ژن rRNA 16S. اعداد در هر شاخه به ترتیب نشان‌دهنده سه روش maximum likelihood، maximum parsimony و Bayesian می‌باشد. جهت مقایسه با رده‌بندی پیشین، نام خانواده هر گونه در کنار آن به صورت مخفف نشان داده شده است. (Asterinidae، Ore؛ Oreasteridae، Ophi؛ Ophidiasteridae، Lui؛ (Valvatidan) Paxillosidan) Astropectinidae، Astr؛ Luidiidae، Lui؛ (Valvatidan) Ophidiasteridae، Ophi؛ Oreasteridae، Ore؛ Asterinidae، Ast).

بحث

انطباق ویژگی‌های مورفولوژیک و شناسایی مولکولی: ۶ گونه

ستاره دریایی *Luidia hardwicki*, *Astropecten indicus*, *Linckia laevigata*, *Aquilonastra iranica*, *Aquilonastra watersi* و *Pentaceraster mammillatus* ابتدا با استفاده از ویژگی‌های مورفولوژیک و سپس براساس مولکولی شناسایی شدند و روابط بین تاکسون‌ها در سطح جنس و خانواده در آنالیز فیلوژنی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نمونه‌های جنس *Luidia* به دلیل داشتن طول خارهای حاشیه تحتانی برابر با طول دو صفحه متوالی حاشیه تحتانی است. به عنوان گونه *Luidia hardwicki* شناسایی شد. این ویژگی وجه تمایز گونه *Luidia hardwicki* با گونه‌هایی مانند *Luidia quinaria* است که دارای فواصل ژنتیکی نزدیک به یکدیگر می‌باشند.

نمونه‌های جنس *Linckia* در فرم رنگی سبز-آبی (M1-M4) و دارای بازوهای کوتاه و ۲ عدد مادرپورایت در سطح فوق دهانی‌شان می‌باشند. ستاره‌های فرم نارنجی-سبز (M5-M12)، دارای بازوهای طویل تری نسبت به فرم سبز-آبی بودند و تعداد مادرپورایت آن‌ها هم مشابه فرم سبز-آبی ۲ عدد بود. بدین ترتیب ویژگی‌های مورفولوژیک نمی‌توانست نشان‌دهنده نوع گونه باشد. آنالیزهای مولکولی نشان داد همه توالی‌های جنس *Linckia* با توالی‌های *Linckia laevigata* AY279318 و DQ297095 در یک گروه خواهری قرار می‌گیرند. William به دلیل تنوع رنگ و الگوی رنگی در گونه *laevigata Linckia* این گونه را به عنوان یک گونه اکوفنوتایپ عنوان کرد (۱۰). گونه‌ای که صفات مورفولوژیک آن با تغییر زیستگاه‌اش تغییر می‌کند. به هر حال برخی شواهد نشان می‌دهد که رنگ ممکن است به وسیله فاکتورهای زیست محیطی مثل شدت نور یا دمای آب تحت تاثیر قرار گیرد. به عنوان مثال Strong نشان داد *laevigata* قهوه‌ای نسبت به فرم آبی-سبز در اعماق بیش‌تر اتفاق می‌افتد و تحمل کم‌تر نسبت به دماهای بالاتر آب را نشان می‌دهد. از طرفی شکل آبی-سبز *laevigata* در بسترهای کم عمق و سطحی بین ۱ تا ۲ متر رایج است. جایی که دمای آب و نور مستقیم خورشید خارج از محدوده تحمل بسیاری از گونه‌هاست. نمونه‌هایی که شامل فرم آبی-سبز نمی‌شوند، در آب‌های عمیق‌تر بین ۵ تا ۲۱ متر جمع‌آوری می‌شوند. در مطالعه کنونی، از آنجایی که نمونه‌های سبز-آبی از بخش میانی مناطق جزر و مدی نمونه‌برداری شدند و نمونه‌های نارنجی با لکه‌های سبز از بخش پایینی مناطق جزر و مدی جمع‌آوری شدند، این نتایج تا حدودی با نتایج مطالعات قبل هم‌خوانی دارد.

نمونه‌های *Aquilonastra* به شکل طوسی‌رنگ در دو فرم لکه‌های سبز و قرمز مشاهده شدند و از لحاظ خصوصیات مورفولوژیک به عنوان گونه *Aquilonastra watersi* شناسایی شدند. دو نمونه A1F و Q1F در ویژگی‌های مورفولوژیک، تفاوت‌هایی با بقیه نمونه‌ها داشتند. این دو نمونه فاقد صفحات ثانویه‌اند و هم‌چنین در فرم و تعداد خارچه‌های سطح پشتی با بقیه نمونه‌ها متفاوت بودند. این ویژگی‌ها مربوط به گونه *Aquilonastra iranica* است. اما در شناسایی مولکولی تفاوتی در توالی‌هایشان مشاهده نشد.

تمام نمونه‌های گروه مورفولوژیک *Aquilonastra watersi* در مطالعه حاضر در درخت‌های فیلوژنی با گونه *Aquilonastra yairi* AY370752 منطبق بودند و در یک گروه قرار گرفتند. در سال ۲۰۰۴، توالی ژن 16S گونه *Aquilonastra yairi* با نام *Asterina burtoni* در بانک ژنی ثبت شده است. *Asterina burtoni* شامل یک سری گونه‌های هم‌نوع هستند که از مناطق جغرافیایی مختلفی می‌باشند (Y) و دارای خصوصیات مورفولوژیکی مخصوص به خود هستند. Clark و Rowe گونه‌های *Asterina burtoni* و *Asterina cephea* را که نام قدیم *Aquilonastra watersi* است، یک مترادف بیان کردند (۱۴). در واقع Clark و Rowe نمونه‌هایی با spinlet با لبه شفاف که از هند شرقی و فیلیپین بودند را مربوط به گونه‌های *A. cephea* دانستند و نمونه‌هایی که spinlet‌هایشان ناشفاف بودند، و از دریای سرخ، مدیترانه و افریقا و خلیج فارس بودند را به گونه *A. burtoni* منسوب کردند.

آنالیز فیلوژنی: در مطالعات مختلف مربوط به فیلوژنی Asteroidها همواره دو موضوع مورد بحث بوده است: (۱) ریشه‌دهی Asteroidها (۲) رده‌بندی راسته Paxillosida. در ارتباط با ریشه‌دهی Asteroidها بحث فراوانی در مورد ریشه‌دهی خارج گروه توسط Foltz و همکاران انجام شده است (۲۴). در مطالعات فیلوژنی قبل زمانی که ریشه یکی از گروه‌های Echinoderm قرار داده می‌شد، هر کدام از شاخه‌های Valvatida، Paxillosida یا Forcipulatida به‌طور متفاوت در کنار ریشه قرار گرفته‌اند. این نتایج متفاوت می‌تواند به دلیل نرخ ناهم‌انگهی (heterogeneity) ژن‌ها یا دودمان‌هایی باشد که از تاکسون‌های موجود در مطالعات مختلف در یک درخت قرار می‌گیرند و یا می‌تواند به دلیل عدم حضور یک گروه خواهری نزدیک به Asteroidها باشد (۴). Mah و Foltz در مطالعه‌ای که در رده‌بندی Valvatacea انجام دادند، این فوق‌راسته را در مقابل فوق‌راسته Forcipulatacea ریشه‌گذاری کردند (۴). در تحقیق حاضر همان‌طور که Mah و Foltz پیشنهاد کردند، در درخت فیلوژنی 16S rRNA، ۵ جنس که مربوط به فوق‌شاخه Valvatacea هستند، در مقابل فوق‌راسته Forcipulatacean ریشه داده شده است (۴). نتایج به‌دست آمده در درخت 16S rRNA، نشان می‌دهد هر ۵ جنس در روابط فیلوژنی با درخت Mah و Foltz به

در این مطالعه گونه‌های *Luidia hardwicki*، *Astropecten* و *Aquilonastra iranica*، *Aquilonastra watersi*، *indicus* و *Pentaceraster mammillatus* با استفاده از خصوصیات مورفولوژیک شناسایی و براساس شناسایی مولکولی تایید شدند. گونه *Linckia laevigata* در فرم رنگی نارنجی با لکه‌های سبز در آنالیزهای مولکولی تعیین شد که این موضوع اهمیت آنالیزهای مولکولی را در ستاره‌های دریایی نشان می‌دهد. روابط بین تاکسون‌ها در رده Asteroidea براساس قطعه ژنی 16S با توجه به میزان نرخ تکاملی مناسب، با مطالعات پیشین در ارتباط با نتایج آنالیزهای فیلوژنتیک Asteroidها، هم‌خوانی دارد. تایید این نتایج با انجام نمونه‌برداری از دیگر گونه‌های احتمالی و استفاده از تاکسون‌های بیش‌تر در آنالیزهای فیلوژنی و استفاده از ژن‌های کدکننده پروتئین‌های هسته‌ای با نرخ تکاملی آهسته‌تر و دیگر ژن‌های میتوکندریایی به بررسی‌های بیش‌تری نیاز دارد.

منابع

1. **Rahman, M.A., Molla M.H.R., Megwalu, F.O., Asare, O.E., Tchound, A. and Shaikh, M.M., 2018.** The Sea Stars (Echinodermata: Asteroidea): Their Biology, Ecology, Evolution and Utilization. SF J Biotechnol Biomed Eng. 1(2): 1-8.
2. **Mah, C.L. and Blake, D.B., 2012.** Global Diversity and Phylogeny of the Asteroidea (Echinodermata). PLoS ONE. 7: e35644.
3. **Knott, K.E. and Wray, G.E., 2000.** Controversy and consensus in asteroid systematics: new insights to ordinal and familial relationships. Amer. Zool. 40: 382-392.
4. **Mah, C.L. and Foltz, D.W., 2011.** Molecular Phylogeny of the Valvatacea (Asteroidea, Echinodermata). Zool. J. Linn. Soc. 161: 769-788.
5. **Zulliger, D.E. and Lessios, H.A., 2010.** Phylogenetic relationships in the genus *Astropecten* Gray (Paxilloidea: Asteropectinidae) on a global scale: molecular evidence for morphological convergence, species-complexes and possible cryptic speciation. Zootaxa. 2504: 1-19.
6. **Ning, X., Ruiyu, L., Shuai, Y. and Zhongli, S., 2013.** A preliminary phylogenetic analysis of *Luidia* (Luidiidae) from Chinese waters with Cytochrome Oxidase Subunit I (COI) sequences. J. Ocean Univ. China. 12: 459-468.
7. **Waters, J.M., O'Loughlin, P.M. and Roy, M.S., 2004.** Molecular systematics of some Indo-Pacific asterinids (Echinodermata, Asteroidea): does taxonomy reflect phylogeny. Mol. Phylogenet. Evol. 30: 872-878.
8. **Bhakuni, D.S. and Rawat, D.S., 2005.** Bioactive Marine Natural Products. Anamaya Publishers, New Delhi, India. 365 p.
9. **Tang, H.F., Yi, Y.H., Li, L., Sun, P., Zhang, S.Y. and Zhao, Y.P., 2005.** Three New Asterosaponins from the Starfish *Calcita novaeguineae* and their Bioactivity. Planta. Med. 71: 458-463.
10. **Williams, S.T., 2000.** Species boundaries in the starfish genus *Linckia*. Mar. Biol. 136: 137-148.

صورت گروه‌بندی Paxilloidea+Valvatida شبیه‌است (۴). این نتایج با نتایج حاصل از روابط بین تاکسون‌ها در رده‌بندی فیلوژنتیک Valvatacea که توسط Blake پیشنهاد شده است (۲۵)، هم‌خوانی دارد. رده‌بندی راسته Paxilloidea موردی دیگر است که در مطالعات فیلوژنی Asteroidها، مورد توجه بوده است. بسیاری از این مطالعات، از یک Paxilloidea مونوفیلیتیک حمایت نکردند (۳، ۲۶ و ۲۷). برخی از آن‌ها هم از این موضوع حمایت کردند (۲۸، ۲۹ و ۳۰) اما نمونه‌برداری از تاکسون‌های محدود دارند. فیلوژنی فوق راسته Valvatacea را Mah و Foltz براساس ژن‌های 16S rRNA، 12S rRNA و H3 و با روش Maximum likelihood انجام دادند (۴) که نتایج آن حمایت از مونوفیلی راسته Paxilloidea بود.

در تحقیق حاضر، درخت فیلوژنی 16S rRNA، براساس سه روش Maximum parsimony، likelihood Maximum و Bayesian آنالیز شد. راسته Paxilloidea، به‌عنوان بخشی از شاخه Valvatida که شامل خانواده Asterinidae (جنس *Aquilonastra*) و Oreasteridae (جنس *Pentaceraster*) است، قرار گرفته است. گروه‌بندی درون راسته Paxilloidea شامل گروه خواهری دو خانواده Astropectinidae (جنس *Astropecten*) و Luidiidae (جنس *Luidia*) می‌باشد. نتایج نشان دادند دو جنس *Astropecten* و *Luidia* از دو خانواده Astropectinidae و Luidiidae براساس روش Bayesian در یک شاخه قرار گرفته‌اند و Paxilloidea مونوفیلیتیک می‌باشد. روش Maximum parsimony این دو جنس در یک گروه قرار نگرفتند. اما از گروه Paxilloidea+Valvatida حمایت شد. در روش Maximum likelihood این گروه‌بندی در مقایسه با مطالعه Mah و Foltz با وجود عدم حضور توالی‌های ژن‌های 12S rRNA و H3 و نمونه‌برداری از تاکسون‌های محدود هم‌خوانی دارد (۴). نتایج Mah و Foltz حمایت‌کننده درخت فیلوژنی‌ای است (۴) که توسط Blake براساس ویژگی‌های مورفولوژیک، ارائه شده است (۲۵). Mah و Foltz موقعیت راسته Paxilloidea در درخت فیلوژنی 16S rRNA را به‌عنوان یک گروه basal برای فوق راسته Valvatacea و رابطه اشتقاقی آن را نسبت به شاخه Ophidiasteridae دانستند (۴). گروه‌بندی توالی 16S rRNA راسته Valvatidaها که شامل سه خانواده Asterinidae (جنس *Aquilonastra*)، Oreasteridae (جنس *Pentaceraster*) و Ophidiasteridae (جنس *Linckia*) است، دارای شباهت‌هایی با تحقیق Mah و Foltz (۴) است. خانواده Asterinidae و Oreasteridae در یک گروه قرار گرفتند. خانواده Ophidiasteridae به‌دلیل ویژگی مورفولوژیک بازوی سیلندری و دیسک کوچک که شبیه به خانواده Mithrodiidae است، در شاخه‌ای مجزا از دو خانواده Asterinidae و Oreasteridae قرار می‌گیرد.

30. **Yasuda, N., Nagai, S., Hamaguchi, M., Okaji, K. and Gerard, K., 2009.** Gene flow of *Acanthaster planci* (L.) in relation to ocean currents revealed by microsatellite analysis. *Mol. Ecol.* 18: 1574-1590.
11. **Mortensen, T. and Heding, S.G., 1940.** Echinoderm from the Iranian Gulf. In *Danish scientific investigation in Iran, Part II.* Copenhagen: Einar Munksgaard. 55-137.
12. **Price, A.R.G., 1981.** Studies on the echinoderm fauna of the western Arabian Gulf. *J. Nat. His.* 15: 1-15.
13. **Pourvali, N., 2015.** Intertidal echinoderms (Asteroidea, Echinoidea, Ophiuroidea) from Hormuz island in the strait of Hormuz (Persian Gulf, Iran). *Mar. Biodivers. Rec.* 8: e50.
14. **Clark, A.M. and Rowe, F.W.E., 1971.** Monograph of Shallow-water Indo-West Pacific Echinoderms. London: British Museum (Natural History). 238 p.
15. **Walsh, P.S., Metzger, D.A. and Higuchi, R., 1991.** Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing of forensic material. *Biotechniques.* 10: 506-513.
16. **Baker, A.C., 1999.** The symbiosis ecology of reef-building corals. PhD thesis. University of Miami. 120 p.
17. **Waters, J.M., O'Loughlin, P.M. and Roy, M.S., 2004.** Cladogenesis in a starfish species complex from southern Australia: evidence for vicariant speciation? *Mol. Phylogenet. Evol.* 32: 236-245.
18. **Thompson, J.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 Res.* 22: 4673-4680.
19. **Nylander, J., 2004.** MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, 2.
20. **Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K., 2016.** MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0. *Mol. Biol. Evol.* 33: 1870-1874.
21. **Swofford, D.L., 2002.** PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and other methods). Version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
22. **Ronquist, F. and Huelsenbeck, J.P., 2003.** MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics.* 19: 1572-1574.
23. **Strong, R.D., 1975.** Distribution, morphometry, and thermal stress studies on two forms of *Linckia* (Asteroidea) on Guam. *Micronesica.* 11: 167-183.
24. **Foltz, D.W., Bolton, M.T., Kelley, S.P. and Kelley, B.D., 2007.** Combined mitochondrial and nuclear sequences support the monophyly of forcipulatacean sea stars. *Mol. Phylogenet. Evol.* 43: 627-634.
25. **Blake, D.B., 1987.** Classification and phylogeny of post-Paleozoic sea stars (Asteroidea: Echinodermata). *J. Nat. Hist.* 21: 481-528.
26. **Matsubara, M., Komatsu, M., Araki, T., Asakawa, S. and Yokobori, S., 2005.** The phylogenetic status of Paxillosida (Asteroidea) based on complete mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 36: 598-605.
27. **Wada, H., Komatsu, M. and Satoh, N., 1996.** Mitochondrial rDNA phylogeny of the Asteroidea suggests the primitiveness of the Paxillosida. *Mol. Phylogenet. Evol.* 6: 97-106.
28. **Lafay, B., Smith, A.B. and Christen, R., 1995.** A combined morphological, and molecular approach to the phylogeny of asteroids. *Syst. Biol.* 44: 190-208.
29. **Matsubara, M., Komatsu, M. and Wada, H., 2004.** Close relationship between Asterina and Solasteridae (Asteroidea) supported by both nuclear and mitochondrial gene molecular phylogenies. *Zool. Sci.* 21: 785-793.