دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست- پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال بیست و چهارم، شماره ۱، صفحه ۸۷-۷۵ (فروردین و اردیبهشت ۱۴۰۰)

Iran South Med J 2021; 24(1): 75-87

شناسایی مولکولی خرگوش دریایی خلیج‌فارس (*Aplysia* sp.) بر اساس توالی ژن 16s rRNA

پروا دهقانی (MSc)[1*]، حسین ذولقرنین (PhD)[1**]، ایرج نبی‌پور (MD)[2]، سهیلا مطرودی (PhD)[1]، محسن محمدی (PhD)[2]

[1] گروه زیست دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران
[2] مرکز تحقیقات زیست فناوری دریایی خلیج‌فارس، پژوهشکده علوم زیست پزشکی خلیج‌فارس، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران

(دریافت مقاله: ۹۹/۹/۲۰ - پذیرش مقاله: ۹۹/۱۰/۱۶)

چکیده

هدف: خرگوش‌های دریایی جنس **Aplysia** از جمله نرم‌تنان مورد توجه محققان مختلف برای بررسی فیلوژنی، ترکیبات شیمیایی زیست فعال و دستگاه عصبی هستند. این نرم‌تنان رژیم غذایی گیاهخواری دارند و به منظور دفاع از خود، ترکیبات شیمیایی (مرکب) تولید می‌کنند. تحقیق حاضر به شناسایی مولکولی خرگوش دریایی خلیج‌فارس (شهرستان بوشهر) با استفاده از توالی ژن **16s rRNA** پرداخته است.

مواد و روش‌ها: نمونه‌برداری از سواحل شهرستان بوشهر صورت گرفت. **DNA** کل با روش **CTAB** استخراج شد و **DNA** هدف با پرایمرهای یونیورسال **16sar-L** و **16sbr-H** تکثیر گشت. برای تحلیل‌های فیلوژنی از دو روش بیشینهٔ درست‌نمایی و **Bayesian** (به‌ترتیب با نرم‌افزارهای **RAxML** و **Mr Bayes**) استفاده شد. برای الگوریتم **ML**، ۱۰۰۰ تکرار بوت استراپ تولید شد. در روش **Bayesian** نیز برنامه برای ۲۰ میلیون نسل اجرا و برای هر ۱۰۰۰ نسل یک درخت نمونه‌برداری شد.

یافته‌ها: بر اساس درخت حاصل از روش **Maximum Likelihood**، خرگوش دریایی خلیج‌فارس و ***Aplysia dactylomela*** با ۸۷ درصد بوت استراپ و احتمال پسین بالا (PP=۱) در یک کلاد قرار گرفتند. درخت فیلوژنی به دست آمده از روش **Bayesian** نیز توپولوژی مشابهی نشان داد و در این روش نیز گونهٔ خلیج‌فارس با ۹۵/۸ درصد بوت استراپ و احتمال پسین ۱ در گروه خواهری ***A. dactylomela*** حمایت شد.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از آنالیز مولکولی توالی ژن **16S rRNA** نشان دهندهٔ وجود یک گونهٔ احتمالاً جدید از خرگوش‌های دریایی در منطقهٔ خلیج‌فارس است، اما به منظور گزارش قطعی موقعیت گونهٔ حاضر، انجام آنالیزهای فیلوژنی با استفاده از ژن **COI** و همچنین ویژگی‌های مورفولوژیک گونه لازم است.

واژگان کلیدی: خرگوش دریایی، **Aplysia**، خلیج‌فارس، فیلوژنی مولکولی، **16s rRNA**

** خرمشهر، گروه زیست دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران

Email: zolgharnein@kmsu.ac.ir
***ORCID: 0000-0002-2105-7546**
****ORCID: 0000-0001-5944-3349**

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-10-12]

[DOI: 10.52547/ismj.24.1.78]

مقدمه

خلیج‌فارس بخشی از منطقهٔ هند –اقیانوس آرام بوده و از طریق تنگهٔ هرمز به دریای عمان و اقیانوس هند متصل می‌گردد (۱). اقلیم گرمسیری، نوسانات بالای دمای آب در طول سال، نرخ بالای تبخیر در فصول گرم و تماس آبی محدود با دریاهای آزاد سبب شده که استرس‌های شدیدی برای موجودات این منطقه وجود آید؛ انتظار می‌رود که این استرس‌ها منجر به گونه‌زایی گسترده‌ای در خلیج‌فارس شده باشند (۲). یکی از موجودات جالب دریایی از لحاظ فیلوژنی، خرگوش دریایی خلیج فارس می باشد.

خرگوش‌های دریایی جنس Aplysia (شکم‌پایان: اپیستوبرانش‌ها) گروهی از شکم‌پایان بدون صدف با سایز بدن نسبتاً بزرگ در مقایسه با سایر نرم‌تنان هستند. همانند اپیستوبرانش‌ها، خرگوش‌های دریایی مرحلهٔ لاروی پلانکتونی دارند، اما در زمان بلوغ صرفاً توانایی‌های محدود خزیدن و شنا کردن دارند (۳). خرگوش‌های دریایی در مناطق ساحلی آب‌های گرمسیری و نیمه‌گرمسیری سراسر جهان زندگی می‌کنند. این جانوران گیاهخوارانی هرمافرودیت هستند که اکثراً از ماکروجلبک‌ها تغذیه می‌کنند، اما در برخی از موارد از کلنی‌های سیانوباکتر نیز تغذیه دارند. معمولاً در فاصلهٔ بین بهار و پاییز تخم‌گذاری کرده و توده‌های تخم را بر روی سطوح سنگی و جلبکی می‌گذارند (۴). خرگوش‌های دریایی دو ویژگی قابل توجه دارند که موضوع تحقیقات زیادی بوده اند. اول، خرگوش‌های دریایی یک دستگاه عصبی منحصر به فرد دارند. این موجودات نورون‌های بزرگی داشته (محدودهٔ اندازه: ۱–۰/۱ میلی‌متر) که انجام مطالعات سلولی بر روی برخی از رفتارهای فردی همچون حافظه، یادگیری و همچنین بررسی مسیرهای سیناپسی را ممکن می‌کند (۵). دوم، از آنجا که خرگوش‌های دریایی فاقد صدف خارجی هستند، از مکانیسم‌های دفاعی مختلفی همچون دفاع شیمیایی (با تجمع سموم از رژیم غذایی یا سنتز ترکیبات سمی جدید) یا استتار استفاده می‌کنند (۶). مطالعات متعددی بر روی مرکب تولید شده توسط خرگوش‌های دریایی صورت گرفته و مشخص شده که ترکیبات زیست فعال متعددی با خواص دارویی در مرکب وجود دارند (۱۱–۷). با این وجود، قبل از ارائهٔ هرگونه گزارش علمی در مورد یک گونهٔ خاص، لازم است موقعیت تاکسونومیک آن گونه به‌طور دقیق مشخص شود.

از مارکرهای مولکولی مانند DNA میتوکندریایی (mtDNA) به‌طور گسترده برای طبقه‌بندی سیستماتیک خرگوش‌های دریایی استفاده شده است (۱۳–۱۲)، زیرا طبقه‌بندی سیستماتیک این موجودات تنها بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی (همچون شکل بدن، ساختار رادولا و زائدهٔ پنیس) به دلیل هموپلازی بالا کافی نیست (۱۴). این مارکرها شامل ژن‌های ریبوزومی (12S، 16Sو ..) و ژن زیر واحد ۱ سیتوکروم اکسیداز (CO1) بوده از جمله ژن‌های شدیداً حفاظت شده در طول تکامل هستند.

مدینا (Medina) و همکاران، مطالعات متفاوتی بر روی سیستماتیک مولکولی و روابط فیلوژنتیک میان خرگوش‌های دریایی در اطراف دنیا انجام داده‌اند (۳، ۱۳ و ۱۵). در مطالعهٔ حاضر، از این مراجع برای بررسی موقعیت دقیق خرگوش دریایی خلیج‌فارس در درخت فیلوژنتیک خرگوش‌های دریایی استفاده گردید.

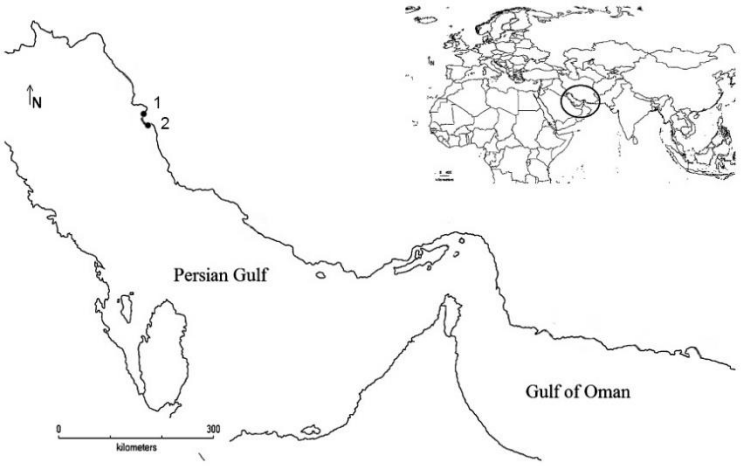
مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری: نمونه‌برداری در اردیبهشت‌ماه و از عمق پنج متری اسکلهٔ جفره، شهرستان بوشهر، استان بوشهر

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-10-12]

[DOI: 10.52547/ismj.24.1.78]

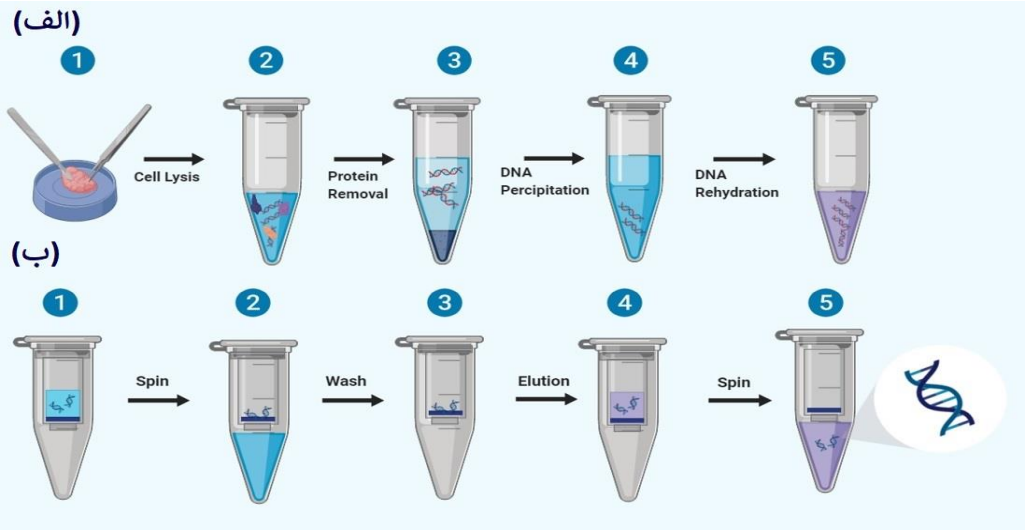
با طول جغرافیایی "۴۳ '۸۲ °۵۰ شرقی و عرض جغرافیایی "۱۸ '۹۷ °۲۸ شمالی صورت گرفت (شکل ۱، سایت ۱). نمونه‌های خرگوش دریایی جمع‌آوری و به آزمایشگاه بیوتکنولوژی پژوهشکدهٔ زیست فناوری دانشگاه علوم پزشکی بوشهر منتقل شدند. قبل از تشریح، نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه بر روی ظرف یخ قرار گرفته و بی‌حس شدند. برای استخراج DNA از بافت عضلهٔ پا استفاده شد و بافت‌ها در اتانول فیکس شدند. در نهایت نمونه‌های بافتی تا زمان انجام آزمایشات در فریز °C ۲۰- نگهداری شدند.



شکل ۱) نقشه محل نمونه‌برداری تهیه شده با نرم‌افزار Diva-GIS
Fig 1) Map of sampling site, prepared with Diva-GIS.

استخراج DNA: برای استخراج DNA از روش CTAB استفاده شد (۱۶): ابتدا ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت عضلانی با استفاده از یک تیغ اسکالپل استریل به قطعات ریز برش خورد و سپس ۵۰۰ µl بافر لیز (۲µl بتا-مرکاپتواتانول و ۱ml بافر CTAB [۱۰ درصد تریس بازی ۱ مولار، ۲۸ درصد NaCl ۵ مولار، ۴ درصد EDTA ۰/۵ مولار و ۳ درصد محلول CTAB]) به میکروتیوب اضافه شد. به منظور بهبود فرایند لیز سلول، ۲۰ µl آنزیم پروتئیناز k به مخلوط اضافه و میکروتیوب به مدت یک شب در دمای °C ۳۷ (دمای بهینه برای فعالیت آنزیم) شیک شد. پس از هضم کامل بافت، ۵۰۰ µl کلروفورم/ ایزوآمیل الکل به میکروتیوب اضافه و به مدت ۱ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. سپس مخلوط به مدت ۹ دقیقه در دمای °C ۴ و سرعت ۱۴۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. سوپرناتانت حاصل به یک میکروتیوب جدید منتقل شده و به اندازهٔ ۰/۷ از حجم آن ایزوپروپانول سرد اضافه شد. پس از گذشت ۱۵ دقیقه در فریزر °C ۲۰-، نمونه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای °C ۴ و سرعت ۱۴۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. پلت حاصل با ۵۰۰ µl اتانول ۷۰ درصد شستشو شد و تا زمان خشک شدن الکل، میکروتیوب بر روی یک کاغذ صافی استریل قرار گرفت. در نهایت ۲۰ µl بافر TE به میکروتیوب اضافه شد. بمنظور درک بهتر مراحل مختلف فرایند استخراج به شکل ۲ (الف) مراجعه شود.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-10-12]
[DOI: 10.52547/ismj.24.1.78]



شکل ۲) نمای شماتیک مراحل مختلف (الف) فرایند استخراج DNA با استفاده از CTAB؛ (ب) تخلیص DNA با استفاده از ستون

Fig 2) Schematic view of different steps of (a) DNA extraction process using CTAB; (b) DNA purification using commercial columns

به دلیل حضور مقادیر بالای رنگدانه و کربوهیدرات در بافت جانوران دریایی، محلول به‌دست آمده از ستون تخلیص DNA نیز عبور کرد تا میزان آلودگی بافتی به حداقل برسد. مراحل تخلیص DNA با استفاده از ستون مطابق دستورالعمل شرکت (Favorgen-FAGCK001) انجام شد و نمای شماتیک آن در شکل ۲ (ب) قابل مشاهده است. پس از پایان این مرحله، ۲ µl از نمونه بر روی دستگاه نانودراپ (DeNovix-DS11FX) لود شد و نسبت جذب نوری در طول موج‌های ۲۶۰/۲۸۰ nm قرائت شد. میزان این نسبت نشانگر مناسبی برای بررسی آلودگی نمونهٔ DNA به پروتئین است. لازم به ذکر است که تمامی مراحل در حالت استریل و زیر هود صورت گرفتند.

تکثیر قطعهٔ ژنی با استفاده از PCR: به منظور تکثیر قطعهٔ ژنی 16S rRNA از پرایمرهای مورد استفاده در مطالعهٔ مدینا و والش (Walsh) (۱۳) استفاده شد (جدول ۱). توالی‌های پرایمر توسط شرکت پیشگام سنتز شده و به آزمایشگاه ارسال شدند.

جدول ۱) لیست پرایمرهای مورد استفاده در تحقیق حاضر

نام پرایمر	توالی
16sar-L	5´-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3´
16sbr-H	5´-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3´

تمام مراحل آماده‌سازی مخلوط واکنش به‌صورت استریل، زیر هود و بر روی ظرف یخ انجام شد تا فعالیت آنزیمی به حداقل ممکن برسد و از انجام واکنش ناخواسته جلوگیری شود. پس از آماده‌سازی مخلوط واکنش، میکروتیوب‌ها به دستگاه ترمال سایکلر منتقل و واکنش PCR با شرایط زیر انجام شد (جدول ۲).

جدول ۲) مراحل مختلف واکنش PCR

مرحله	شرایط
واسرشته سازی اولیه	۲ دقیقه، ۹۴ °C
واسرشته‌سازی، الحاق و بسط	۳۰ چرخه: ۳۰ ثانیه، ۹۴ °C؛ ۳۰ ثانیه، ۵۰ °C؛ و ۳۰ ثانیه، ۷۲ °C
بسط نهایی نهایی	۵ دقیقه، ۷۲ °C

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-10-12]
[DOI: 10.52547/ismj.24.1.78]

به منظور تأیید تکثیر قطعهٔ ژنی مورد نظر، محصول واکنش بر روی ژل آگارز ۱ درصد لود شد. پس از حصول اطمینان از کیفیت محصول PCR، باند مورد نظر با استفاده از یک تیغ اسکالپل استریل از ژل جدا شده و برای استخراج بر روی ستون‌های استخراج DNA از ژل آگارز قرار گرفتند. در نهایت نمونه‌های مناسب برای توالی‌یابی به شرکت ماکروژن (کره جنوبی) ارسال و توالی‌های به دست آمده در بانک ژنی NCBI ثبت گردید.

آنالیزهای فیلوژنتیکی: در مطالعهٔ حاضر از روش‌های بایزین (Bayesian) و بیشینه درست‌نمایی (Maximum Likelihood) برای تجزیه و تحلیل توالی‌ها استفاده شده است. جهت انجام آنالیزها، ابتدا کروماتوگرام‌های حاصل از تعیین توالی با استفاده از نرم‌افزار Bioedit (ویرایش ۷/۲) بررسی شدند و نقاط خطا، اصلاح یا حذف گردید. در مرحلهٔ بعدی، به منظور شناسایی اختلاف میان توالی‌ها، نمونه‌های ویرایش شده با نرم‌افزار Locarna (ویرایش ۱. ۲. ۹. ۱) با سایر توالی‌های موجود در بانک ژنی (جدول ۳) هم‌ردیف شده و مدل ساختار ثانویه‌ی 16S آن ترسیم شد. بر اساس مطالعات صورت گرفته توسط مدینا و همکاران (۱۷) در این آنالیزها، گونهٔ *Akera bullata* به عنوان برون‌گروه (گروهی مرجع برای شناسایی روابط خویشاوندی میان موجودات مونوفایلتیک) در نظر گرفته شد.

جدول ۳) نام گونه‌های مورد استفاده در آنالیزهای فیلوژنی، کد دسترسی به توالی ژنی آن‌ها و منابع ثبت کنندهٔ توالی‌ها در بانک ژنی NCBI

نام گونه	Accession number(NCBI)	منبع
Aplysia oculifera	AF192302.1	(۱۷)
A. morio	AF192301.1	
A. kurodai	AF192300.1	
A. gigantea	AF192299.1	
A. fasciata	AF192298.1	
A. dactylomela	AF192297.1	
A. brasiliana	AF192296.1	
A. juliana	AF192292.1	
Akera bullata	AF156127.1	(۱۳)

برای آنالیز فیلوژنی به روش Bayesian (BI)، از برنامهٔ MrBayes ویرایش ۷. ۲. ۳ استفاده شد. تمرکز این روش بر مدل‌های تکاملی است و تمامی مکان‌های جانشینی را بررسی می‌کند. بنابراین پیش از اجرای آنالیزها، با استفاده از نرم‌افزار MEGA6 و بر اساس معیار اطلاعاتی AIC (Akaike Information Criterion)، بهترین مدل تکاملی برای داده‌ی مورد نظر تعیین شد. طبق این آزمون، مدل T92 برای آنالیز داده مورد استفاده قرار گرفت. به منظور کسب توزیع مناسبی از احتمال پسین (Posterior Probability؛ PP)، برنامه برای تجزیه و تحلیل فیلوژنی زنجیرهٔ مارکوف مونت کارلو (Markov Chain Monte Carlo) با سه زنجیره گرم و یک زنجیره سرد تنظیم شد، سپس برنامه برای ۲۰ میلیون نسل اجرا و برای هر ۱۰۰۰ نسل یک درخت نمونه‌برداری شد. پس از تکمیل آنالیز، ۲۵ درصد از درختان حاصل سوزانده شدند و درختان باقیمانده همراه با مقادیر حمایت شاخه‌ای (PP) برای مشاهدهٔ یک درخت اجمالی ۵۰ درصد به نرم‌افزار FeegTree (ویرایش ۴. ۴. ۱) انتقال داده شدند. برای آنالیز بیشینه درست نمایی (ML)، از نرم‌افزار

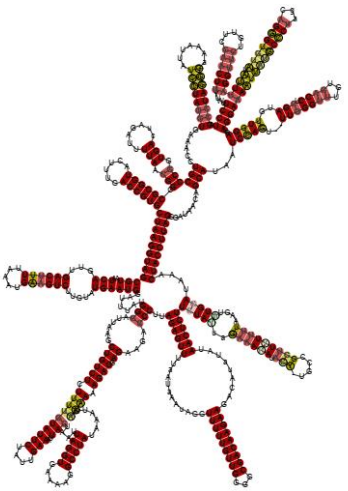
[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-10-12]
[DOI: 10.52547/ismj.24.1.78]

RAxML شد. اصولاً الگوریتم ML احتمال مورد نظر برای هر نوکلئوتید ممکن در گره‌های اجدادی را محاسبه می‌کند و درست‌نمایی ساختار درخت را از این احتمالات به دست می‌آورد. درست‌نمایی همه توپولوژی‌های قابل قبول در این روش بررسی می‌شود و محتمل‌ترین درخت به‌عنوان بهترین درخت انتخاب می‌شود. برای انجام این آنالیز پس از انتخاب بهترین مدل تکاملی، از گزینهٔ rapid bootstrapping استفاده شد و ۱۰۰۰ تکرار بوت استراپ تولید شد. پس از پایان آنالیز درخت ML دارای بیشترین امتیاز انتخاب و مقادیر بوت استراپ گنجانده شد. خروجی نرم‌افزار با استفاده از نرم‌افزار FeegTree (ویرایش ۴. ۴. ۱) مشاهده شد.

یافته‌ها

بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراجی نشان داد که در طول فرایند ۳۱۴/۹۵ نانوگرم/میلی‌لیتر DNA استخراج شده است، نسبت A260/280 nm نیز برابر ۱/۷۸ بود که گویای کیفیت بالای نمونه است. باند تشکیل شده بر روی ژل آگارز ۱ درصد نیز نشان دهندهٔ تشکیل یک باند واضح بر روی ژل بود که کیفیت نمونه و عدم وجود آلودگی پروتئینی را تأیید کرد. بررسی محصول PCR تشکیل باندی با طول تقریبی ۵۲۰ bps را نشان داد که تکثیر صحیح قطعه را تأیید کرد. پس از تعیین توالی نمونه توسط شرکت، ترادف نوکلئوتیدی با شمارهٔ MW419903 در بانک ژنی ثبت گردید.

پس از هم‌تراز شدن توالی‌ها با نرم‌افزار Locarna و ترسیم مدل ساختاری 16S (شکل ۳)، درخت فیلوژنی خرگوش دریایی خلیج‌فارس که به صورت *Aplysia* sp. نامگذاری شده با روش Maximum Likelihood (ML) ترسیم شد (شکل ۴) و مقایسه توالی ژنی، هم‌ترازسازی و آنالیز تبارزایی گونه با هشت گونهٔ خرگوش دریایی جنس Aplysia از بانک جهانی ژن صورت گرفت. آنالیز فیلوژنی با هر دو روش ML و BI نشان دهندهٔ ۹۴ درصد پشتیبانی از احتمال پیشین و ۵۰ درصد پشتیبانی بوت استراپ برای بیشتر کلادهای پایه و مقادیر بالاتر در کلادهای اشتقاقی بود. همچنین توپولوژی درخت رسم شده در هر دو روش مشابه با یکدیگر و نشان دهندهٔ مونوفایلتیک بودن جنس Aplysia بود. مطابق درخت ترسیم شده، گونه‌ی خلیج‌فارس و *Aplysia dactylomela* با ۸۷ درصد بوت استراپ و احتمال پسین بالا (PP=۱) در یک کلاد قرار گرفتند. درخت فیلوژنی به دست آمده از روش Bayesian نیز توپولوژی مشابهی با روش ML نشان داد و در این روش نیز گونهٔ خلیج فارس با ۹۵/۸ درصد بوت استراپ و احتمال پسین ۱ در گروه خواهری *A. dactylomela* حمایت شد. گونهٔ *Akera bullata* از خانوادهٔ Akeridae به عنوان برون‌گروه در نظر گرفته شد (شکل ۴).

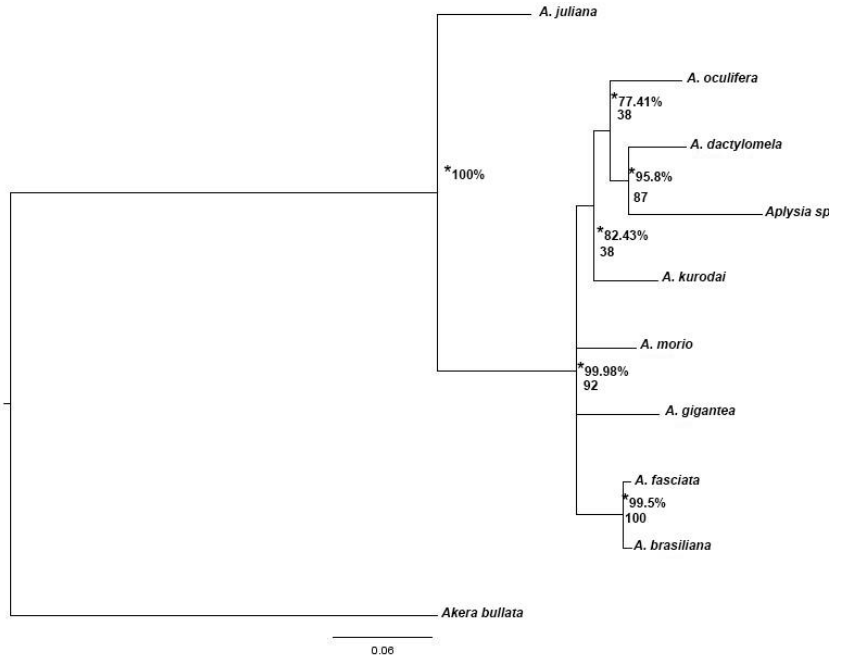


شکل ۳) هم‌ترازسازی توالی‌های مورد مطالعه و ترسیم مدل ثانویه با استفاده از نرم‌افزار Locarna.

Fig 3) Aligning the sequences and plotting the secondary model using Locarna.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-10-12]

[DOI: 10.52547/ismj.24.1.78]



شکل ۴) درخت فیلوژنی ترسیم شده برای نمونه‌های مورد بررسی. در این درخت گونه‌ی خرگوش دریایی خلیج‌فارس به‌صورت *Aplysia* sp. نشان داده شده است. اعدادی که با * مشخص شده‌اند، نشان دهندهٔ ساپورت‌های مدل Bayesian و اعداد بدون * نشانگر ساپورت‌های مدل ML هستند.

Fig 4) The phylogeny tree drawn for studied species. In this tree, the Persian Gulf's sea hare is shown as *Aplysia* sp.. Numbers marked with * indicate Bayesian model supports and others indicate the ML model supports.

بحث

پیشرفت‌های اخیر در حوزهٔ سیستماتیک که به بررسی تاریخچهٔ تکاملی صفات مورد مطالعه می‌پردازند (مانند شرایط اجدادی در مقایسه با شرایط اشتقاقی)، امکان آنالیزهای فیلوژنتیک دقیقی را فراهم نموده‌اند. در برخی موارد، ویژگی‌های ریخت‌شناختی که به طور سنتی برای طبقه‌بندی استفاده می‌شوند از اهمیتی سؤال برانگیز برای بررسی فیلوژنی برخوردارند زیرا این صفات همولوگ نیستند و در نتیجه سبب بروز ابهاماتی در روابط فیلوژنتیک در میان تاکسون‌ها خواهند شد (۲۰-۱۸). گوسلینر (Gosliner) (۱۹) شواهد جامعی از هموپلازی برای کل زیر رده بر اساس کاهش اندازه یا از بین رفتن ویژگی‌ها ارائه داد، و میکلسن (Mikkelsen) (۲۰) نیز شواهدی از هموپلازی ریخت‌شناسی با تمرکز بر روابط میان Cephalaspidea اولیه ارائه دادند. مثال‌هایی از صفاتی که چندین بار به صورت مستقل کوچک شده یا از میان رفته‌اند شامل صدف، اپرکولوم، تنیدیوم، رادولا و صفحات جونده است. پدیدهٔ Eutyneury (یا عدم پیچ‌خوردگی طناب‌های عصبی جانبی) چندین بار از اجداد streptoneurous (یا پیچ خورده) در نتیجهٔ دتورژن مشتق شده و جدیدترین مورد آن Anaspidea از استرپتونوران اولیه به نام *Akera* است (۱۸ و ۱۹). بنابراین، تاکسونومیست‌های سنتی اپیستوبرانش‌ها با صفات هموپلاستی بسیاری مواجهند که تفسیرشان برای بررسی فیلوژنتیک مشکل است.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-10-12]
[DOI: 10.52547/ismj.24.1.78]

Anaspidea یکی از کوچک‌ترین راسته‌های Opistobranch هستند. با این حال، این گروه از نرمتنانی تشکیل شده‌اند که نه تنها برای تاکسونومیست‌ها بلکه برای دانشمندان فعال در سایر حوضه‌های زیست‌شناسی از جمله فیزیولوژی، اکولوژی و رفتارشناسی قابل توجه هستند (۱۳). این راسته به صورت سنتی از ۹ یا ۱۰ جنس تشکیل شده، اما روابط میان این جنس‌ها نامشخص بوده است. طبقه‌بندی‌های تاکسونومیک فعلی برای Anaspidea بر اساس چندین ویژگی بدون در نظر گرفتن شرایط اجدادی یا اشتقاقی صورت گرفته است. دو روش مشهور طبقه‌بندی تاکسونومیک این راسته به شرح زیر است: در یک طبقه‌بندی، Anaspidea از یک خانواده به نام Aplysiidae با پنج زیرخانواده تشکیل شده است. در طبقه‌بندی دیگر، بر اساس طول لوپ احشایی، جنس‌های مختلفی در دو زیرراسته با یک خانواده برای هر زیرراسته قرار گرفته است (۲۱ و ۲۲) (جدول ۴).

جدول ۴) طبقه‌بندی راستهٔ Anapsidea بر اساس دو روش پیشنهادی توسط Eales (۲۱) و Marcus (۲۲)

Family Akeridae	*Akera*	Eales (1994)
Family Aplysiidae Subfamily Aplysiinae	*Aplysia* Linnaeus 1767 *Syphonota* Adams & Reeve	
Subfamily Dolabellinae	*Dolabella* Lamarck 1801	
Subfamily Notharchinae	*Notarchus* Cuvier 1817 *Stylocheilus* Gould 1852 *Bursatella* Blainville 1817	
Subfamily Dolabriferinae	*Dolabelifera* Gray 1847 *Petalifera* Gray 1847 *Phyllaplysia* P. Fischer 1872	
Suborder Longicommissurata Family Aplysiidae Subfamily Aplysiinae	*Aplysia* *Syphonota* *Dolabella*	Marcus (1972)
Subfamily Dolabellinae Suborder Brevicommisurata Family Notharchidae Subfamily Notharchinae Subfamily Dolabriferinae	*Notarchus* *Stylocheilus* *Burstella* *Dolabrifera* *Petalifera* *Phyllaplysia*	

همانطور که در جدول مشاهده می‌شود، جایگاه خانوادهٔ Akeridae به دلیل ظاهر استرپتونوری و سایر ویژگی‌های پلیژیومورفیک بحث برانگیز است. برخی از محققان Akera را بر اساس وجود یک پوسته‌ی سفالی غیرتنتاکولی، صدف خارجی بزرگ و پاراپودیای آزاد در Cephalaspidea قرار می‌دهند. این ویژگی‌ها با Anaspidea مقایسه می‌گردد که تنتاکل، رینوفور و همچنین درجاتی از ادغام پاراپودیا دارند (۲۲ و ۲۳). محققان دیگر پیشنهاد کرده‌اند که بهتر است Akeridae در راسته‌ی Anaspidea قرار گیرد، زیرا به نظر می‌رسد حد واسط میان اجداد سفالاسپیدی و سایر خرگوش‌های دریایی است. حامیان قرار گرفتن Akera در Anaspidea چندین خصوصیت مشترک سیناپتومورفیک میان Akera و Anaspidea از جمله سیستم تولیدمثلی، غدد دفاعی، رادولا و سیستم عصبی مرکزی را پیشنهاد می‌دهند (۱۹). در نهایت بر اساس مطالعاتی که مدینا و والش (Walsh) (۱۳) بر روی سیستماتیک مولکولی راسته‌ی Anaspidea بر اساس

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-10-12]
[DOI: 10.52547/ismj.24.1.78]

توالی DNA میتوکندریایی (12S، 16S و COI) انجام دادند، مشخص شد که جنس Akera در راسته‌ی Anaspidea قرار می‌گیرد و باید در برخی از ویژگی‌های مورفولوژیک (مانند صدف، ادغام پاراپودیا) که قبلا برای طبقه‌بندی خرگوش‌های دریایی استفاده می‌شد، تجدید نظر گردد. همچنین این محققان عنوان کردند که در بررسی درخت تبارشناسی خرگوش‌های دریایی جنس Aplysia می‌توان از Akera به عنوان برون‌گروه استفاده کرد.

به دلیل سطوح بالای هموپلازی مورفولوژیک و تمایل به کاهش بسیاری از صفاتی که قبلاً توسط تاکسونومیست‌های نرمتنان مورد استفاده قرار می‌گرفت، باید از ویژگی‌های دیگری برای حل روابط فیلوژنتیک در کلاد اوپیستوبرانش استفاده کرد. مارکرهای مولکولی ابزار مناسبی برای این هدف هستند، زیرا حاوی ویژگی‌های فراوانی هستند که می‌توانند در آنالیز فیلوژنی مورد استفاده قرار بگیرند (۲۴). گزینه‌های متعددی از مارکرهای مولکولی وجود دارند که در سطوح مختلف سیستماتیک مفید واقع می‌شوند. در این میان، ثابت شده که DNA میتوکندریایی (mtDNA) سیگنال‌های فیلوژنی را در سطوح مختلف تاکسونومی حمل می‌کند. DNA میتوکندریایی فقط از سمت مادر به ارث می‌رسد، فاقد هرگونه نوترکیبی است و نرخ بالاتر تکاملی نسبت به ژن‌های هسته‌ای در بسیاری از تاکسون‌ها نشان می‌دهد. شاید از همه مهم‌تر، mtDNA آرایه‌ای از ژن‌ها دارد که می‌تواند در سطوح مختلف فیلوژنی مفید باشند. این آرایه‌ها شامل ژن‌های ریبوزومی (12S و 16S) هستند و از جمله حفاظت شده‌ترین مناطق در ژنوم میتوکندریایی می‌باشند (۱۵). از آنجا که ژن‌های ریبوزومی میتوکندریایی با سرعت بیشتری نسبت به همولوگ‌های هسته‌ایشان تکامل می‌یابند، از این ژن‌ها در درجه‌ی اول در سطوح پایینی تاکسونومی از سطح جنس تا جمعیت استفاده می‌شود (۲۵). مطالعات صورت گرفته بر روی روابط فیلوژنی جانوران مختلف نشان می‌دهد که مارکرهای rRNA میتوکندریایی برای واگرایی تا ۱۰۰ میلیون سال قابل اعتماد هستند. از آنجا که اولین فسیل‌های قابل اعتماد یافت شده از Akera به اواسط ژوراسیک (۱۶۵ میلیون سال پیش) برمی‌گردد، اما اولین گزارش از خرگوش‌های دریایی اولیه (Aplysia و Dolabella) متعلق به دوران میوسن (۲۵ میلیون سال پیش) بوده است، بنظر می‌رسد که مارکرهای ریبوزومی گزینه‌های مناسبی برای بررسی روابط فیلوژنتیک در این کلاد باشند (۱۳).

بنابراین با توجه به مطالعات انجام شده در زمینهٔ سیستماتیک این نرمتنان، شناسایی خرگوش دریایی خلیج‌فارس بر اساس آنالیز فیلوژنتیک توالی 16S rRNA انجام و گونهٔ *Akera bulata* نیز به عنوان برون‌گروه انتخاب شد. همچنین به منظور مقایسهٔ بهتر توالی DNA میتوکندریایی گونه خلیج‌فارس با گونه‌های دیگر، از پرایمر یونیورسال مورد استفاده در مطالعهٔ مدینا و همکاران (۱۷) برای تکثیر قطعهٔ ژنی استفاده شد و در نهایت توالی بدست آمده با توالی‌های ثبت شده از آن مطالعه در بانک ژنی NCBI (جدول ۳) مقایسه گردید. نتایج حاصل از آنالیز درخت تکاملی ترسیم شده نشان داد که جنس Aplysia یک گروه مونوفایلتیک را تشکیل می‌دهد و خرگوش دریایی خلیج‌فارس یک گونه‌ی مجزا از گونه‌های ثبت شده در بانک ژنی می‌باشد. این نتیجه با مطالعهٔ صورت گرفته توسط مدینا و همکاران (۳) مطابقت دارد. این محققان به بررسی روابط فیلوژنتیک خرگوش‌های دریایی جنس Aplysia با استفاده از سه توالی DNA میتوکندریایی COI، 16S و 12S پرداختند و تأکید کردند که این

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-10-12]
[DOI: 10.52547/ismj.24.1.78]

جنس از یک گروه مونوفایلتیک تشکیل شده است. درخت فیلوژنی در این مطالعه با روش‌های Maximum Likelihood، Minimum Evolution و Maximum Parsimony ترسیم و همانند تحقیق حاضر از ۱۰۰۰ تکرار بوت استراپ تشکیل شده است. در مقایسه‌ای میان درخت ترسیم شده در تحقیق حاضر و تحقیق صورت گرفته توسط مدینا و همکاران (۳) می‌توان متوجه تفاوت‌هایی در جایگاه گونه‌های مختلف شد. به عنوان مثال، در مطالعهٔ مدینا و همکاران (۳)، *A. dactylomela* و *A. oculifera* در یک کلاد قرار گرفته‌اند، در حالیکه در تحقیق حاضر، *A. dactylomela* در یک کلاد خواهری نسبت به *A. oculifera* قرار می‌گیرد. بر اساس نظر این محققان، علت این تفاوت را می‌توان در شیوه‌های مختلف هم‌ترازی توالی‌ها، استفاده از آنالیزهای فیلوژنی متفاوت و همچنین تعداد نسل‌های تعریف شده برای هر آنالیز جستجو کرد. البته می‌توان دلیل دیگر این تفاوت را وجود توالی مربوط به خرگوش دریایی خلیج‌فارس در آنالیز فیلوژنی تحقیق حاضر دانست، زیرا احتمالاً به دلیل نزدیکتر بودن شباهت‌ها میان گونهٔ خلیج‌فارس و *A. dactylomela*، این دو در یک کلاد و در مقایسه با *A. oculifera* در یک کلاد خواهری قرار می‌گیرند. مطالعهٔ دیگری توسط والشید- لنگلینگ (Wollscheid-Lengeling) و همکاران (۱۲) نیز به بررسی فیلوژنی خرگوش‌های دریایی از جمله جنس Aplysia پرداخته است. نتایج این مطالعه نیز از مونوفایلتیک بودن کلاد Aplysia پشتیبانی می‌کند اما با توجه به اینکه گونه‌های مورد بررسی در این مطالعه با گونه‌های تحقیق حاضر تفاوت دارند، امکان مقایسه وجود ندارد.

یک نکتهٔ جالب توجه در مورد گونه‌های *A. dactylomela*، *A. oculifera* و گونهٔ خلیج‌فارس شکل ظاهری مشابه این سه گونه است، البته لازم به ذکر است که خواستگاه هر گونه متفاوت بوده و تفاوت‌های مورفولوژیک جزئی نیز در میان این سه گونه قابل مشاهده است. ایلز (Eales) (۲۶) و گوسلینر (Gosliner) (۱۹) نیز بیان کرده‌اند که در بررسی‌های تاکسونومی اولیه برای دو گونهٔ *A. dactylomela* و *A. oculifera* بر اساس ویژگی‌های مورفولوژی باید دقت کرد و به جزئیاتی همچون جثه و طرح‌های ظاهری بدن توجه نمود. بنابراین با توجه به موقعیت خاص این سه گونه در درخت فیلوژنی و همچنین شباهت ظاهری آن‌ها از نظر مورفولوژیک، احتمالاً ارسال نمونه به یک موزهٔ جانورشناسی معتبر و بررسی آن توسط یک متخصص مورفولوژی خرگوش‌های دریایی کمک شایانی به تعیین جایگاه دقیق خرگوش دریایی خلیج‌فارس خواهد کرد.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از آنالیز مولکولی با استفاده از توالی ژن 16S rRNA نشان دهندهٔ وجود یک گونه‌ی احتمالاً جدید از خرگوش‌های دریایی در منطقهٔ خلیج‌فارس است. مطابق درخت ترسیم شده با روش Maximum Likelihood، گونهٔ خلیج‌فارس و *Aplysia dactylomela* با ۸۷ درصد بوت استراپ و احتمال پسین بالا (PP=۱) در یک کلاد قرار گرفتند. درخت فیلوژنی به دست آمده از روش Bayesian نیز توپولوژی مشابهی با روش ML نشان داد و در این روش نیز گونهٔ خلیج‌فارس با ۹۵/۸ درصد بوت استراپ و احتمال پسین ۱ در گروه خواهری *A. dactylomela* حمایت شد. همچنین توپولوژی درخت رسم شده در هر دو روش مشابه با یکدیگر و نشان دهندهٔ مونوفایلتیک بودن جنس Aplysia بود. اما به منظور

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-10-12]
[DOI: 10.52547/ismj.24.1.78]

گزارش قطعی موقعیت گونهٔ حاضر، انجام آنالیزهای فیلوژنی با استفاده از ژن COI و همچنین بررسی مورفولوژیک گونه لازم است.

سپاس و قدردانی

از کارکنان پژوهشکده علوم زیست پزشکی خلیج‌فارس واقع در دانشگاه علوم پزشکی بوشهر بابت کمک به جمع‌آوری نمونه و همچنین انجام مراحل مختلف آزمایشگاهی کمال تشکر را داریم.

تضاد منابع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

References:

1.Azizpour J, Chegini V, Khosravi M, et al. Study Of The Physical Oceanographic Properties Of The Persian Gulf, Strait Of Hormuz And Gulf Of Oman Based On PG-GOOS CTD Measurements. J Persian Gulf 2014; 5(18): 37-48.

2.Coles SL. Coral Species Diversity And Environmental Factors In The Arabian Gulf And The Gulf Of Oman: A Comparison To The Indo-Pacific Region. Atoll Res Bull 2003; 507: 1-19.

3.Medina M, Collins T, Walsh PJ. Phylogeny Of Sea Hares In The *Aplysia* Clade Based On Mitochondrial DNA Sequence Data. Bull Mar Sci 2005; 76(3): 691-8.

4.Kamiya H, Sakai R, Jimbo M. Bioactive Molecules From Sea Hares. In: Cimino G, Gavagnin M, editors. Molluscs. Progress In Molecular And Subcellular Biology. Vol 43. Berlin, Heidenberg: Springers, 2006, 215-39.

5.Lovell P, Moroz LL. The Largest Growth Cones In The Animal Kingdom: An Illustrated Guide To The Dynamics Of *Aplysia* Neuronal Growth In Cell Culture. Integr Comp Biol 2006; 46(6): 847-70.

6.Kamio M, Grimes TV, Hutchins MH, et al. The Purple Pigment Aplysioviolin In Sea Hare Ink Deters Predatory Blue Crabs Through Their Chemical Senses. Anim Behav 2010; 80(1): 89-100.

7.Yang H, Johnson PM, Ko KC, et al. Cloning, Characterization And Expression Of Escaping, A Broadly Antimicrobial FAD-Binding L-Amino Acid Oxidase From Ink Of The Sea Hare *Aplysia Californica*. J Exp Biol 2005; 208: 3609-22.

8.Ko KC, Tai PC, Derby CD. Mechanisms Of Action Of Escapin, A Bactericidal Agent In The Ink Secretion Of The Sea Hare *Aplysia Californica*: Rapid And Long-Lasting DNA Condensation And Involvement Of The Oxyr-Regulated Oxidative Stress Pathway. Antimicrob Agents Chemother 2012; 56(4): 1725-34.

9.Tavares TC, Nogueira VL, Batista GL, et al. A Sea Hare L-Amino Acid Oxidase To Fight Multiple Antibiotic-Resistant *Staphylococcus aureus*. J Microbiol Exp 2017; 4(6): 00129.

10.Tavares TC, Nogueira VL, Vasconcelos IM, et al. Further Characterization And Mode Of Action Of Dactylomelin-P, An Antibacterial Protein Isolated From The Ink Of The Sea Hare *Aplysia Dactylomela* (Rang, 1828). J Exp Mar Biol Ecol 2011; 407(2): 200-6.

11.Zandi K, Farsangi MH, Nabipour I, et al. Isolation And Purification Of A Novel Anticancer 60 K Daltons Protein From The Persian Gulf Sea Hare, Aplysia Dactylomela. Iran South Med J 2004; 6(2): 97-103. (Persian)

12.Wollscheid-Lengeling E, Boore J, Brown W, et al. The Phylogeny Of Nudibranchia (Opisthobranchia, Gastropoda, Mollusca) Reconstructed By Three Molecular Markers. Org Divers Evol 2001; 1(4): 241-56.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-10-12]

[DOI: 10.52547/ismj.24.1.78]

13.Medina M, Walsh PJ. Molecular Systematics Of The Order Anaspidea Based On Mitochondrial DNA Sequence (12S, 16S, And COI). Mol Phylogenet Evol 2000; 15(1): 41-58.
14.Mikkelsen PM. The Evolutionary Relationships Of The Cephalaspidea SL (Gastropoda, Opisthobranchia) With An Analysis Of Traditional Cephalaspid Characters. Boll Malacol 1996; 29: 15-38.
15.Medina M, Lal S, Vallès Y, et al. Crawling Through Time: Transition Of Snails To Slugs Dating Back To The Paleozoic, Based On Mitochondrial Phylogenomics. Mar Genomics 2011; 4(1): 51-9.
16.Panova M, Aronsson H, Cameron RA, et al. DNA Extraction Protocols For Whole-Genome Sequencing In Marine Organisms. In: Bourlat S, editors. Marine Genomics. Methods In Molecular Biology. Vol 1452. New York: Humana Press, 2016, 13-44.
17.Medina M, Collins TM, Walsh PJ. mtDNA Ribosomal Gene Phylogeny Of Sea Hares In The Genus *Aplysia* (Gastropoda, Opisthobranchia, Anaspidea): Implications For Comparative Neurobiology. Syst Biol 2001; 50(5): 676-88.
18.Gosliner TM. Origins And Relationships Of Primitive Members Of The Opisthobranchia (Mollusca: Gastropoda). Biol J Linn Soc 1981; 16(3): 197-225.
19.Gosliner TM. Morphological Parallelism In Opisthobranch Gastropods. Malacologia 1991; 32(2): 313-27.
20.Mikkelsen PM. Monophyly Versus The Cephalaspidea (Gastropoda, Opisthobranchia), With An Analysis Of Traditional Cephalaspid Characters. Boll Malacol 1993; 29: 115-38.
21.Eales NB. Aplysiids From The Indian Ocean, With A Review Of The Family Aplysiidae. J Mollus Stud 1944; 26(1): 1-22.
22.Marcus ED. On The Anaspidea (Gastropoda: Opisthobranchia) Of The Warm Waters Of The Western Atlantic. Bull Mar Sci 1972; 22(4) :841-74.
23.Burn R. Opisthobranchs (Subclass Opisthobranchia). In: Shepherd SA, Thomas IM, editors. Marine Invertebrates Of Southern Australia. Part 2. Adelaide: South Australian Government Printer, 1989, 725-88.
24.Patwardhan A, Ray S, Roy A. Molecular Markers In Phylogenetic Studies-A Review. J Phylogen Evolution Biol 2014; 2(2): 1-9.
25.Simon C, Frati F, Beckenbach A, et al. Evolution, Weighting, And Phylogenetic Utility Of Mitochondrial Gene Sequences And A Compilation Of Conserved Polymerase Chain Reaction Primers. Ann Entomol Soc Am 1994; 87(6): 651-701.
26.Eales NB. Revision Of The World Species Of Aplysia (Gastropoda, Opisthobranchia). Bull Br Mus Nat Hist Zool 1960; 5: 267-404.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-10-12]

[DOI: 10.52547/ismj.24.1.78]

Iran South Med J 2021; 24(1): 75-87

Original Article

Molecular Identification of the Persian Gulf Sea Hare (*Aplysia* sp.) Based on 16s rRNA Gene Sequence

***P. Dehghani** (MSc)[1*], **H. Zolgharnein** (PhD)[1**], **I. Nabipour** (MD)[2], **S. Matroodi** (PhD)[1], **M. Mohammadi** (PhD)[2]*

[1] Department of Marine biology, School of Marine Science and Oceanography, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran
[2] The Persian Gulf Marine Biotechnology Research Center, The Persian Gulf Biomedical Sciences Research Institute, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran

(Received 10 Dec, 2020 Accepted 5 Jan, 2021)

Abstract

Background: Sea hares of the Aplysia genus are among the mollusks of interest for various researchers to study their phylogeny, bioactive compounds and the nervous system. These mollusks are herbivorous and produce chemical compounds (ink) to defend themselves. The present study provided molecular identification of the Persian Gulf (Bushehr city) sea hare using 16s rRNA gene sequence.

Materials and Methods: Sampling was done in coastal waters of Bushehr (Bushehr Province, Iran). Total DNA was extracted using CTAB method and target DNA was amplified by 16sar-L and 16sbr-H universal primers. For phylogenetic analysis, both Maximum Likelihood and Bayesian methods (by RAxML and Mr. Bayes programs, respectively) were used. For ML algorithm, 1000 bootstrap replicates were generated. In Bayesian approach, the program was implemented for 20 million generations and one tree for every 1000 generations was sampled.

Results: Based on the obtained tree from ML method, Persian Gulf sea hare and *Aplysia dactylomela* were placed in a clade with 87% bootstrap and high posterior probability (PP=1). The obtained phylogenetic tree from Bayesian approach showed similar topology. The Persian Gulf sea hare with 95.8% bootstrap and PP=1 was again supported in the sister group of A. dactylomela.

Conclusion: The results from the molecular analysis of 16s rRNA gene sequence indicate probable existence of a new species of sea hare in the Persian Gulf region. In order to determine the exact position of the present species, the phylogenetic analysis of COI gene sequence and morphological characteristics are essentials.

Keywords: Sea hare, Aplysia, Persian Gulf, Molecular phylogenetic, 16s rRNA.

©Iran South Med J.All right sreserved

Cite this article as: Dehghani P, Zolgharnein H, Nabipour I, Matroodi S, Mohammadi M. Molecular Identification of the Persian Gulf Sea Hare (Aplysia sp.) Based on 16s rRNA Gene Sequence. Iran South Med J 2021; 24(1):75-87

Copyright © 2021 Dehghani, et al This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

** *Address for correspondence*: Department of Marine biology, School of Marine Science and Oceanography, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran. Email: zolgharnein@kmsu.ac.ir
*ORCID: 0000-0002-2105-7546
**ORCID: 0000-0001-5944-3349

Website: http://bpums.ac.ir
Journal Address: http://ismj.bpums.ac.ir

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-10-12]

[DOI: 10.52547/ismj.24.1.78]