



شناسایی ملکولی زوانتیدهای آب‌های کم ژرفا در سواحل بوشهر - خلیج فارس

ماشاله درویشی^۱(MSc)، مریم مرادی نسب^۲(MSc)*، سیدجواد حسینی^۳(PhD)،

رضا محمدنیا^۴(DVM)، زهرا امینی خوئی^۵(PhD)، سیما نصری^۱(PhD)، ایرج نبی پور^۶(MD)

^۱ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور تهران، تهران، ایران

^۲ مرکز تحقیقات طب گرمسیری و عفونی خلیج فارس، پژوهشکده علوم زیست پزشکی خلیج فارس، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران

^۳ گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده خلیج فارس، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، بوشهر، ایران

^۴ اداره کل دامپزشکی استان بوشهر، بوشهر، ایران

^۵ مرکز تحقیقات آب‌های دور چابهار، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، چابهار، ایران

^۶ مرکز تحقیقات زیست فناوری دریایی خلیج فارس، پژوهشکده علوم زیست پزشکی خلیج فارس، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران

(دریافت مقاله: ۹۶/۹/۶ - پذیرش مقاله: ۹۶/۱۱/۲۳)

چکیده

زمینه: راسته‌ی زوانتاریا (Cnidaria: Anthozoa) یکی از راسته‌های کمتر بررسی شده در خلیج فارس است. این گروه از سنیداریاها غالباً در آب‌های گرم مناطق متفاوت جهان یافت می‌شوند و شناسایی مورفولوژیک آنها به دلیل تنوع رنگی گسترده، در سطح گونه بسیار پیچیده است. بدین منظور در این مطالعه برای نخستین بار تنوع زوانتیدهای آب‌های کم ژرفا خلیج فارس - سواحل بوشهر به روش فیلوژنتیک ملکولی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: بیست و چهار کلونی زوانتید با شکل و رنگ‌های متفاوت از نواحی جزر و مدی و کم عمق سواحل بوشهر جمع‌آوری شدند. پس از استخراج DNA به روش CTAB - فنل - کلروفرم، قطعه ژنی مارکرهای میتوکندریایی COI و 16S rDNA و مارکر هسته‌ای ITS-rDNA با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) تکثیر و توالی‌یابی شد.

یافته‌ها: براساس توالی‌های بدست آمده، وجود چهار گونه *Zoanthus sociatus*، *Zoanthus pulchellus*، *Zoanthus sansibaricus* و *Palythoa aff. mutuki* در ساحل بوشهر اثبات شد. گونه *Palythoa aff. mutuki* مشاهده شده در این مطالعه دارای توالی یکسان با گونه پیشتر گزارش شده در خلیج فارس می‌باشد. با این وجود در این مطالعه دو گونه جدید توصیف نشده از جنس *Zoanthus* (*Z. pulchellus* و *Z. sociatus*) شناسایی شدند.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه حاضر حاکی از کارایی کاربرد مارکرهای ملکولی در مقایسه با ویژگی‌های مورفولوژیک جهت شناسایی راسته زوانتاریا به‌ویژه در سطح گونه می‌باشد. بی‌شک مطالعات هر چه بیشتر به منظور تعیین الگوی پراکنش زوانتیدها دانش ما را در رابطه با تنوع زیستی خلیج فارس افزایش خواهد داد.

واژگان کلیدی: زوانتاریا، COI، 16S rDNA، ITS-rDNA، خلیج فارس

* بوشهر، مرکز تحقیقات طب گرمسیری و عفونی خلیج فارس، پژوهشکده علوم زیست پزشکی خلیج فارس، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران

® بخشی از این پروژه، با حمایت‌های کرسی پژوهشی دریایی، (مصوب صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور) معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری به انجام رسید.

مقدمه

زوانتاریا (Cnidaria: Anthozoa) یکی از اصلی ترین اجزاء اعماق دریا در صخره های مرجانی هستند که با وجود پراکنش وسیع در اغلب محیط های دریایی به درستی مطالعه نشده اند (۱). اغلب گونه های این راسته به صورت کلنی دیده می شوند و از این حیث به مرجان های سخت شبیه اند لیکن فقدان اسکلت آهکی، ویژگی مشترک این گروه جانوری با شقایق های دریایی است (۲). جنس های *Palythoa* (خانواده Sphenopidae) و *Zoanthus* (خانواده Zoanthidae) را می توان شناخته شده ترین جنس های این راسته قلمداد نمود که در آب های سطحی نواحی گرمسیری و نیمه گرمسیری زندگی می کنند (۳ و ۴). این ارگانیسم ها منبع ترکیبات بیواکتیو مهمی همچون پروتئین فلورسنت سبز (GFP) یا آلکالوئیدهایی با خاصیت ضد پوکی استخوان مانند نورزوانتامین هستند که طی سال های اخیر تحقیقات گسترده ای پیرامون این ترکیبات بیوشیمیایی صورت گرفته است (۵).

تاکسونومی راسته زوانتاریا به سبب انعطاف پذیری مورفولوژیک گونه ها و فقدان معیارهای صحیح شناسایی همواره نابسامان بوده است (۶). رده بندی برای سالیان متمادی بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی از جمله رنگ و ابعاد پلیپ، رنگ صفحه دهانی، تعداد تتاکل ها و نوع پلیپ صورت گرفته است (۱). اما با روی کار آمدن علم ژنتیک ملکولی و بررسی های مجدد مشخص شد که رنگ و سایر ویژگی های ریختی به تنهایی معیار صحیحی برای تفکیک گونه ها نمی باشند (۷ و ۸).

ریمر (Reimer) و همکاران، طی اولین بررسی ملکولی جنس *Zoanthus* با استفاده از روش PCR-Sequencing، چهار گونه از این جنس را که در

گذشته به جهت تفاوت های مورفولوژیکی در رنگ از یکدیگر تفکیک شده بودند را به عنوان واریته های رنگی *Zoanthus sansibaricus* معرفی کردند (۹). پس از آن مطالعات ژنتیکی گسترده تری با هدف شناسایی گونه ای جنس *Zoanthus* انجام شد که همگی حاکی از تنوع رنگی بالای گونه *Zoanthus sansibaricus* بود (۸، ۱۰ و ۱۱).

به منظور رفع مشکلات تاکسونومی راسته زوانتاریا، در طی دو دهه گذشته مطالعات ملکولی بر پایه تکنیک های واکنش زنجیره ای پلیمرز ۱ و تعیین توالی ۲ و با استفاده از مارکرهای DNA میتوکندریایی (COI و 16SrDNA) و DNA هسته ای (ITS-rDNA) مورد استفاده قرار گرفته اند (۸، ۱۰، ۱۲ و ۱۳). پراکنش گسترده آبنسنگ های مرجانی، آب و هوای گرمسیری و عمق کم، خلیج فارس را بستری مناسب برای این راسته تبدیل کرده است لیکن در این زمینه اطلاعات محدودی از زوانتاریاهای موجود در خلیج فارس در دسترس است. در مطالعه ای که توسط نوری کوپایی و همکاران در جزیره قشم انجام شده سه گونه *Palythoa cf. mutuki*، *Zoanthus sansibaricus* و *Palythoa tuberculosa* گزارش شدند (۱۴).

در مطالعه دیگر مربوط به جزایر هنگام، لارک و تنگه هرمز نیز پنج گونه *P. tuberculosa*، *P. mutuki*، *Z. sansibaricus*، *Palythoa aff. mutuki* و *Neozoanthus sp.* شناسایی شدند (۱۵).

در مطالعه حاضر در نظر داریم برای نخستین بار گسترش زوانتاریاهای آب های سطحی را در سواحل خلیج فارس - بوشهر با استفاده از روش های فیلوژنتیک ملکولی و مارکرهای mtCOI، mt16SrDNA و ITS-rDNA بررسی کنیم.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

بیست و چهار کلونی زوانتید از دو منطقه ساحل بوشهر، با روش غواصی از عمق ۳-۱/۵ متری و نواحی جزر و مدی در فاصله اردیبهشت ۹۳ تا خرداد ۹۴ جمع‌آوری گردید (جدول ۱، شکل ۱). شناسایی اولیه با استفاده از ویژگی‌های ظاهری مانند رنگ دیسک دهانی، شکل پلیپ و غیره. انجام گرفت. از تمامی نمونه‌ها بصورت درجا^۱ عکس‌برداری شد و سپس به منظور آنالیزهای ملکولی در الکل ۹۹ درصد و در دمای 20°C - نگهداری شدند.

استخراج DNA

DNA ژنومی نمونه‌های نگهداری شده در اتانول با استفاده از روش CTAB-Phenol/Chloroform به (۱۶) شرح زیر استخراج شد: یک قطعه حدوداً 5cm^3 از نمونه جدا شده و با سانتریفیوژ در دور ۱۲۰۰۰ خشک شد. ۶۰۰ میکرولیتر بافر CTAB، ۲۰۰ میکروگرم پروتئیناز K و ۶۰ میکرولیتر محلول NaCl ۵ مولار به نمونه اضافه و به مدت ۱۶ ساعت در دمای 42°C درجه انکوبه گردید. در مرحله بعد خالص سازی DNA بوسیله فنول-کلروفرم-ایزوامیل الکل با نسبت ۱:۲۴:۲۵ و طی مراحل مختلف شستشو انجام گرفت. رسوب دهی نمونه DNA با استفاده از مقادیر هم حجم ایزوپروپانول و ۱/۱۰ حجم محلول سدیم استات ۳ مولار در دمای 20°C - درجه انجام شد. رسوب بدست آمده با استفاده از اتانول ۷۵ درصد شستشو داده شد و در آب دوبار تقطیر حل گردید. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده به این روش بوسیله الکتروفورز ژل آگارز و اسپکتروفتومتر نانو دراپ اندازه‌گیری شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) و تعیین توالی DNA

واکنش PCR با استفاده از DNA ژنومی برای قطعات ژنی زیر واحد ۱ ژن سیتوکروم اکسیداز C میتوکندریایی (COI)، DNA ریپوزومی ناحیه 16S میتوکندریایی (16S rDNA) و ITS-rDNA با استفاده از آنزیم Taq DNA polymerase (Mannheim, Germany) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. یک قطعه حدوداً ۶۳۰ جفت بازی از ژن COI mt با استفاده از پرایمرهای (۱۷)

LCO1490	5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3'
HCO2198	5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3'

و طی چرخه دمایی زیر تکثیر

شد: دناتوراسیون اولیه به مدت ۵ دقیقه در دمای 94°C درجه و به دنبال آن ۳۵ سیکل شامل ۱ دقیقه دناتوراسیون در 94°C درجه، ۱ دقیقه اتصال در 52°C درجه و ۱ دقیقه گسترش در 72°C درجه و گسترش نهایی در دمای 72°C درجه به مدت ۷ دقیقه انجام شد. به همین ترتیب یک قطعه حدوداً ۹۰۰ جفت بازی از ژن 16S rDNA با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (۱۸).

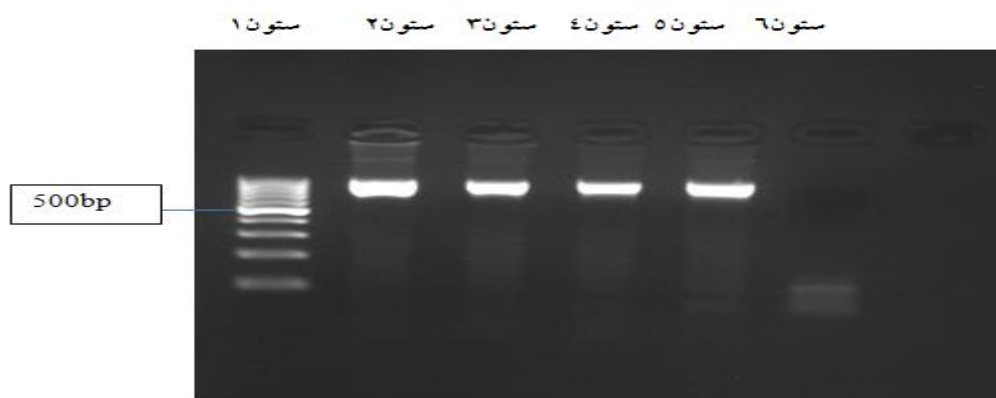
16Sant1a	5'CGAACAGCCAACCCTTGG3'
16SbmoH	5'CGAACAGCCAACCCTTGG3'

واکنش طی PCR با شرایط

زیر تکثیر شد: پس از دناتوراسیون اولیه، ۳۵ سیکل شامل ۱ دقیقه دناتوراسیون در 94°C درجه، ۱ دقیقه اتصال در 58°C درجه و ۱ دقیقه گسترش در 72°C درجه تکرار شد و گسترش نهایی در دمای 72°C درجه و به مدت ۷ دقیقه انجام شد. قطعه ژنی ITS-rDNA نیز با چرخه دمایی مشابه و دمای اتصال 59°C درجه و پرایمرهای اختصاصی تکثیر شد (۱۹).

محصولات PCR بدست آمده برای هر سه مارکر با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد بررسی شده (شکل ۱) و پس از تأیید کیفیت اولیه به منظور تعیین توالی ناحیه تکثیر شده برای COI از پرایمر رفت و در مورد مارکرها 16S rDNA و ITS rDNA از هر دو

پرایمر رفت و برگشت استفاده شد. تعیین توالی نمونه‌های مورد مطالعه به روش خاتمه زنجیره و توسط دستگاه ABI3730XL در شرکت ماکروژن کره جنوبی انجام شد.



شکل ۱) محصول PCR مارکر mt 16S rDNA بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد، ستون ۱: نشانگر 100bp ستون ۲: نمونه BPG۱۲ ستون ۳: BPG۲۲ ستون ۴: BPG۳۰۸ ستون ۵: BPG۳۲۰ ستون ۶: کنترل منفی

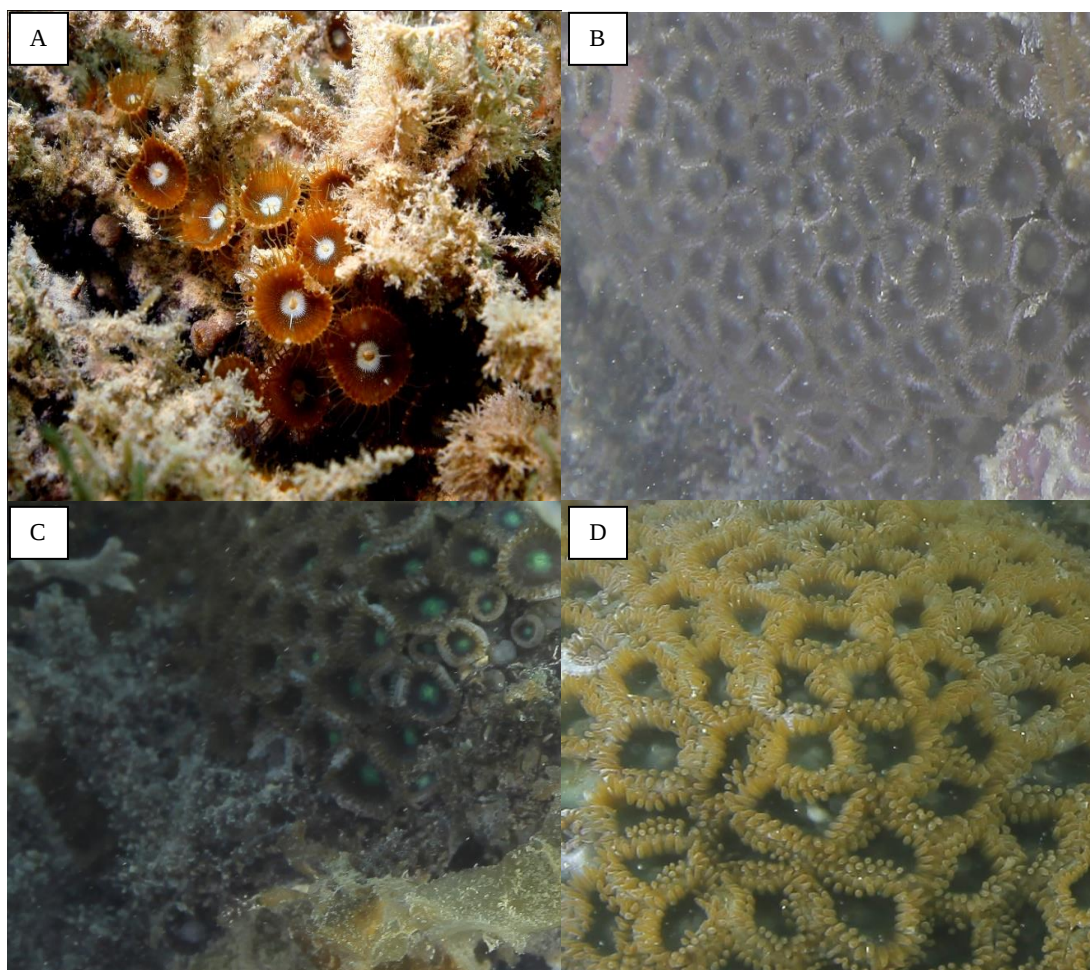
آنالیز فیلوژنتیک

توالی‌های به دست آمده در این مطالعه در پایگاه داده DDBJ ثبت و شماره‌های دسترسی در جدول ۱ نشان داده شده است. توالی‌های نوکلئوتیدی بدست آمده برای هر سه مارکر با استفاده از نرم افزار CLUSTAL W (۲۰) با سایر توالی‌های موجود در بانک ژن به عنوان توالی مرجع هم‌ردیف سازی شدند (شماره‌های دسترسی توالی‌های مرجع در شکل‌های ۳-۵ نشان داده شده است). هم‌ردیفی‌ها به صورت چشمی بازبینی و در صورت نیاز به صورت دستی ویرایش شدند. به این ترتیب سه هم‌ردیفی به صورت زیر حاصل شد: (۱) ۶۱۲ جایگاه برای ۱۸ توالی (COI)، (۲) ۹۰۰ جایگاه برای ۲۲ توالی (16S rDNA) و (۳) ۸۵۷ جایگاه برای ۱۲ توالی (ITS)

rDNA). آنالیز فیلوژنتیک برای توالی‌های هم‌ردیف شده با استفاده از روش‌های Maximum (ML) و Neighbor-Joining (NJ) و انجام شد. پیش از انجام آنالیز ML با استفاده از برنامه MrModeltest (۲۱) و بر اساس معیار اطلاعاتی AIC (Akaike Information Criterion) مدل‌های مناسب برای داده‌های مورد نظر انتخاب شدند. طبق این آزمون، مدل K2+G (۲۲) discrete gamma (Kimura 2-parameter+distribution) بهترین داده را برای مارکر 16SrDNA و مدل‌های K2 و T92+I (۲۳) (Tamura 3- parameter+invariable sites) به ترتیب برای مارکرها COI و ITS-rDNA ارائه می‌کنند. هر دو آنالیز ML و NJ با استفاده از نرم‌افزار MEGA 6 (۲۴) و تکرار بوت استرپ ۱۰۰۰ انجام شد.

جدول ۱) نمونه‌های مورد مطالعه، تاریخ، عمق، محل جمع‌آوری، شناسایی اولیه، شماره‌های دسترسی و شناسایی ملکولی

نام نمونه	تاریخ جمع‌آوری	عمق جمع‌آوری (m)	شناسایی مورفولوژیک اولیه	شماره دسترسی COI	شماره دسترسی mt 16S rDNA	شماره دسترسی ITS-rDNA	شناسایی ملکولی
BPG۱۱	۹۳/۲	۳	Z. sansibaricus	LC۱۶۴۳۷۱	LC۱۶۴۱۸۶	NA	Z. sansibaricus
BPG۱۲	۹۳/۲	۳	P. mutuki	LC۱۶۴۳۷۲	LC۱۶۴۱۸۵	LC۱۶۴۶۹۶	P. aff. mutuki
BPG۲۱	۹۴/۳	۱/۵	Z. sansibaricus	LC۱۶۴۳۵۵	LC۱۶۴۱۶۵	NA	Z. pulchellus
BPG۲۲	۹۴/۳	۱/۵	Z. sansibaricus	LC۱۶۴۳۵۷	LC۱۶۴۱۶۷	LC۱۶۴۶۸۸	Z. sociatus
BPG۲۳	۹۴/۳	۱/۵	Z. sansibaricus	LC۱۶۴۳۵۹	LC۱۶۴۱۶۸	LC۱۶۴۶۸۶	Z. pulchellus
BPG۲۴	۹۴/۳	۱/۵	Z. sansibaricus	LC۱۶۴۳۶۱	LC۱۶۴۱۷۰	NA	Z. pulchellus
BPG۲۵	۹۴/۳	۱/۵	Z. sansibaricus	LC۱۶۴۳۶۲	LC۱۶۴۱۷۲	NA	Z. pulchellus
BPG۳۰۱	۹۴/۳	۳	Z. sansibaricus	LC۱۶۴۳۵۶	LC۱۶۴۱۶۶	NA	Z. sansibaricus
BPG۳۰۲	۹۴/۳	۳	Z. sansibaricus	LC۱۶۴۳۵۸	NA	LC۱۶۴۶۸۵	Z. sansibaricus
BPG۳۰۳	۹۴/۳	۳	Z. sansibaricus	NA	LC۱۶۴۱۶۹	LC۱۶۴۶۸۷	Z. pulchellus
BPG۳۰۴	۹۴/۳	۳	Z. sansibaricus	NA	LC۱۶۴۱۷۱	NA	Z. pulchellus
BPG۳۰۵	۹۴/۳	۳	Z. sansibaricus	NA	LC۱۶۴۱۷۳	NA	Z. pulchellus
BPG۳۰۶	۹۴/۳	۳	Z. sansibaricus	NA	LC۱۶۴۱۷۴	LC۱۶۴۶۸۹	Z. sansibaricus
BPG۳۰۷	۹۴/۳	۳	Z. sansibaricus	NA	LC۱۶۴۱۷۵	NA	Z. sansibaricus
BPG۳۰۸	۹۴/۳	۳	Z. sansibaricus	LC۱۶۴۳۶۳	LC۱۶۴۱۷۶	LC۱۶۴۶۹۰	Z. sociatus
BPG۳۰۹	۹۴/۳	۳	Z. sansibaricus	LC۱۶۴۳۶۴	LC۱۶۴۱۷۷	NA	Z. pulchellus
BPG۳۱۱	۹۴/۳	۳	Z. sansibaricus	LC۱۶۴۳۶۵	LC۱۶۴۱۷۸	NA	Z. sociatus
BPG۳۱۳	۹۴/۳	۳	Z. sansibaricus	NA	NA	NA	
BPG۳۱۴	۹۴/۳	۳	Z. sansibaricus	LC۱۶۴۳۶۶	LC۱۶۴۱۷۹	LC۱۶۴۶۹۲	Z. sociatus
BPG۳۱۵	۹۴/۳	۳	Z. sansibaricus	LC۱۶۴۳۶۷	LC۱۶۴۱۸۰	NA	Z. sansibaricus
BPG۳۱۷	۹۴/۳	۳	Z. sansibaricus	LC۱۶۴۳۶۸	LC۱۶۴۱۸۱	LC۱۶۴۶۹۳	Z. sansibaricus
BPG۳۱۸	۹۴/۳	۳	Z. sansibaricus	LC۱۶۴۳۶۹	LC۱۶۴۱۸۲	LC۱۶۴۶۹۴	Z. pulchellus
BPG۳۱۹	۹۴/۳	۳	Z. sansibaricus	NA	LC۱۶۴۱۸۳	LC۱۶۴۶۹۱	Z. sansibaricus
BPG۳۲۰	۹۴/۳	۱/۵	Z. sansibaricus	LC۱۶۴۳۶۹	LC۱۶۴۱۸۴	LC۱۶۴۶۹۵	Z. sansibaricus



شکل ۲) تصاویر درجا از نمونه‌های جمع‌آوری شده:

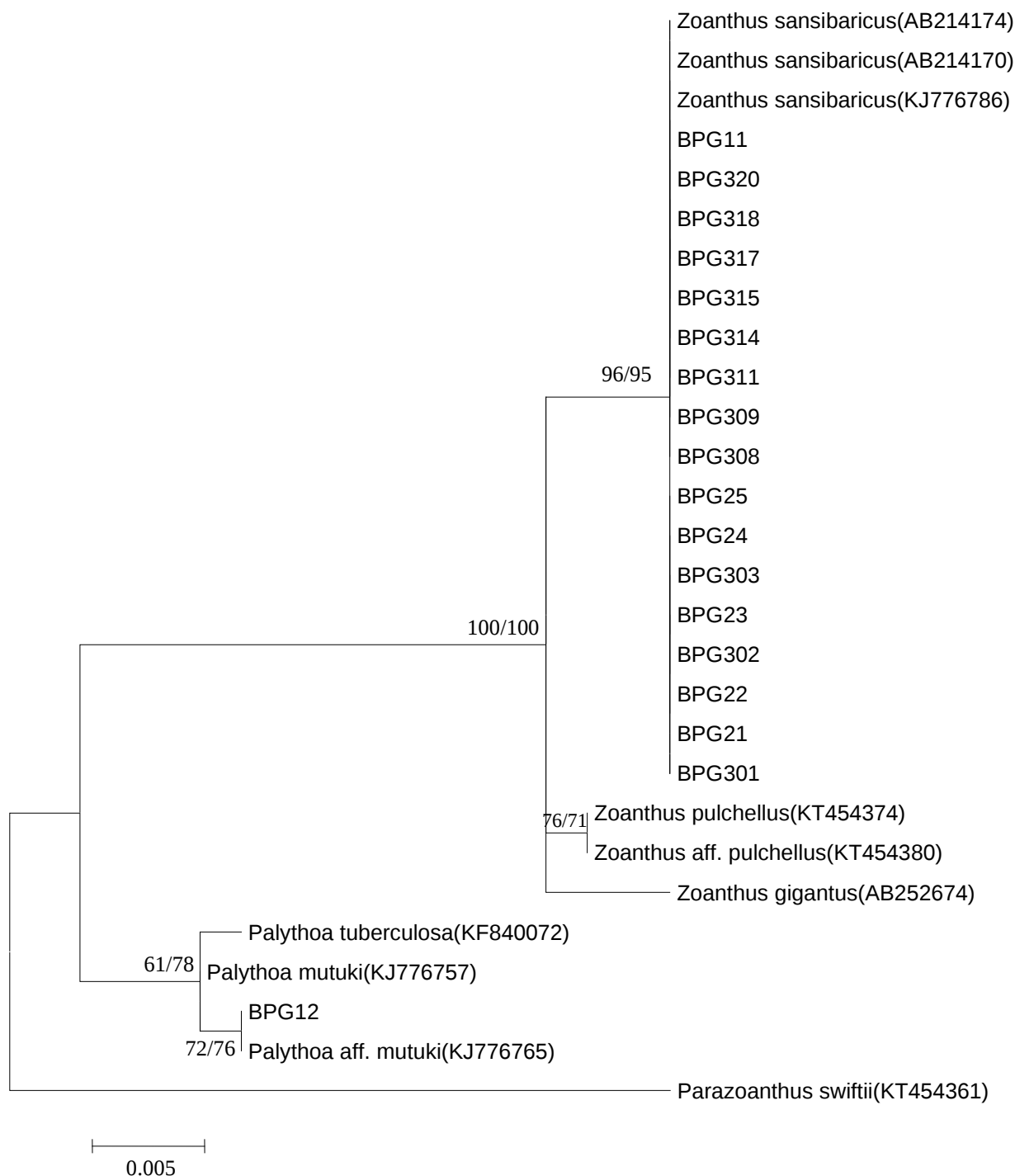
(A) *Zoanthus pulchellus* (B) *Palythoa aff. mutuki* (C) *Zoanthus sociatus* (D) *Zoanthus sansibaricus*

یافته‌ها

فیلوژنی COI

همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شده، درخت فیلوژنتیک برای مارکر میتوکندریایی COI از دو کلاد اصلی مربوط به جنس‌های *Zoanthus* و *Palythoa* تشکیل شده‌است. هر یک از این جنس‌ها یک کلادها با مقادیر بالای ارزش بوت استراپ را در آنالیزهای فیلوژنتیک نشان می‌دهند (به ترتیب ۷۸ درصد، ۱۰۰ درصد NJ، ۶۱ و ۱۰۰ درصد ML). در کلاد *Zoanthus*، تمامی نمونه‌ها دارای توالی مشابه بوده و با گونه‌های *Zoanthus sansibaricus* از ژاپن

(AB214170، AB214174) و همچنین جزیره لارک- ایران (KJ776786) یک کلاد کاملاً حمایت شده با ارزش بوت استراپ بسیار بالا تشکیل می‌دهند (۹۵ درصد NJ، ۹۶ درصد ML). نمونه BPG12 نیز در یک کلاد حمایت شده مشترک با گونه *Palythoa aff. mutuki* از جزیره هنگام- ایران (KJ776765) قرار می‌گیرد (۷۶ درصد NJ، ۷۵ درصد ML). توالی‌های مربوط به این دو گونه کاملاً مشابه بوده و با توالی (KJ776757) *Palythoa mutuki* تنها یک جفت باز تفاوت دارند.



شکل ۳) درخت Maximum likelihood بر اساس قطعه ژنی میتوکندریایی COI شامل توالی‌های جدید حاصل از مطالعه حاضر و توالی‌های پیشین ثبت شده در بانک ژن. ارزش‌های بوت استرپ به ترتیب برای ML و NJ روی گره‌ها نشان داده شده است.

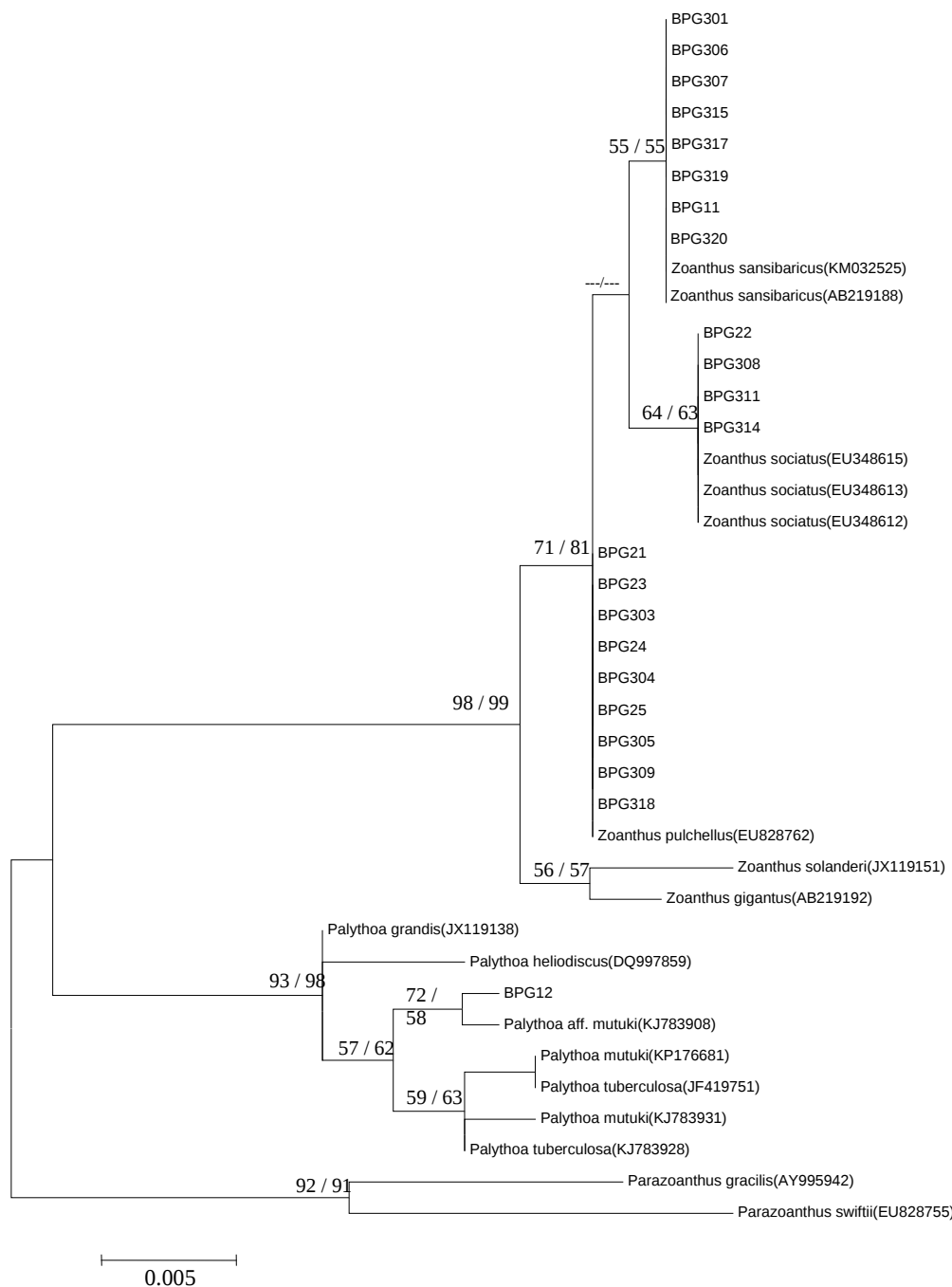
فیلوژنی 16S rDNA

درخت فیلوژنتیک برای توالی‌های هم‌ردیف شده 16S rDNA در شکل ۴ نشان داده شده است. توالی‌های قطعه ژنی 16S rDNA برای نمونه‌های مورد مطالعه در دو کلاد بزرگ مربوط به جنس‌های *Zoanthus* و *Palythoa* قرار می‌گیرند. جنس *Zoanthus* به عنوان یک کلاد کاملاً حمایت شده با ارزش بوت استراب بالا (۹۹ درصد= NJ، ۹۸ درصد= ML) خود شامل سه زیر کلاد^۱ گونه‌ای می‌باشد. توالی‌های مربوط به نمونه‌های BPG320، BPG319، BPG317، BPG315، BPG307، BPG306، BPG301 و BPG11 و مشابه توالی‌های *Zoanthus sansibaricus* گزارش شده از ژاپن (AB219188) و جنوب افریقا (KM032525) می‌باشد (۵۵ درصد= NJ، ۵۵ درصد= ML). نمونه‌های BPG311، BPG308، BPG22 و BPG314 و نیز در یک زیرکلاد حمایت شده با *Zoanthus sociatus* (EU348612، EU348613، EU348615) قرار می‌گیرند (۶۳ درصد= NJ، ۶۴ درصد= ML). نمونه‌های باقی مانده نیز دارای توالی یکسان بوده و در کلاد حمایت شده *Zoanthus pulchellus* با ارزش بوت استراب بالا و در پایه کلاد *Zoanthus sansibaricus*-*Zoanthus sociatus* قرار می‌گیرند (۸۱ درصد= NJ، ۷۱ درصد= ML). از سوی دیگر در کلاد *Palythoa*، توالی مربوط به نمونه BPG12 کاملاً مشابه نمونه *Palythoa aff. mutuki* از جزیره هنگام - ایران (KJ783908) بوده (۵۸ درصد= NJ، ۷۲ درصد= ML)

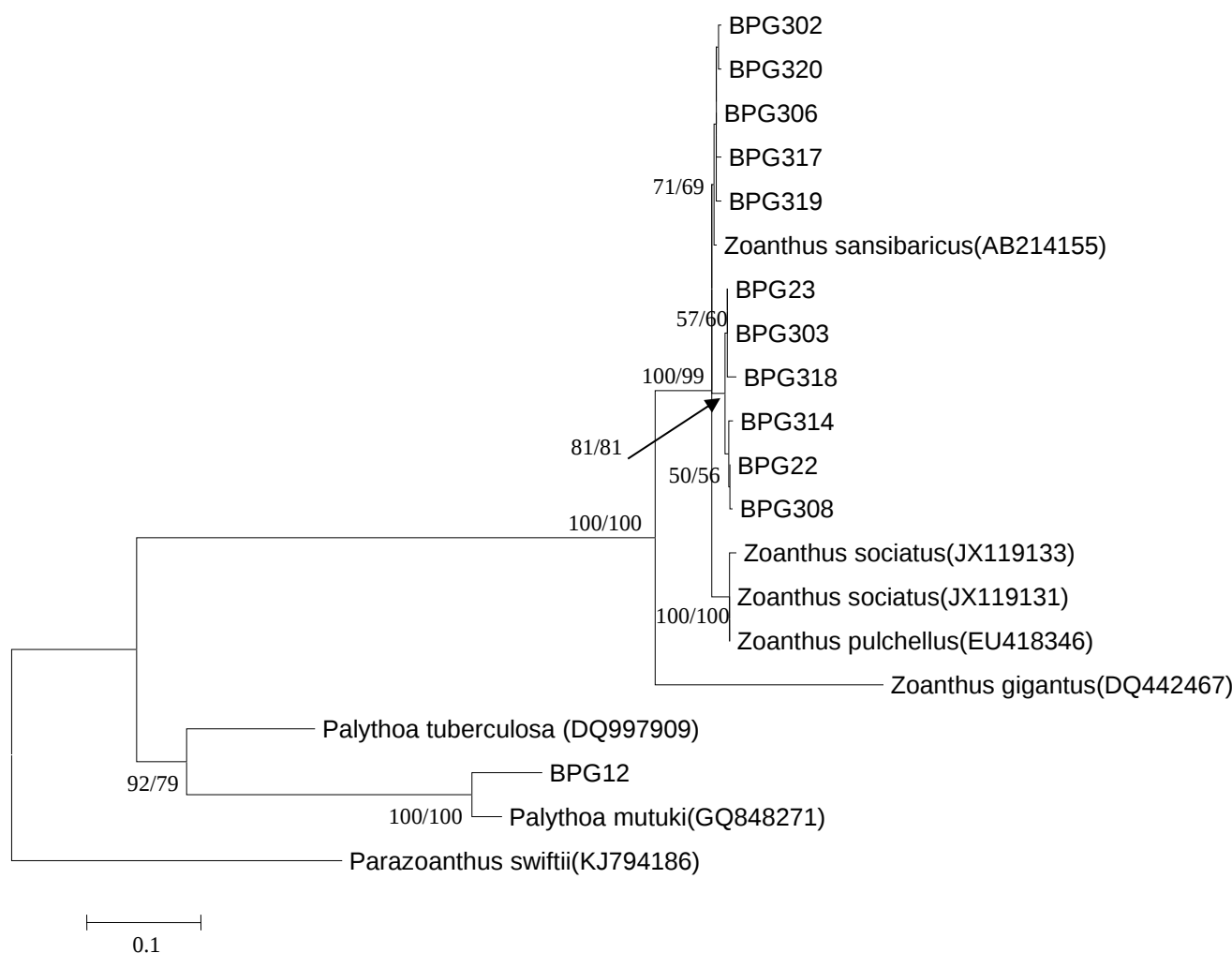
فیلوژنی ITS rDNA

توالی‌های قابل قبول ITS rDNA تنها برای تعداد کمی از نمونه‌های مورد مطالعه به دست آمد و وجود سیگنال‌های متعدد در نتایج تعیین توالی تعدادی از نمونه‌ها مانع از ورود آنها به آنالیز شد. همانطور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود درخت فیلوژنتیک رسم شده برای توالی‌های هم‌ردیف شده ITS rDNA دارای توپولوژی مشابه با درخت mt16S rDNA و با قدرت تفکیک بیشتر در سطح گونه می‌باشد. درخت رسم شده دارای دو کلاد کاملاً حمایت شده با ارزش بوت استراب بسیار بالا برای جنس‌های (۱۰۰ درصد= NJ، ۱۰۰ درصد= ML) *Zoanthus* و (۷۲ درصد= NJ، ۹۲ درصد= ML) *Palythoa* می‌باشد. در کلاد *Zoanthus* نمونه‌های BPG319، BPG317، BPG306، BPG302 و BPG320 دارای تفاوت توالی اندکی بوده و در یک کلاد حمایت شده با *Zoanthus sansibaricus* (AB214155) قرار می‌گیرند (۹۶ درصد= NJ، ۷۱ درصد= ML). نمونه‌های باقی مانده جنس *Zoanthus* نیز در یک کلاد با ارزش بوت استراب بالا (۸۱ درصد= NJ، ۸۱ درصد= ML) دارای دو زیر کلاد قرار می‌گیرند. توالی نمونه‌ها در هر یک از زیر کلادها دارای چند جفت باز تفاوت با توالی‌های *Z. pulchellus* (EU418346) و (XJ119133)، *Z. sociatus* (XJ119131) می‌باشند اما به دلیل شباهت توپولوژی با درخت mt16S rDNA به ترتیب به عنوان *Zoanthus pulchellus* و *Zoanthus sociatus* در

نظر گرفته می‌شوند. در کلاد مربوط به *Palythoa* نیز نمونه BPG12 با وجود بیش از ۱۰۰ جفت باز تفاوت توالی در یک کلاد مشترک کاملاً حمایت شده (۱۰۰٪)



شکل ۴) درخت Maximum likelihood بر اساس قطعه ژنی میتوکندریایی 16S rDNA شامل توالی‌های جدید حاصل از مطالعه حاضر و توالی‌های پیشین ثبت شده در بانک ژن. ارزش‌های بوت استرپ به ترتیب برای ML و NJ روی گره‌ها نشان داده شده است.



شکل ۵: درخت Maximum likelihood بر اساس قطعه ژنی ITS rDNA شامل توالی‌های جدید حاصل از مطالعه حاضر و توالی‌های پیشین ثبت شده در بانک ژن. ارزش‌های بوت استرپ به ترتیب برای ML و NJ روی گره‌ها نشان داده شده‌است.

بحث

خلیج فارس - بوشهر پرداختیم که منجر به شناسایی چهار گونه *Zoanthus sansibaricus*، *Zoanthus sociatus* و *Zoanthus pulchellus* از خانواده Zoanthidae و *Palythoa aff. mutuki* از خانواده Sphenopidae شد.

زوانتیدها در اکثر اکوسیستم‌های دریائی یافت می‌شوند با این وجود تاکسونومی آنها هنوز چندان سازمان یافته نیست. در حالی که بیشتر خانواده‌ها و جنس‌ها به خوبی

شناسایی دقیق گونه‌های مختلف راسته زوانتاریا بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیک دارای پیچیدگی‌های بسیار است به گونه‌ای که تنوع رنگی درون گونه‌ای شناسایی ریختی آنها را تا حدی ناممکن ساخته‌است. طی مطالعه حاضر با استفاده از روش‌های فیلوژنیک ملکولی و مارکرهای mt COI، mt 16S rDNA و ITS rDNA و به بررسی پراکنش این راسته در سواحل

توصیف شده‌اند اما تنوع گونه‌ای همچنان ناشناخته مانده است (۶). تنوع گسترده و ویژگی‌های مورفولوژیک در درون هر گونه و فقدان معیارهای صحیح جهت تفکیک گونه‌ها از یکدیگر همواره عامل اصلی این نابسامانی بوده است. شناسایی مورفولوژیک زوانتیدها همواره به واسطه داشتن ساختار ریختی بسیار ساده و رنگ‌های متنوع چالش برانگیز بوده است (۲۵ و ۲۶). در این مطالعه ضمن شناسایی اولیه بر اساس معیارهای مورفولوژیک تمامی نمونه‌های جنس *Zoanthus* به عنوان *Zoanthus sansibaricus* و *Palythoa aff. mutuki* به عنوان *Palythoa mutuki* طبقه‌بندی شدند. همانطور که اشاره شد معیارهای مورفولوژیک غالباً برای شناسایی در سطح گونه کافی نیستند با این حال مارکرهای ملکولی DNA هسته‌ای و میتوکندریایی با موفقیت برای غلبه بر این مشکل استفاده شده‌اند و قادر به شناسایی فیلوژنتیکی گونه‌های مرتبط و بسیار نزدیک به هم هستند (۱۰، ۱۳ و ۲۷).

به دلیل سرعت پایین جهش‌های میتوکندریایی در آنتوزوا، مارکرهای میتوکندریایی (COI و 16SrDNA) بسیار حفاظت شده هستند و یک تنوع کوچک (یک یا دو جفت باز در ترکیب توالی mt16SrDNA + COI) می‌تواند بیانگر تفاوت در سطح گونه باشد (۷ و ۲۸) با این حال توالی‌های 16SrDNA به علت دخول و حذف (idels) دارای تغییرپذیری بیشتری نسبت به COI در زوانتیدها هستند که اطلاعات رده‌بندی بیشتری را در مواردی که توالی‌های COI برای جداسازی گونه‌ها از یکدیگر کافی نیستند فراهم می‌کند (۱۳) با این حال برای گونه‌های نزدیک مرتبط با یکدیگر به خاطر انشعاب‌های اخیر به نظر می‌رسد که استفاده از مارکرهای میتوکندریایی به تنهایی برای اغلب زوانتیدها کافی نیست هرچند در ترکیب با موقعیت جغرافیایی، اکولوژی و

داده‌های مورفولوژیکی می‌توانیم شناسایی دقیق‌تری داشته باشیم (۲۷ و ۲۹) از سوی دیگر، به علت سرعت تکاملی سریع‌تر توالی ITS-rDNA و طبیعت نسبتاً حفاظت نشده آن به نظر می‌رسد تفکیک بیشتری در فیلوژنی داشته باشد (۲۷، ۳۰ و ۳۱) هر چند به دلیل سرعت واگرایی بالا، کپی‌های درون ژنومی چندگانه و پلی‌مورفیسم‌های اجدادی در زوانتیدها، ITS-rDNA به تنهایی به عنوان مارکر فلوژنتیک مناسب قابل استفاده نیست اما در همراهی با 16S rDNA می‌تواند در تحقیقات فلوژنتیک برای زوانتیدها مفید باشد (۳۰). مشابه مطالعات پیشین، نتایج مطالعه حاضر حاکی از آن است که فیلوژنی بر اساس مارکر COI نمونه‌ها را به دو جنس *Zoanthus* و *Palythoa* (گونه *Palythoa aff. mutuki*) تقسیم می‌کند اما قادر به تشخیص بین گونه‌ها در جنس *Zoanthus* نمی‌باشد. از سوی دیگر درخت فیلوژنتیک ترسیم شده با استفاده از توالی‌های 16S rDNA میتوکندریایی وجود سه گونه را در کلاد *Zoanthus* نشان می‌دهد: *Z. sansibaricus*، *Z. sociatus* و *Z. pulchellus*. درخت فیلوژنتیک ITS-rDNA نیز دارای توپولوژی مشابه 16S rDNA بوده و وضوح نسبتاً بیشتری در فیلوژنی با ارزش بوت استرپ بالاتر را نشان می‌دهد.

کوهپایه‌ای و همکاران در جزیره قشم بر اساس مارکر میتوکندریایی mt16SrDNA سه گونه *Zoanthus sansibaricus*، *Palythoa tuberculosa* و *Palythoa aff. Mutuki* را گزارش کردند (۱۴). در مطالعه دیگر مربوط به این گروه بر اساس مارکرهای میتوکندریایی COI و 16SrDNA در جزایر هنگام، لارک و تنگه هرمز نیز پنج گونه *Z. sansibaricus*، *Palythoa aff. Mutuki*، *P. tuberculosa* و *Neozoanthus sp.* شناسایی شدند (۱).

گونه *Palythoa aff. mutuki* و *Zoanthus pulchellus* را در آب‌های کم عمق ساحل بوشهر اثبات می‌کند. شناسایی اولیه بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیک قادر به شناخت صحیح گونه‌ها نبوده با این حال، نتایج حاکی از کارایی مارکرهای مولکولی DNA، بویژه mt16SrDNA و ITS-rDNA جهت شناسایی در سطح گونه می‌باشد. به هر حال به منظور تعیین الگوی پراکنش گونه‌های زوانتاریا در خلیج فارس نیاز به انجام مطالعات بیشتر در دیگر مناطق ضروری می‌باشد.

سپاس و قدردانی

بدین‌وسیله نویسندگان مراتب سپاس و قدردانی خود را از دکتر آتوسا نوری کوپایی به سبب راهنمایی‌های ارزنده‌شان طی این مطالعه و همچنین آقایان مهدی مرادی و محمدصادق خوشکار جهت جمع‌آوری نمونه‌ها ابراز می‌دارند. این پژوهش با استفاده از بودجه تحقیقاتی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر به انجام رسیده است و همچنین بخشی از این پروژه، با حمایت‌های کرسی پژوهشی دریایی، (مصوب صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور) معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری به انجام رسید.

تضاد منافع

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

گونه *Palythoa aff. mutuki* شناسایی شده در این مطالعه دارای توالی یکسان با گونه پیشتر گزارش شده در خلیج فارس توسط نوری و همکاران بوده و تفاوت توالی قابل توجهی با *Palythoa mutuki* و دیگر گونه‌های *Palythoa* دارد. در مطالعه حاضر دو گونه جدید از جنس *Zoanthus* (*Z. pulchellus* و *Z. sociatus*) نیز برای نخستین بار در ساحل بوشهر شناسایی شدند. گونه کمتر گزارش شده *Z. pulchellus* در فلوریدا توسط ریمر و همکاران بر اساس نشانگرهای میتوکندریایی، COI، mt16SrDNA و ITS rDNA (۲۷) و در هند برای نخستین بار در سال ۲۰۱۵ بر اساس ویژگی‌های ریخت شناسی (۳۲) شناسایی شده‌است.

گونه‌های زوانتاریا توزیع گسترده‌ای در نواحی گرمسیری و نیمه‌گرمسیری دنیا دارند (۳۳) بررسی گسترش جهانی نشان می‌دهد گونه *Zoanthus sansibaricus* در اقیانوس آرام غربی و شرقی به عنوان مثال سد بزرگ مرجانی (۱ و ۳۴)، نیوکالدونیا (۳۵)، ژاپن (۶ و ۹)، گالاپاگوس (۱۰)، سنگاپور (۸) و اقیانوس هند و گونه *Zoanthus sociatus* در شمال شرق اقیانوس اطلس (۱۱)، فلوریدا (۲۷)، برزیل (۳۶) یافت می‌شوند.

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر وجود چهار گونه *Zoanthus sociatus*، *Zoanthus sansibaricus*

References:

1. Burnett W, Benzie J, Beardmore J, et al. Zoanthids (Anthozoa, Hexacorallia) from the Great Barrier Reef and Torres Strait, Australia: systematics, evolution and a key to species. Coral Reefs 1997; 16(1): 55-68.
2. Reimer JD, Irei Y, Fujii T. Two new species of Neozoanthus (Cnidaria, Hexacorallia, Zoantharia) from the Pacific. ZooKeys 2012; (246): 69-87.
3. Miyashita M, Sasaki M, Hattori I, et al. Total synthesis of norzoanthamine. Science 2004; 305(5683): 495-9.
4. Fujii T, Reimer JD. Phylogeny of the highly divergent zoanthid family Microzoanthidae (Anthozoa, Hexacorallia) from the Pacific. Zool Scr 2011; 40(4): 418-31.
5. Behenna DC, Stockdill JL, Stoltz BM. The biology and chemistry of the zoanthamine

- alkaloids. *Angew Chem Int Ed Engl* 2008; 47(13): 2365-86.
6. Reimer JD, Ono S, Iwama A, et al. Morphological and molecular revision of *Zoanthus* (Anthozoa: Hexacorallia) from southwestern Japan, with descriptions of two new species. *Zoolog Sci* 2006; 23(3): 261-75.
 7. Shearer T, Van Oppen M, Romano S, et al. Slow mitochondrial DNA sequence evolution in the Anthozoa (Cnidaria). *Mol Ecol* 2002; 11(12): 2475-87.
 8. Reimer JD, Todd PA. Preliminary molecular examination of zooxanthellate zoanthid (Hexacorallia, Zoantharia) and associated zooxanthellae (*Symbiodinium* spp.) diversity in Singapore. *Raffles Bull Zool* 2009; 22: 103-20.
 9. Reimer JD, Ono S, Fujiwara Y, et al. Reconsidering *Zoanthus* spp. diversity: molecular evidence of conspecificity within four previously presumed species. *Zoolog Sci* 2004; 21(5): 517-25.
 10. Reimer J, Sinniger F, Hickman Jr C. Zoanthid diversity (Anthozoa: Hexacorallia) in the Galapagos Islands: a molecular examination. *Coral Reefs* 2008; 27(3): 641-54.
 11. Reimer JD, Hirose M, Wirtz P. Zoanthids of the Cape Verde Islands and their symbionts: previously unexamined diversity in the Northeastern Atlantic. *Contrib zool* 2010; 79(4): 147-63.
 12. Reimer JD, Hirose M, Yanagi K, et al. Marine invertebrate diversity in the oceanic Ogasawara Islands: a molecular examination of zoanthids (Anthozoa: Hexacorallia) and their *Symbiodinium* (Dinophyceae). *Syst Biodivers* 2011; 9(2): 133-43.
 13. Reimer JD, Irei Y, Fujii T, et al. Molecular analyses of shallow-water zooxanthellate zoanthids (Cnidaria: Hexacorallia) from Taiwan and their *Symbiodinium* spp. *Zool Stud* 2013; 52(1): 38.
 14. Koupaei AN, Mostafavi PG, Mehrabadi JF, et al. Molecular diversity of coral reef-associated zoanthids off Qeshm Island, northern Persian Gulf. *International Aquatic Research* 2014; 6(2): 1-10.
 15. Koupaei AN, Mostafavi PG, Mehrabadi JF, et al. Diversity of shallow water zoantharians in Hengam and Larak Islands, in the Persian Gulf. *J Mar Biol Assoc U.K.* 2015: 1-11.
 16. Baker AC. The symbiosis ecology of reef-building corals [dissertation]. United States: University of Miami, 1999.
 17. Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol* 1994; 3(5): 294-9.
 18. Sinniger F, Montoya-Burgos J-I, Chevaldonné P, et al. Phylogeny of the order Zoantharia (Anthozoa, Hexacorallia) based on the mitochondrial ribosomal genes. *Mar Biol* 2005; 147(5): 1121-8.
 19. Reimer JD, Takishita K, Ono S, et al. Molecular evidence suggesting interspecific hybridization in *Zoanthus* spp. (Anthozoa: Hexacorallia). *Zoolog Sci* 2007; 24(4): 346-59.
 20. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994; 22(22): 4673-80.
 21. MrModeltest2., C program for selecting DNA substitution models using PAUP*. (Accessed May 5, 2018, at <https://github.com/nylander/MrModeltest2/>).
 22. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 1980; 16(2): 111-20.
 23. Tamura K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+ C-content biases. *Mol Biol Evol* 1992; 9(4): 678-87.
 24. Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 2013; 30(12): 2725-9.

25. Swain TD. Isozoanthus antumbrosus, a new species of zoanthid (Cnidaria: Anthozoa: Zoanthidea) symbiotic with Hydrozoa from the Caribbean, with a key to hydroid and sponge-symbiotic zoanthid species. Zootaxa 2009; 2051: 41-8.
26. Ong CW, Reimer JD, Todd PA. Morphologically plastic responses to shading in the zoanthids Zoanthus sansibaricus and Palythoa tuberculosa. J Mar Biol 2013; 160(5): 1053-64.
27. Reimer JD, Foord C, Irei Y. Species diversity of shallow water zoanthids (Cnidaria: Anthozoa: Hexacorallia) in Florida. J Mar Biol 2012; 2012.
28. Huang D, Meier R, Todd PA, et al. Slow mitochondrial COI sequence evolution at the base of the metazoan tree and its implications for DNA barcoding. J Mol Evol 2008; 66(2): 167-74.
29. Sinniger F, Reimer JD, Pawlowski J. Potential of DNA sequences to identify zoanthids (Cnidaria: Zoantharia). Zoolog Sci 2008; 25(12): 1253-60.
30. Reimer J, Takishita K, Ono S, et al. Diversity and evolution in the zoanthid genus Palythoa (Cnidaria: Hexacorallia) based on nuclear ITS-rDNA. Coral Reefs 2007; 26(2): 399-410.
31. Swain TD. Phylogeny-based species delimitations and the evolution of host associations in symbiotic Zoanthusids (Anthozoa, Zoanthidea) of the wider Caribbean region. Zool J Linn Soc 2009; 156(2): 223-38.
32. Mehra R, Yadav DS, Kundu P, et al. First report of Zoanthus pulchellus from India. J Mar Biotechnol 2015 ;1(1):1-4.
33. Reimer JD, Ishikawa SA, Hirose M. New records and molecular characterization of Acrozoanthus (Cnidaria: Anthozoa: Hexacorallia) and its endosymbionts (Symbiodinium spp.) from Taiwan. Marine Biodiversity 2011; 41(2): 313-23.
34. Ryland JS, Lancaster JE. Revision of methods for separating species of Protopalythoa (Hexacorallia: Zoanthidea) in the tropical West Pacific. Invertebr syst 2003; 17(3): 407-28.
35. Sinniger F. Zoantharia of New Caledonia. Compendium of marine species from New Caledonia Documents scientifiques et techniques II 2006; 7: 127-8.
36. Santos MEA, Kitahara MV, Lindner A, et al. Overview of the order Zoantharia (Cnidaria: Anthozoa) in Brazil. Marine Biodiversity 2016; 46(3): 547-59.

Original Article

Molecular Identification of Shallow Water Zoanthids in the Coast of Bushehr- Persian Gulf

M. Darvishi (MSc)¹, M. Moradinasab (MSc)^{2*}, S.J. Hosseini (PhD)³,
R. Mohammadnia (DVM)⁴, Z. Aminikhoei (PhD)⁵, S. Nasri (PhD)¹,
I. Nabipour (MD)⁶

¹ Department of Biology, School of Science, Tehran Payame NOOR University, Tehran, Iran

² The Persian Gulf Tropical Medicine Research Center, The Persian Gulf Biomedical Sciences Research Institute, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran

³ Department of Biotechnology, Persian Gulf Research Institute, Persian Gulf University, Bushehr, Bushehr, Iran

⁴ Bushehr Veterinary Organization, Bushehr, Iran

⁵ Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Iranian Fisheries Science Research Institute (IFRSI), Offshore Research Center, Chabahar, Iran

⁶ The Persian Gulf Marine Biotechnology Research Center, The Persian Gulf Biomedical Sciences Research Institute, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran

(Received 27 Nov, 2017

Accepted 12 Feb, 2018)

Abstract

Background: The order zoantharia (Cnidaria: Anthozoa) which is one of the most unexplored orders are present in the Persian Gulf. This group of cnidarians commonly found in tropical waters at various places in the world and morphological identification to the species level is extremely complicated. In the present study, molecular diversity of shallow water zoanthids from the Bushehr coasts in the Persian Gulf was investigated for the first time.

Materials and Methods: Twenty-four colonies of zoanthids with variety of shape and colors have been collected from different locations. After DNA extraction using CTAB-Phenol-Chloroform method, mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (COI), mitochondrial 16S ribosomal DNA (mt 16S rDNA) and the nuclear internal transcribed spacer region of ribosomal DNA (ITS-rDNA) were amplified using polymerase chain reaction (PCR) technique.

Results: Based on the obtained sequences, the presence of four species-level clades: *Zoanthus sansibaricus*, *Zoanthus pulchellus*, *Zoanthus sociatus* and *Palythoa aff. mutuki*. *Palythoa aff. mutuki* species observed in this study had identical sequences with previously reported *Palythoa aff. mutuki* in the Persian Gulf. Nevertheless, in the present study two new undescribed species from genus *Zoanthus* (*Z. sociatus* and *Z. pulchellus*) were identified.

Conclusion: The results of the present study indicate the efficiency of molecular markers application in comparison with morphological characteristics to identify zoantharia, especially at the species level. Undoubtedly, more studies on zoanthids distribution patterns will increase our knowledge about the biodiversity of the Persian Gulf.

Key words: Zoantharia, COI, mt 16S rDNA, ITS-rDNA, Persian Gulf

©Iran South Med J. All rights reserved.

Cite this article as Darvishi: M, Moradinasab M, Hosseini SJ, Mohammadnia R, Aminikhoei Z, Nasri S, Nabipour I. Molecular Identification of Shallow Water Zoanthids in the Coast of Bushehr- Persian Gulf. Iran South Med J 2018; 21(2): 147-161

Copyright © 2018 Darvishi, 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: The Persian Gulf Tropical Medicine Research Center, The Persian Gulf Biomedical Sciences Research Institute, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran. Email: m.moradinasab85@gmail.com-ORCID: 0000-0002-1330-835X

Website: <http://bpums.ac.ir>

Journal Address: <http://ismj.bpums.ac.ir>