

Phylogeny and morphology assessment of a brittle star species *Ophiothrix* sp. (Echinodermat: Ophiuroidea) based on *COI* gene sequence from Chabahar Bay (Oman Sea: Iran)

Gilan Attaran-Fariman^{1*}, Azadeh Beyg-Moradi², Hassan Zadeh-Abbas Shahabadi³

1. Assistant Professor, University of Chabahar Maritime and Marine Science, College of Marine Science and Technology, Department of Marine, Iran
 2. Former M. Sc. Student, University of Chabahar Maritime and Marine Science, College of Marine Science and Technology, Department of Marine, Iran
 3. Former M. Sc. Student, University of Chabahar Maritime and Marine Science, College of Marine Science and Technology, Department of Marine, Iran
- (Received: Nov. 9, 2015 - Accepted: May 6, 2017)

Abstract

Brittle stars belonging to family Ophiotrichidae and genus *Ophiothrix* are of common species in the intertidal zones and coral reefs of tropical region. Members of genus *Ophiothrix* are well distributed in Chabahar Bay at northern coast of Oman sea. These species morphologically are very similar to species of genus *Macrophiothrix* because of that often separating them based on morphological characteristics is difficult. That is why their accurate classification requires detailed morphological and molecular studies simultaneously. Sampling was taken place in Tis (Chabahar Bay) to study the morphology and Phylogeny of brittle stars based on *COI* gene sequence. Morphologically, this species has a five-lobed disc, trapezoidal arm plates and rectangular abdominal plates both are granular. Also, according to the results of molecular analysis *Ophiothrix* sp. With 49% bootstrap is supported in the clade of genus *Ophiothrix* and shows a monophyletic relationship with members of this genus. Although it is weakly supported, it seems that this species is a new species which due to the lack of studies about brittle stars of this region remains unknown.

Keywords: Brittle star, Chabahar Bay, morphology, *Ophiothrix* sp., phylogeny.

بررسی ریخت‌شناسی و تبار‌زایی ستاره شکننده (*Echinodermat: Ophiothrix* sp.) Ophiuroidea بر اساس توالی ژنی سیتوکروم اکسیداز C زیر واحد I از خلیج چابهار (دریای عمان، ایران)

گیلان عطاران فریمان^{۱*}، آزاده بیگ مرادی^۲،

حسن زاده‌عباس شاه‌آبادی^۳

۱. استادیار، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، دانشکده علوم

دریایی، گروه زیست دریا، ایران

۲. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی

چابهار، دانشکده علوم دریایی، گروه زیست دریا، ایران

۳. کارشناس ارشد دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، دانشکده علوم

دریایی، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۸/۱۸ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۶/۲/۱۶)

چکیده

ستاره‌های شکننده جنس *Ophiothrix* متعلق به خانواده *Ophiotrichidae* از گونه‌های رایج در مناطق بین جزرومدی و صخره‌های مرجانی مناطق گرمسیری می‌باشند. اعضای این جنس در خلیج چابهار از سواحل ایرانی شمال دریای عمان توزیع و پراکنش خوبی دارند. مارسانان جنس *Ophiothrix* از لحاظ ظاهری بیشترین شباهت را به جنس *Macrophiothrix* دارند و اغلب اوقات تفکیک آنها بر اساس شکل ظاهری شانبا مشکل مواجه می‌شود. بنابراین رده بندی و تاکسونومی دقیق آنها مستلزم هر دو روش ریخت‌شناسی و مولکولی در کنار هم می‌باشد. نمونه‌های ستاره شکننده از منطقه تیس واقع در خلیج چابهار به منظور بررسی ریخت‌شناسی و تبارزایی بر اساس توالی ناحیه ژنی *COI* جمع‌آوری گردید. توالی ژنی گونه‌ی ایران با ۱۸ توالی دیگر از بانک ژن در ناحیه ژنی *COI* مقایسه شد. درخت شجره‌شناسی با استفاده از آنالیز حداکثر احتمال (Maximum Likelihood) ترسیم گردید. نتایج تحقیق نشان داد که گونه تحقیق حاضر از لحاظ ریخت‌شناسی دارای یک دیسک پنج لوبی و صفحات بازویی و شکمی به ترتیب دارای اشکال دوزنقه‌ای و مستطیلی با پوشش کاملا گرانولی می‌باشد. هم‌منظور نتایج بررسی مولکولی نشان داد که گونه *Ophiothrix* sp. با ۴۹٪ بوت استرپ در کلاد جنس *Ophiothrix* پشتیبانی و رابطه تک‌نیایی را نشان می‌دهند. اگرچه به طور ضعیف حمایت می‌شود اما به نظر می‌رسد گونه ایرانی جدیدی در این جنس باشد که به دلیل کمبود مطالعات تاکنون ناشناخته باقی‌مانده است.

واژه‌های کلیدی: ستاره شکننده، ریخت‌شناسی، تبارزایی، *Ophiothrix* sp.، خلیج چابهار.

مقدمه

کرده است، و نمی‌توان دقیق گفت که به دلیل عدم صفات مورفولوژیکی واضح پس تفاوت ژنتیکی نیز ندارند (Stöhr *et al.*, 2012). بنابراین شناسایی دقیق آنها با بررسی‌های مورفولوژیکی و مولکولی در کنار هم صورت می‌گیرد. در این تحقیق قطعه ژنی *COI* به‌عنوان نشانگر ژنتیکی مورد بررسی قرار گرفت (Rokas *et al.*, 2003; Tsaousis *et al.*, 2005)، زیرا ژن *COI* دارای یک منطقه کدکننده پروتئین با نرخ جهش‌های مختلف می‌باشد و این ژنوم امکان عملکرد بیشتری از کپی‌سازی DNA نمونه را دارد. علاوه بر این ژن *COI* توالی مربوط به mtDNA را کد می‌کند از آنجایی که mtDNA فاقد نوترکیبی بوده و تنوع بین‌گونه‌ای در آن کم می‌باشد پس در نتیجه ما را به شناسایی دقیق گونه سوق می‌دهد (Avisé *et al.*, 1991; Cronin *et al.*, 1984). در ایران تاکنون بررسی فیلوژنی ستاره‌های شکننده صورت نگرفته است و اطلاعاتی از ذخایر ژنتیکی این بی‌مهرگان آبی وجود ندارد. در مطالعه حاضر، برای اولین بار به بررسی فیلوژنتیکی ستاره شکننده *Ophiothrix* sp. با استفاده از توالی ژنی ناحیه *COI* از سواحل ایرانی ناحیه خلیج چابهار پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

پنج نمونه ستاره‌های شکننده در مهر ماه ۱۳۹۲ به صورت دستی از منطقه بین جزر و مدی اسکله تیس (E ۵۲° ۰۱' ۳۶" و N ۲۵° ۲۱' ۲۰" ۶۶") از خلیج چابهار واقع در دریای عمان (سواحل ایرانی) با بستر سنگی - قله سنگی از زیر سنگ‌ها جمع‌آوری شدند (شکل ۱). سپس نمونه‌ها به منظور بررسی‌های ریخت‌شناسی و مولکولی به آزمایشگاه منتقل شدند. ابتدا ویژگی‌های ریخت‌شناسی تمام نمونه‌ها با استفاده از استریومیکروسکوپ مدل C-DS مجهز به دوربین مدل T4AL250 V (21 V 150 W) مطالعه شد. سپس به منظور بررسی‌های DNA نمونه‌ها دو عدد ستاره شکننده با استفاده از روش Sambrook *et al.*

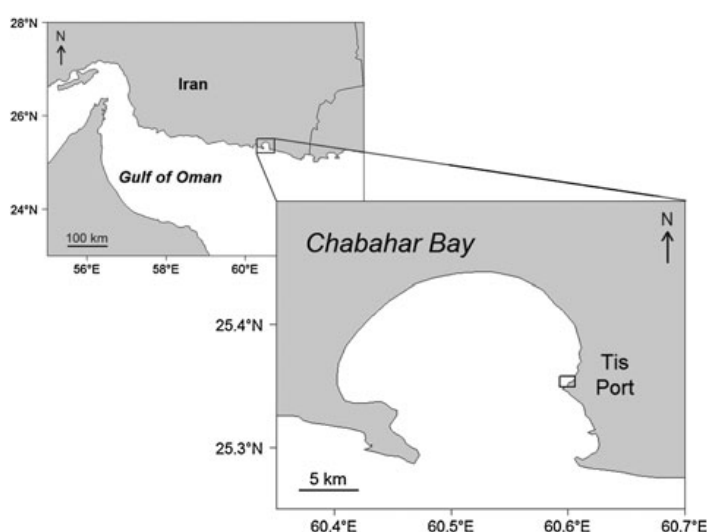
خلیج چابهار در قسمت شمالی دریای عمان از سواحل ایرانی واقع شده است که شامل زیستگاه‌های متنوعی از قبیل صخره‌ای، شنی، گلی، مانگرو و غیره می‌باشد که این عوامل باعث پراکنش موجودات فراوانی از جمله ماهیان، نرم‌تنان، سخت‌پوستان، خارپوستان و غیره شده است. از رده مارسانان این خلیج تاکنون چهار گونه ستاره شکننده شامل *Macrophiothrix elongata* H.L. Clark, 1938 و *Ophiothrix savignyi* (Müller & Troschel, 1842) توسط Khaleghi & Owfi (2011) و *Ophioreis dubia* (Müller & Troschel, 1842) توسط Attaran-Fariman *et al.* (2014) و گونه *Macrophiothrix cheneyi* (Lyman, 1862) توسط Khaleghi *et al.* (2011)، ۱۳۹۴ گزارش شده است. گونه *O. savignyi* از ستاره‌های شکننده رایج در صخره‌های زیر جزر و مدی، بسترهای سنگی، شنی و گلی می‌باشد. Price (1981)، ۳۷۹ نمونه از آن را از چندین ایستگاه در خلیج فارس از عمق صفر تا ۳۲ متری گزارش کرد. با توجه به اینکه شاخه خارپوستان دارای گونه‌های فراوانی می‌باشد اما مطالعات فیلوژنتیکی و مولکولی بر روی آنها بخصوص در رده مارسانان خیلی کم انجام شده است (Hart *et al.*, 2005). ارتباط فیلوژنتیکی دقیق بین ستاره‌های شکننده با رده‌های دیگر از خارپوستان به دلیل تناقض بین شواهد مولکولی و ریخت‌شناسی تاکنون نامشخص و به صورت لاینحل باقی مانده است (Littlewood *et al.*, 1997; Harmon, 2005). محققینی که بر روی تبارزایی ستاره‌های شکننده کار کردند اصطلاح گونه‌های کریپتیک را برای آنها پیشنهاد کرده‌اند (Boissin *et al.*, 2008). این احتمال وجود دارد که عدم صفات مورفولوژیکی واضح در بین مارسانان بخصوص در ستاره‌های شکننده جنس‌های *Ophiothrix* و *Macrophiothrix* شناسایی آنها را دچار مشکل

E_BOX_VX2/2M بررسی و جهت عملیات بعدی در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. بسط و توسعه قسمتی از ژن میتوکندریایی COI با استفاده از آغازگرهای اختصاصی موجود در جدول ۱ انجام گرفت.

(1989) استخراج گردید. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به ترتیب با دستگاه اسپکتروفتومتر مدل RS232C و الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ سنجیده شد. باندهای DNA با استفاده از دستگاه ژل داک مدل

جدول ۱. پرایمر مورد استفاده در PCR

پرایمر	توالی از 5' → 3'	طول قطعه	منبع
Echino COI-F	TTTCYACYAAACACAAGGAYATTGG	۷۵۰ bp	Heimeier <i>et al.</i> , 2010
Echino COI-R	TAAACTTCHGGRTGDCCAAARAATCA		



شکل ۱. موقعیت جغرافیایی منطقه نمونه‌برداری (Attaran Fariman *et al.*, 2014)

dNTPs، MgCl₂ 50 mM، PCR Buffer 10 X، Taq DNA Polymerase 10 mM، آغازگرها و 5 unit مورد استفاده قرار گرفتند. در سیکل حرارتی Echino داده شده به دستگاه PCR برای آغازگر COI F,R بر اساس جدول ۲ انجام گرفت.

هر واکنش زنجیره ای پلیمرز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر مدل eppendorf 5331 انجام شد. در هر واکنش ۱۵ نانوگرم DNA استخراج شده در حجمی ۵۰ میکرولیتری به‌عنوان نمونه الگو استفاده شد. در این واکنش علاوه بر DNA استخراجی،

جدول ۲. سیکل حرارتی PCR

	واسرشته سازی اولیه	واسرشته سازی	اتصال (الحاق)	بسط پلیمرز	بسط نهایی
دما (°C)	۹۴	۹۴	۴۵	۷۲	۷۲
زمان	۳min	۱min	۴۵s	۱min	۷Min
۳۵ سیکل					

آگارز ۱٪، نمونه‌ها پس از Clean up، برای تعیین توالی از طریق شرکت سینا ژن به کشور انگلستان

پس از اطمینان از صحت محصولات PCR و تکثیر باندهای مورد نظر به کمک الکتروفورز روی ژل

Family: *Ophiotrichidae* Ljungman, 1867

Genus: *Ophiothrix* Lütken, 1859

Ophiothrix sp.

شکل کلی موجود شامل یک دیسک مرکزی به قطر متوسط ۱۵ (n=5) میلی‌متر با پنج بازو به طول متوسط ۱۱ سانتی‌متر حول آن می‌باشد. دیسک از ناحیه پشتی پنج لوبی شکل، متورم، گرانولی و به رنگ قهوه‌ای تیره با لکه‌های مشکی می‌باشد (شکل ۲-A). دیسک از ناحیه دهانی به رنگ کرم و صورتی شفاف، با منطقه بین بازویی به رنگ مشکی می‌باشد (شکل ۲-B). در راس هر آرواره چندین پاییلای دندانی قرار دارد که تا عمق دهان کشیده شده‌اند. پاییلای دندانی کوتاه و با ظاهری مستطیلی شکل می‌باشند پاییلای دهانی وجود ندارد (شکل ۲-C). سپرهای شعاعی ظاهری سه پرچمی و برجسته دارند (شکل ۲-D). سپر دهانی به شکل چهار ضلعی با حاشیه دیستال و پروگزیمال گرد می‌باشد. بر روی هر سپر شعاعی یک خال بزرگ تیره وجود دارد. منطقه بین بازویی همانند پوشش دیسک از ناحیه پشتی و همراه با دو شکاف تناسلی می‌باشد (شکل ۲-E). صفحات بازویی از ناحیه پشتی دوزنقه ای شکل، به رنگ کرم و مشکی، شفاف و با یک خط میانی با حاشیه مشکی می‌باشند که در امتداد بازو کشیده شده است (شکل ۲-F). صفحات بازویی از ناحیه دهانی مستطیلی شکل با حاشیه دیستال و پروگزیمال گرد، به رنگ سفید با لبه مقعر و به هم پیوسته می‌باشند. صفحات جانبی بازو به رنگ صورتی روشن می‌باشند، که پنج خار دندانه‌دار با لبه ضخیم و نامنظم بر روی هر بخش از صفحه جانبی قرار گرفته است. هر بخش دارای دو فلس تتاکل نامشخص می‌باشد. اندازه بزرگترین خار تقریباً دو برابر عرض یک صفحه بازویی می‌باشد (شکل ۲-G).

مقایسه توالی ژنی و آنالیزهای تبارزایی گونه ایرانی با ۱۸ گونه از بانک ژن در منطقه ژنی مشابه نشان داد که گونه ایرانی از خلیج چابهار با ۴۹٪ بوت استرپ در کلاد جنس *Ophiothrix* از خانواده

فرستاده شدند. نتایج به دست آمده از تعیین توالی محصولات با استفاده از نرم‌افزارهای مرتبط مورد آنالیزهای تبارشناسی قرار گرفت. در این پژوهش از نرم‌افزارهای MEGA Ver 5 (Kumar et al., 1994) BioEdit Ver 7.0 (Hall, 1999) و ClustalX (Jeanmougin et al., 1998) استفاده شد. جدول فواصل ژنتیکی با برنامه MEGA 5 مدل Pairwise Distances رسم گردید. با استفاده از ویرایشگر BioEdit خطاهای موجود در ترازبندی اصلاح شد. برنامه Clustal علاوه بر ترازبندی پایه اجازه می‌دهد تا ترازهای تکراری از مناطق دلخواه انتخاب شده و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک پایه صورت گیرد (Hall, 2000). درخت تبارشناسی مربوط به گونه *Ophiothrix* sp. ایرانی با استفاده از روش حداکثر احتمال Maximum Likelihood مدل Tamura-Nei با ۱۰۰۰ بوت استرپ رسم گردید. روش Maximum Likelihood جامع، گسترده، ساده و ارزان می‌باشد. در اکثر مطالعات فیلوژنتیکی بر روی ستاره شکننده درخت تبارشناسی با این روش رسم شده است. این نرم‌افزار شامل ابزارهایی جهت هم‌ترازی توالی‌ها، رسم و بازسازی درخت فیلوژنتیکی، آزمودن فرضیات تکاملی، تخمین واگرایی توالی‌ها و همچنین دارای سیستم‌هایی جهت ارائه توضیحات در مورد روش‌های آنالیز و داده‌ها می‌باشد (Tamura et al., 2011). توالی ژنی در ناحیه COI گونه *Ophiothrix* sp. با ۱۸ گونه ستاره شکننده در ناحیه ژنی مشابه که نتیجه بلاست در بانک جهانی ژن بود، مقایسه گردید. در این بررسی ستاره دریایی گونه *Astropecten indicus* از رده ستاره‌سانان و خانواده Astropectinidae به‌عنوان برون گروه در نظر گرفته شده است.

نتایج

رده‌بندی و موقعیت سیستماتیک

Class: Ophiuroidea

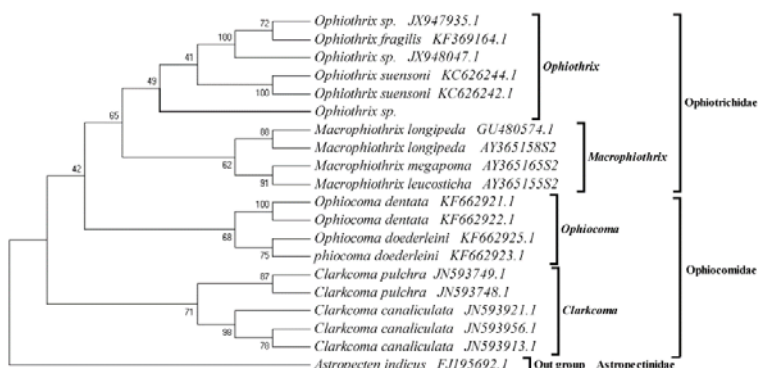
Order: Ophiurida

دو جنس *Ophiocoma* و *Clarkcoma* می‌باشند. گونه ایرانی با ۵ گونه ستاره شکننده از جنس *Ophiothrix* در خانواده Ophiotrichidae قرار می‌گیرند.

Ophiotrichidae حمایت می‌شود (شکل ۳). گونه‌هایی که در این درخت آمده‌اند متعلق به خانواده Ophiotrichidae با دو جنس *Ophiothrix* و *Macrophiothrix* و خانواده Ophiocomidae با



شکل ۲. ریخت‌شناسی *Ophiothrix* sp. A: موجود از نمای پشتی؛ B: موجود از نمای شکمی؛ C: ناحیه دهانی، ۱- آرواره ۲- پایلای دندان؛ D: سپر شعاعی و جزئیات مربوط به آن؛ E: سپر دهانی ۲- منطقه بین بازویی ۳- شکاف تناسلی؛ F: صفحات پشتی بازو؛ G: صفحه شکمی بازو ۲- صفحه جانبی بازو ۳- خار بازو. مقیاس اندازه گیری: A, B: 5 mm; C-D: 500 μ m (x1); E-G: 200 μ m (X1)



شکل ۳. درخت تبارزایی گونه *Ophiothrix* sp. ایرانی بر اساس توالی ژنی در ناحیه COI با استفاده از روش Maximum Likelihood. بوت استرپ بر اساس ۱۰۰۰ رونوشت می‌باشد. گونه *Astropecten indicus* نیز به عنوان برون گونه در نظر گرفته شده است.

جدول ۳. اندازه‌گیری مورفومتریک بخش‌های انتخابی بدن *Ophiothrix* sp. (n=5) یافت شده از خلیج چابهار

ویژگیها	طول/عرض	حداکثر	حداقل	میانگین	انحراف معیار
قطر دیسک (mm)		۱۷	۱۲	۱۴/۸	۱/۹
بازو (cm)	طول	۱۳	۹	۱۱/۴	۱/۳
صفحه شکمی بازو (μ m)	طول	۵۵۰	۴۰۰	۴۸۰	۵۷
	عرض	۷۰۰	۶۰۰	۶۴۰	۶۵
صفحه پشتی بازو (μ m)	طول	۵۰۰	۴۰۰	۴۶۰	۴۱/۸
	عرض	۱۰۰۰	۹۰۰	۹۵۰	۵۰
سپر دهانی (μ m)	طول	۳۵۰	۴۵۰	۴۱۰	۴۱/۸
	عرض	۷۰۰	۴۵۰	۵۸۰	۹۷
خار بازو (mm)	طول	۲	۱/۴	۱/۶۸	۰/۲۹

جدول ۴. فواصل ژنتیکی درون گونه و بین گونه‌های مورد بررسی با مقایسه توالی گونه‌های مختلف

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
<i>Astropecten indicus</i>		0.0270	0.0280	0.0280	0.0280	0.0280	0.0280	0.0280	0.0270	0.0270	0.0270	0.0270	0.0280	0.0280	0.0280	0.0290	0.0280	0.0280	0.0280	0.0280
<i>Ophiothrix</i> sp. Iranian species	0.603		0.0250	0.0240	0.0250	0.0240	0.0240	0.0230	0.0240	0.0230	0.0240	0.0250	0.0240	0.0240	0.0250	0.0250	0.0240	0.0240	0.0240	0.024
<i>Clarkcoma canaliculata</i>	0.5700	0.247		0.0140	0.0140	0.0250	0.0240	0.0250	0.0250	0.0250	0.0250	0.0250	0.0240	0.0250	0.0240	0.0250	0.0050	0.0050	0.0050	0.005
<i>Clarkcoma pulchra</i>	0.5600	0.2370	0.070		0.0030	0.0240	0.0240	0.0240	0.0250	0.0230	0.0240	0.0250	0.0250	0.0260	0.0260	0.0240	0.0240	0.0140	0.0140	0.014
<i>Clarkcoma pulchra</i>	0.5630	0.2400	0.0730	0.003		0.0240	0.0240	0.0240	0.0250	0.0240	0.0240	0.0250	0.0250	0.0260	0.0260	0.0240	0.0240	0.0140	0.0140	0.014
<i>Macrophiothrix longipeda</i>	0.5830	0.2100	0.2330	0.230	0.190		0.0190	0.0120	0.0180	0.0230	0.0230	0.0240	0.0230	0.0240	0.0240	0.0240	0.0240	0.0250	0.0250	0.025
<i>Macrophiothrix megapoma</i>	0.5630	0.2070	0.2370	0.2470	0.2430	0.130		0.0200	0.0060	0.0230	0.0240	0.0240	0.0230	0.0230	0.0250	0.0250	0.0240	0.0240	0.0240	0.024
<i>Macrophiothrix longipeda</i>	0.5770	0.1970	0.2400	0.2330	0.2300	0.0470	0.140		0.0200	0.0240	0.0240	0.0240	0.0240	0.0230	0.0240	0.0240	0.0240	0.0240	0.0240	0.024
<i>Macrophiothrix leucosticha</i>	0.5730	0.2100	0.2370	0.2530	0.2500	0.1230	0.130	0.140		0.0230	0.0240	0.0240	0.0230	0.0230	0.0240	0.0240	0.0240	0.0240	0.0240	0.024
<i>Ophiothrix</i> sp.	0.6030	0.2170	0.2370	0.2400	0.2430	0.2130	0.2130	0.2200	0.210		0.0230	0.0230	0.0030	0.0040	0.0250	0.0250	0.0250	0.0250	0.0250	0.025
<i>Ophiothrix sensoni</i>	0.6000	0.1970	0.2370	0.2170	0.2200	0.2070	0.2170	0.2100	0.2170	0.203		0.0030	0.0230	0.0230	0.0250	0.0260	0.0250	0.0240	0.0240	0.024
<i>Ophiothrix sensoni</i>	0.5970	0.2000	0.2400	0.2200	0.2230	0.2100	0.2200	0.2130	0.2200	0.2070	0.003		0.0230	0.0230	0.0250	0.0260	0.0250	0.0260	0.0250	0.025
<i>Ophiothrix fragilis</i>	0.6030	0.2200	0.2400	0.2430	0.2470	0.2130	0.2100	0.2200	0.2070	0.0030	0.2030	0.207		0.0060	0.0250	0.0250	0.0250	0.0250	0.0250	0.025
<i>Ophiothrix</i> sp.	0.6030	0.2230	0.2370	0.2330	0.2370	0.2100	0.2170	0.2170	0.2130	0.0070	0.1970	0.2000	0.010		0.0250	0.0250	0.0250	0.0250	0.0250	0.025
<i>Ophiocoma dentata</i>	0.5830	0.2400	0.2330	0.2530	0.2530	0.2170	0.2330	0.2270	0.2300	0.2630	0.2530	0.2530	0.2630	0.267		0.0060	0.0220	0.0220	0.0220	0.0225
<i>Ophiocoma dentata</i>	0.5800	0.2400	0.2270	0.2530	0.2530	0.2200	0.2300	0.2300	0.2270	0.2600	0.2570	0.2570	0.2600	0.2630	0.010		0.0220	0.0220	0.0250	0.025
<i>Ophiocoma deoderleini</i>	0.5730	0.2570	0.2230	0.2100	0.2100	0.2400	0.2400	0.2370	0.2370	0.2600	0.2630	0.2630	0.2600	0.2630	0.1730	0.177		0.0130	0.0240	0.024
<i>Ophiocoma deoderleini</i>	0.5630	0.2630	0.2370	0.2270	0.2230	0.2230	0.2200	0.2300	0.2130	0.2500	0.2700	0.2700	0.2470	0.2530	0.1730	0.1770	0.060		0.0250	0.025
<i>Clarkcoma canaliculata</i>	0.5670	0.2400	0.0070	0.0700	0.0730	0.2330	0.2300	0.2400	0.2300	0.2400	0.2370	0.2400	0.2430	0.2400	0.2330	0.2270	0.2230	0.230		0.000
<i>Clarkcoma canaliculata</i>	0.5670	0.2400	0.0070	0.0700	0.0730	0.2330	0.2300	0.2400	0.2300	0.2400	0.2370	0.2400	0.2430	0.2400	0.2330	0.2270	0.2330	0.2300	0.000	

بحث و نتیجه‌گیری

بر اساس این تحقیق ستاره شکننده *Ophiothrix* sp. از خلیج چابهار تحت بررسی‌های ریخت‌شناسی و مولکولی قرار گرفت و جایگاه آن در درخت فیلوژنتیکی مشخص شد. این گونه با چندین ستاره شکننده از دو خانواده Ophitrichidae شامل دو جنس *Ophiothrix* و *Macrophiothrix* و خانواده Ophiocomidae شامل دو جنس *Ophiocoma* و *Clarkcoma* مقایسه گردید. که در آنالیز ML با % بوت استرپ در کلاد مربوط به جنس *Ophiothrix* حمایت شد. ستاره‌های شکننده جنس *Ophiothrix* به‌خاطر زیستگاه‌هایشان در آب‌های گرم ساحلی و فراوانی‌شان در طبیعت و آزمایشگاه توسط زیست‌شناسان در رشته‌های مختلف بررسی شده‌اند. با توجه به کلیدهای شناسایی مورد استفاده در این تحقیق (Clark, 1923; Pomory, 2007; Clark & Rowe, 1971) این گونه با گونه‌های جنس *Ophiothrix* مقایسه و از آنها متمایز و قابل تشخیص شد.

در گونه *O. aristulata*، صفحات بازویی شکمی به‌خوبی توسعه یافته است. پوشش دیسک خاری، استامپ‌های دنداندار یا هر دو می‌باشد. خارهای بازویی، شیشه‌ای، بلند، باریک، نوک‌تیز و دنداندار می‌باشد (Clark, 1923; Pomory, 2007)؛ که در گونه *Ophiothrix* sp. یافت شده از خلیج چابهار،

پوشش دیسک فاقد هر نوع خار و استامپ بود و دیسک کاملاً با گرانول پوشیده شده بود. این ویژگی گونه خلیج چابهار را از *O. aristulata* متمایز می‌کند.

در گونه *O. fragilis* خارهای بازویی کم‌ویش مات، حداقل یک خار بلندتر از بقیه خارها بوده و کم‌ویش پهن و کوتاه می‌باشند. سپرهای شعاعی بزرگ فاقد پوشش یا با خارهای خشن پوشیده شده است (Clark, 1923; Clark & Rowe, 1971)؛ که در گونه *Ophiothrix* sp. یافت شده از خلیج چابهار، خارهای بازویی هر قطعه پنج عدد، کشیده و کاملاً شفاف و شیشه‌ای بودند.

در گونه *O. triglochis* سپرهای شعاعی کوچک و کم ویش با استامپ‌های دنداندار پوشیده شده است. خارهای بازویی بلند و خیلی پهن می‌باشند. بازوهای کشیده و حدود ۴-۶ برابر قطر دیسک می‌باشند. صفحات بازویی پشتی دارای اشکال فن شکل، لوزی یا پنج‌ضلعی می‌باشد (Clark, 1923)؛ که در گونه *Ophiothrix* sp. یافت شده از خلیج چابهار، سپرهای شعاعی بزرگ و با گرانول پوشیده شده بودند.

در گونه *O. longipeda* بازوهای بسیار کشیده و حدود ۹-۱۸ برابر قطر دیسک می‌باشد. صفحات بازویی پشتی دارای عرضی بسیار بیشتر از طول می‌باشند (Clark, 1923)؛ که در گونه *Ophiothrix*

نوارهای طولی سفید می‌باشد. گاهی اوقات نوار تیره و کاملاً مایل می‌باشد. برخی قهوه‌ای کم‌رنگ، زرد-سفید یا بنفش می‌باشند. کوچک‌ترین نمونه دارای دیسکی به قطر ۲ میلی‌متر و بازویی به طول ۸ میلی‌متر می‌باشد. سپرهای شعاعی کاملاً فاقد پوشش بوده و دیسک با استامپ‌های سه‌گوشه کمی پوشیده شده است (Clark, 1923; Pomory, 2007)؛ که در گونه *Ophiothrix* sp. خلیج چابهار، با توجه به اندازه، رنگ‌آمیزی، پوشش گرانولی دیسک و سپرهای شعاعی و همچنین نوع بستر محل زندگی از گونه *O. angulata* متمایز می‌شوند. زیرا که بستر محل زندگی گونه *Ophiothrix* sp. خلیج چابهار، با پوشش شنی و قلوه سنگی می‌باشد.

گونه *O. suensonii* یکی از قابل توجه‌ترین ستاره‌شکننده‌های غرب هند می‌باشد در نقاط مختلف پراکنش دارد و تا جنوب برزیل توزیع شده است. دیسکی به قطر ۱۴ میلی‌متر دارد. بازوها ۵-۶ برابر قطر دیسک می‌باشند. بنفش کم‌رنگ یا ارغوانی می‌باشد. بسیار ظریف و شکننده می‌باشد (Clark, 1923; Pomory, 2007).

گونه *O. oerstedii* از ستاره‌شکننده‌های رایج در غرب هند می‌باشد. دیسکی به قطر ۱۰-۱۲ میلی‌متر و بازوهای بسیار باریکی دارد. معمولاً به رنگ سبز یا آبی با بازوهای راه‌راه سفید می‌باشد (Clark, 1923)؛ که در گونه *Ophiothrix* sp. خلیج چابهار، با توجه به بازوهای پهن و رنگ‌بندی از این گونه‌ها تشخیص داده می‌شوند.

Hendler (2005) به بررسی خصوصیات ریخت‌شناسی گونه‌های *O. cimar* و *O. stri* از منطقه جنوب دریای کارائیب پرداخت. شکل دیسک در گونه *O. stri* گرد، در گونه *Ophiothrix* sp. خلیج چابهار پنج لوبی می‌باشد. در گونه *O. lineate* سپرهای شعاعی معمولاً ساده و عاری از هر زوائدی می‌باشند. قطر دیسک ۷-۹ برابر طول بازو می‌باشد. نوار تیره با حاشیه روشن در امتداد سطح بازو از ناحیه شکمی قرار دارد.

sp. یافت شده از خلیج چابهار، به راحتی توسط طول بازوی خود کوتاه (حدود ۱۰ برابر) نسبت به قطر دیسک، از *O. longipeda* تشخیص داده می‌شوند.

در گونه *O. capensis* دیسک با خارهای سوزنی پراکنده پوشیده شده است. صفحات شکمی بازو توسط یک پوست رویی پنهان شده است. پنج خط مجزای مشکی بر روی دیسک وجود دارد که تا انتهای بازوها گسترش یافته است (Clark, 1923, Clark & Rowe, 1971)؛ که در گونه *Ophiothrix* sp. یافته شده از خلیج چابهار، پوشش دیسک گرانولی، صفحات بازویی شکمی فاقد پوست رویی، کاملاً توسعه یافته و مشخص بودند، همچنین در این گونه دیسک فاقد پنج خط مجزای مشکی بود.

در گونه *O. poecilodisca* صفحات بازویی شکمی با فاصله نسبت به هم قرار گرفته‌اند. هیچ خطوطی بر روی دیسک وجود ندارد. صفحات بازوی پشتی با خطوط باریک قرمز تیره پوشیده شده‌اند (Clark, 1923).

در گونه *O. trilineata* صفحات بازویی پشتی اندکی زاویه‌دار و دارای یک خط میانی راه‌راه سیاه و سفید می‌باشند (Clark, 1923)؛ که در گونه *Ophiothrix* sp. خلیج چابهار بازو از ناحیه پشتی و شکمی و همچنین ناحیه پشتی دیسک در منطقه سپر شعاعی دارای خط بودند.

در گونه *O. dividua* صفحات بازویی شکمی مربعی شکل و بازو از ناحیه پشتی با گرانول‌های نامنظم پوشیده شده است و اغلب صفحات بازویی پشتی برجسته می‌باشند (Clark, 1923, Clark & Rowe, 1971)؛ که در گونه *Ophiothrix* sp. خلیج چابهار، صفحات بازویی شکمی بیضی شکل و بازو از ناحیه پشتی فاقد گرانول بود.

ستاره شکننده گونه *O. angulata* کوچک، با دیسکی به قطر ۷-۱۰ میلی‌متر می‌باشد. عمدتاً در میان مرجان‌ها و علف‌های دریایی یافت می‌شود. رنگ‌آمیزی فوق‌العاده متغیری دارد. بازو به رنگ بنفش یا قهوه‌ای با

در مطالعات Hart et al. (2005) اثبات شده است. درخت فیلوژنی گونه *Ophiothrix* sp. خلیج چابهار از تک نیایی بودن این جنس پشتیبانی کرد. این گونه از لحاظ ریخت‌شناسی با گونه‌های موجود در جنس *Ophiothrix* مقایسه گردید، اما در هیچ کدام از این گونه‌ها واقع نشد. این گونه تا حدودی شبیه به *O. savignyi* بود اما از لحاظ داشتن شکل دیسک پنج لوبی، پوشش دیسک گرانول‌های ریز، دیسک پشتی فاقد خال‌های مشکی، لبه‌های داخلی سپرهای شعاعی دارای خط مشکی، سپرهای دهانی دارای یک خال مشکی بزرگ در مرکز، بازو از هر دوناحیه پشتی و شکمی دارای خطوط میانی، صفحات بازویی پشتی پنج ضلعی و پیوسته با هم، صفحات بازویی شکمی بیضی و پیوسته از این گونه متمایز گردید. همان‌طور که ذکر شد این گونه از لحاظ ریخت‌شناسی با گونه‌های موجود در جنس *Ophiothrix* مقایسه گردید، اما در هیچ‌کدام از این گونه‌ها واقع نشد. همچنین پس از ارسال عکس‌های تمام ساختار این نمونه به متخصصین شناسایی مارسانان از جمله پروفیسور Price (متخصص خارپوستان و صاحب چندین کلید شناسایی از دانشگاه انگلستان)، Hoggett (متخصص خارپوستان و صاحب کلید شناسایی مارسانان استرالیا) نیز این نمونه نتوانست در حد گونه شناسایی شود و فقط در حد جنس تایید شد. به نظر می‌رسد که *Ophiothrix* sp. خلیج چابهار، گونه جدیدی باشد. از این مطالعه نتیجه می‌شود که این گونه تک‌نیایی و گروه خواهری جنس *Ophiothrix* می‌باشد. با توجه به کریپتیک بودن مارسانان و اینکه تاکنون هیچ مطالعه‌ای در زمینه فیلوژنی و ریخت‌شناسی مارسانان در ایران انجام نگرفته است کشف هر گونه‌ی مارسان جدید منطقی به نظر می‌رسد زیرا احتمال دارد که این گونه بومی ایران باشد که به دلیل هیچ بررسی بر رویشان تاکنون ناشناخته باقی مانده است؛ بنابراین بنابر احتیاط و بررسی‌های بیشتر این گونه در زمینه ریخت‌شناسی،

ستاره شکننده *Ophiothrix* sp. از خلیج چابهار تحت بررسی‌های مولکولی قرار گرفت و جایگاه آن در درخت تبارزایی مشخص شد. از آنجائیکه *COI* به‌عنوان یک نشانگر قدرتمند از نظر کمی و کیفی داده‌ها در بین نشانگرهای مولکولی معرفی شده است در این تحقیق از این نشانگر استفاده گردید (Heimeier et al., 2010). پرایمر Echino COI- F, R عملکرد ویژه‌ای در شناسایی خارپوستان به طریق مولکولی دارد. این پرایمر به‌صورت اختصاصی برای خارپوستان طراحی گردیده است اگرچه در برخی موارد برای بقیه شاخه‌ها هم به کار برده شده است (Heimeier et al., 2010). توالی ژنی گونه مورد مطالعه در این تحقیق با چندین ستاره شکننده از خانواده *Ophitrichidae* شامل دو جنس *Ophiothrix* و *Macrophiothrix* و خانواده *Ophiocoma* شامل دو جنس *Ophiocoma* و *Clarkcoma* که از نظر ریخت‌شناسی هم نزدیک بودند، مقایسه گردید؛ که در آنالیز ML با ۴۹٪ بوت استرپ در کلاد مربوط به جنس *Ophiothrix* حمایت شد. درخت فیلوژنی گونه *Ophiothrix* sp. خلیج چابهار از تک نیایی بودن این جنس پشتیبانی کرد. Baric & Sturmbauer (1999) از مطالعه خود بر روی گونه‌های کریپتیک جنس *Ophiothrix* با استفاده از توالی‌های مربوط به نواحی میتوکندریایی، تک نیایی بودن گونه‌های این جنس را تایید کردند. آن‌ها دو گونه *O. guingumaculata* بومی دریای مدیترانه را با گونه *O. fragilis* مورد بررسی مولکولی قرار دادند. این دو گونه در درخت فیلوژنی در یک کلاد با جد مشترک قرار گرفتند. آن‌ها نتیجه گرفتند که اعضای جنس *Ophiothrix* با یکدیگر رابطه تک نیایی دارند و تفاوت‌های مربوط به گونه‌های این جنس را می‌توان با توجه به شرایط مختلف زیست جغرافیایی و محیطی در اعماق مختلف آب توجیه کرد (Baric & Sturmbauer, 1999). همچنین تک نیایی جنس *Ophiothrix* و *Macrophiothrix* نیز

روی این موجودات به خصوص در آب‌های ایرانی، شناسایی دقیق در این موجودات و خیلی از گونه‌ها لاینحل باقی می‌ماند ضمن اینکه ذخایر ژنی آب‌های نواحی ساحلی ایران به شدت ناشناخته است. همچنین برای درک بهتر این موجودات پیشنهاد می‌شود مطالعات بعدی با دیگر نشانگرهای مولکولی از جمله 18S rRNA انجام شود تا بتوان این گونه را به عنوان گونه جدید معرفی کرد.

مولکولی و مکاتبه با دیگر محققین این گونه با نام *Ophiothrix* sp. نام‌گذاری گردید و اگر در نواحی ژنی دیگر مطالعه شود می‌توان دقیق‌تر در مورد آن بحث و نام‌گذاری کرد. در نهایت با توجه به دستاوردهای محققین در مطالعه حاضر پیشنهاد می‌شود که رده‌بندی این موجودات توسط دانش‌پژوهان بعدی در کنار بررسی‌های مولکولی انجام شود، چرا که با کمبود مطالعات مولکولی و تکاملی بر

REFERENCES

- Attaran-Fariman, G.; Beygmoradi, A.; Boos, K.; (2014). First record of *Ophionereis dubia* (Echinodermata: Ophiuroidea) from Chabahar Bay (Oman Sea, Iran). *Marine Biodiversity Records*; 7: 1-5.
- Awise, J. C.; Neigel, J. E.; Arnold, J.; (1984). Demographic influences on mitochondrial DNA lineage survivorship in animal populations, *J. Mol. Evol*; 20: 99-105.
- Baric, S.; Sturmbauer, C.; (1999). Ecological parallelism and cryptic species in the genus *Ophiothrix* derived from mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phylogenet; Evol*; 11: 157-162.
- Boissin, E.; Feral J. P.; Chenuil, A.; (2008). Defining reproductively isolated units in a cryptic and syntopic species complex using mitochondrial and nuclear markers: the brooding brittle star, *Amphipholis squamata* (Ophiuroidea). *Molecular Ecology*; 17: 1732-1744.
- Clark H. L.; (1923). The Echinoderm Fauna of South Africa. *Annals of the South African Museum. Volume XIII*.
- Clark, A. M.; Rowe F. W.; (1971). *Monograph of Shallow-water Indo-west Pacific Echinoderms*. Trustees of the British Museum (Natural History), London; 234 P.
- Cronin, M. A., Palmisciano, D. A.; Vyse, E. R.; Cameron, D. G.; (1991). Mitochondrial- DNA in wildlife forensic-science species identification of tissues, *Wild; Soc. Bull.* 19: 94-105.
- Hall, A. T.; (1999). Bioedit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/Nt. *Nucleic Acids Symposium Series*; 95-98.
- Hall, B. G.; (2000). *Phylogenetic Trees Made Easy: a How-To Manual for Molecular Biologists*, Sinauer Associates.
- Harmon, M. C.; (2005). The position of the ophiuroidea within the phylum echinodermata, M.Sc. thesis: University of South Florida, Biology Department.
- Hart, W. M.; Podolsky, D. R.; (2005). Mitochondrial DNA phylogeny and rates of larval evolution in *Macrophiothrix* brittlestars, *Molecular Phylogenetics and Evolution*; 34: 438-447.
- Heimeier, D.; Lavery, S.; Sewell, M. A.; (2010). Molecular species identification of *Astrothoma agassizii* from planktonic embryos: further evidence for a cryptic species complex. *J. Heredity*; 101: 775-779.
- Hendler, G.; (2005). Two new brittle star species of the genus *Ophiothrix* (Echinodermata: Ophiuroidea: Ophiotrichidae) from coral reefs in the Southern Caribbean Sea, with notes on their biology. *Caribbean Journal of Science*; 41: 583-599.
- Jeanmougin, F.; Thompson, J. D.; Gouy, M.; Higgins, D. G.; Gibson, T. J.;

- (1998). Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem. Sci.*; 23: 403-405.
- Khaleghi, M.; Owfi, F.; (2011). Identification of Echinoidea species in the intertidal zones of Chabahar Bay. *Journal of Animal Environment*;4:31-36.
- Kumar, S.; Tamura, K.; Nei, M.; (1994). MEGA: molecular evolutionary genetics analysis software for microcomputers. *Comput Appl Biosci*; 10: 189-191.
- Littlewood, D.T.J.; Smith, A.B.; Clouh, K.A.; Emson, R. H.; (1997). The interrelationships of the echinoderm classes: morphological and molecular evidence. *Biol. J. Linn. Soc*; 61: 409-438.
- Pomory, C.M.; (2007). Key to the common shallow-water brittle stars (Echinodermata: Ophiuroidea) of the Gulf of Mexico and Caribbean Sea. *Caribbean Journal of Science, Special Publications*; 10: 1-42.
- Price, A.R.G.; (1981). Studies on the echinoderm fauna of the western Arabian Gulf. *Journal of Natural History*; 15: 1-15.
- Rokas, A.; Ladoukakis, E.; Zouros, E.; (2003). Animal mitochondrial DNA recombination revisited. *Trends Ecol Evol*; 18: 411-417
- Sambrook.; Fritsch.; Maniatis.; (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd Edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 3: E3-E4.
- Stöhr, S.; O'Hara, T. D.; Thuy, B.; (2012). Global diversity of brittle stars (Echinodermata: Ophiuroidea). *PLoSOne*; 7: 1-14.
- Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M.; Kumar, S.; (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*; 28: 2731-2739.
- Tsaousis, A.D.; Martin, D.P.; Ladoukakis, E. D.; Posada, D.; Zouros, E.; (2005). Widespread recombination in published animal mtDNA sequences. *Mol Biol Evol*; 22: 925-933.