



ریخت شناختی و تبارشناسی مولکولی گونه‌ی لیسه دریایی *Dendrodoris fumata* (Rüppell & Leuckart, 1830) (شکم پایان: برهنه آب‌ششیان) از سواحل خلیج فارس

یاسر فاطمی^۱، محمدرضا طاهری زاده^۱، حمیدرضا اسماعیلی^۲، عدنان شهدادی^{۱*}

^۱ گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس

^۲ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شیراز، شیراز

نوع مقاله:	چکیده
پژوهشی	این مطالعه با هدف توصیف ویژگی‌های ریختی و بررسی جایگاه فیلوژنتیکی (تبار شناختی) گونه‌ی <i>Dendrodoris fumata</i> (Rüppell & Leuckart, 1830) از آب‌های خلیج فارس (در بندر بستانه)، در سال ۱۳۹۸ انجام گرفت. در این مطالعه استخراج DNA به روش محلول نمک و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به کمک آغازگرهای جهانی LCO1490 و HCO2198 انجام گرفت. پس از تکثیر قطعه‌ی ۱ ژن سیتوکروم اکسیداز میتوکندریایی و مقایسه‌ی آن با توالی‌های موجود در بانک جهانی ژن با استفاده از محاسبه فاصله ژنتیکی K2P مشخص شد که نمونه‌های خلیج فارس کمترین فاصله ژنتیکی را با نمونه‌های دریای سرخ و دریای عمان و بیشترین اختلاف درون گونه‌ای را با نمونه‌ی این گونه از استرالیا دارند. همچنین ضمن ترسیم درخت فیلوژنتیکی مربوطه، مشخص شد که گونه <i>D. fumata</i> کلاد خواهری گونه <i>D. rubra</i> می‌باشد. همچنین دیگر گونه گزارش شده از منطقه، <i>D. nigra</i> در یک کلاد مجزا و با فاصله زیاد از نمونه‌های <i>D. fumata</i> در خلیج فارس قرار گرفت.
تاریخچه مقاله:	
دریافت: ۹۹/۰۵/۲۰	
اصلاح: ۹۹/۰۶/۲۲	
پذیرش: ۹۹/۰۷/۱۲	
کلمات کلیدی:	
دریای عمان	
فیلوژنی	
نرم‌تنان	
COI	
<i>Dendrodoris</i>	

مقدمه

لیسه‌های دریایی از متنوع‌ترین و در عین حال زیباترین موجودات دریایی هستند که در تمام اقیانوس‌های جهان پراکنش دارند. این گروه از ناحیه بین جزرومدی تا اعماق و انواع مختلف زیستگاه‌ها و بسترها زیست می‌کنند. به سبب از دست دادن پوسته حفاظتی معمول در نرم‌تنان، این گروه از رنگ‌آمیزی هشداردهنده به‌عنوان یک استراتژی دفاعی استفاده می‌کنند. همین امر سبب پیدایش تنوع رنگی بسیار بالا در آن‌ها شده است (Yonow, 2008; Gosliner *et al.*, 2018). تا سال ۲۰۱۸ حدود ۲۱۰۰ گونه از این گروه در منطقه هند - آرام غربی گزارش شده است، اما آرایه‌شناسان معتقدند تنوع این گروه در این منطقه بسیار بیشتر از این تعداد است (Gosliner *et al.*, 2018). جنس *Dendrodoris* Ehrenberg, 1831 با داشتن ۱۴ گونه در این منطقه، از جنس‌هایی با تنوع نسبتاً بالا به حساب می‌آید (Gosliner *et al.*, 2018). گونه‌های این جنس فاقد سوهانک، دارای بدنی کشیده و آبشش‌هایی که قسمت انتهایی بدن را می‌پوشانند، هستند (Brodie *et al.*, 1997). گونه‌های این جنس دارای پراکنش جهانی در تمام اقیانوس‌ها هستند (Hirose *et al.*, 2014). این جنس برای اولین بار توسط Bergh در سال

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: adnan1361@gmail.com

۱۸۷۶ برای *Dendrodoris limbata* (Cuvier, 1804) و به واسطه فقدان سوهانک و آرواره، از دریای سرخ توصیف شد (Wägele et al., 2003; Gosliner et al., 2018).

تاکنون دو گونه از این جنس، شامل *D. fumata* (Rüppell & Leuckart, 1830) و *D. nigra* (Stimpson, 1855) از آب‌های خلیج فارس گزارش شده است. متأسفانه در تمام منابع موجود فقط به اسم گونه بسنده شده است و هیچ توصیف یا عکسی از این‌گونه‌ها از خلیج فارس در دست نیست (Jones, 1986; Nithyanandan, 2012; Rezai et al., 2016). با توجه به شباهت‌های ریخت‌شناسی بسیار زیاد این دو گونه و نیز با توجه به اینکه گونه‌های این جنس فاقد سوهانک جهت مقایسه هستند، استفاده از نشانگرهای ژنتیکی به مهم‌ترین ابزار شناسایی گونه‌های این جنس تبدیل شده است (Hirose et al., 2014)، بنابراین با توجه به فقدان داده‌های ریخت‌شناسی و مولکولی از نمونه‌های گونه *D. fumata* در خلیج فارس، مطالعه حاضر بر آن است تا علاوه بر تهیه تصویر و توصیف مختصر گونه، با استفاده از توالی ژن میتوکندریایی COI، جایگاه تبار شناختی نمونه‌های سواحل ایران را نیز تبیین کند.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری در هنگام جزر کامل و در خردادماه سال ۱۳۹۸ به صورت دستی و از سواحل بندر بستانه انجام گرفت (شکل ۱). پس از تصویربرداری از نمونه‌های زنده، لیسه‌های دریایی در اتانول ۹۶ درصد تثبیت و جهت زیست‌سنجی و انجام مطالعات مولکولی به آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه هرمزگان منتقل شدند.

شناسایی نمونه‌ها بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی در آزمایشگاه جانورشناسی دانشگاه هرمزگان، با کمک لوپ و نیز با کمک تصاویر ثبت شده از نمونه زنده، صورت گرفت. برای این منظور از کلیدهای شناسایی مهم این جنس و گونه، استفاده شد (Brodie et al., 1997; Yonow, 2008; Gosliner et al., 2018).

استخراج DNA به روش محلول نمک و از بافت عضله (پس از جدا کردن بافت پوست) انجام گرفت. بافت عضله در ۲۰۰ میکرولیتر محلول لیزکننده سلول قرار داده شد و سپس ضمن له کردن و هم زدن مداوم، محلول حدود ۱۰ ساعت در دمای ۶۵ درجه قرار داده شد. در مرحله بعد ۶۸ میکرولیتر از محلول ته رسوب‌کننده پروتئین به آن اضافه شد. پس از آن به خوبی



شکل ۱. نقشه محل انجام نمونه‌برداری در بندر بستانه، شمال خلیج فارس

هم زده شد و سپس سرد شد. پس از سانتریفیوژ، مایع رویی به ۵۴۰ میکرولیتر الکل مطلق اضافه شد. در طول شب در فریزر قرار گرفت و سپس با استفاده از سانتریفیوژ یخچال دار و به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۴۰۰۰ هزار سانتریفیوژ گردید. سپس مایع رویی دور ریخته شد و به رسوب کف لوله‌ها ۲۵ میکرولیتر محلول TE اضافه شد. پس از بررسی نمونه‌ها به کمک ژل آگاروز و اشعه ماورا بنفش، نمونه‌هایی که برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز مناسب بودند، جدا شدند.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای رفت LCO1490 با توالی نوکلئوتیدی 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3' و برگشت HCO2198 با توالی نوکلئوتیدی 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3' جهت تکثیر قطعه‌ای با طول حدود ۷۰۰ باز آلی از ژن سیتوکروم اکسیداز میتوکندریایی انجام گرفت (Folmer, 1994). واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر (شامل ۱۰ میکرولیتر آب، ۱۲ میکرولیتر مستر میکس، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر و ۱ میکرولیتر از DNA الگو) انجام گرفت. برنامه‌های سیکل حرارتی شامل ۳۵ سیکل و به ترتیب زیر انجام گرفت: واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه، به مدت ۵ دقیقه، واسرشت سازی‌های دوره‌ای در دمای ۹۴ درجه به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال در دمای ۴۸ درجه به مدت ۴۵ ثانیه، تکثیر قطعه در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه و تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه. پس از بررسی کیفیت محصولات PCR بر روی ژل ۱/۵ درصد آگارز، نمونه‌هایی که مناسب تشخیص داده شدند، برای توالی یابی به شرکت توپاز ژن ارسال شدند.

پس از دریافت توالی‌ها، ویرایش توالی‌های خام اولیه با کمک نرم‌افزار Choromas pro صورت گرفت. سپس توالی گونه‌های مشابه از بانک ژن استخراج گردید. به کمک نرم‌افزار Bioedit همترازسازی توالی‌ها صورت گرفت (Hall, 1999). سه مجموعه داده، دو تا برای ترسیم درخت و یکی برای ترسیم شبکه و محاسبه فاصله ژنتیکی آماده شد. از آنجایی که رابطه فیلوژنی بین گونه‌های مورد مطالعه مبهم بود، در آنالیز اولیه ترسیم درخت فیلوژنی، برون‌گروه تعیین نگردید. با توجه به درخت اولیه به دست آمده (شکل ۳ الف) و موقعیت فیلوژنی گونه‌ها، گونه *D. brandiflora* جهت ترسیم درخت فیلوژنی برای نمونه‌های گونه *D. fumata* و گونه نزدیک آن (*D. rubra*)، انتخاب شد. مجموعه داده‌ها با کمک نرم‌افزار AliView به فرمت PHYLIP برای ترسیم درخت، و با استفاده از FaBox به فرمت Nexus جهت ترسیم شبکه هاپلوتایپی درآورده شد. درخت‌های حداکثر احتمال در نرم‌افزار raxmlGUI با ۱۰۰۰ تکرار بوتسترپ و با استفاده از مدل GTR+G رسم گردید (Silvestro and Michalak, 2012; Darriba et al., 2012). رسم شبکه به وسیله نرم‌افزار PopArt و نیز محاسبه فاصله‌ی ژنتیکی گونه‌های موردنظر نیز با استفاده از نرم‌افزار Mega X انجام پذیرفت (Tamura et al., 2011; Leigh and Bryant, 2015).

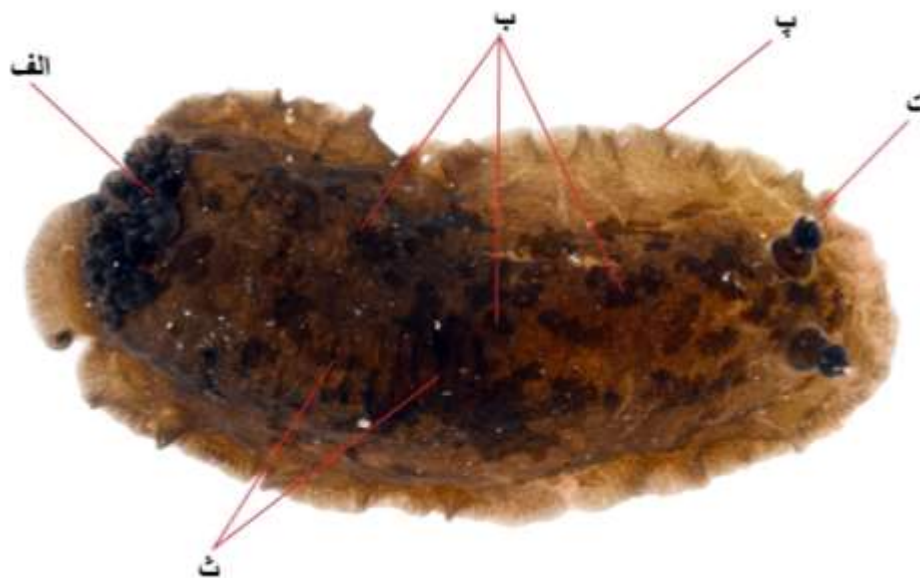
نتایج

ریخت‌شناسی

بدن تا حدودی کشیده و استوانه‌ای، سطح پشتی بدن نرم، صاف و برآمده، حاشیه‌های سطح پشتی مواج، نازک و پهن، رنگ‌بندی بدن از قرمز و صورتی تا سیاه، سطح پشتی بدن دارای یک سری چین‌خوردگی‌های عمودی، شمار زیادی لکه‌های تیره قهوه‌ای رنگ روی تمام قسمت‌های سطح پشتی بدن (به جز حاشیه‌ها)، آب‌شش پنج شاخه‌ای، به حالت برگ کاهو و از قسمت انتهایی سطح پشتی بیرون زده، امتداد آب‌شش‌ها تا قسمت انتهایی سطح پشتی بدن، رینوفورها هم‌رنگ سطح پشتی با نوک سفیدرنگ، سطح شکمی کمی روشن‌تر از سطح پشتی و فاقد لکه‌های قهوه‌ای است (شکل ۲).

مولکولی

از آنجایی که توالی‌های استخراج شده از بانک ژن دارای طول‌های متفاوت بودند، برای محاسبه درخت فیلوژنی و شبکه (همچنین محاسبه فاصله) از دو مجموعه داده با طول مختلف استفاده شد. مجموعه توالی‌های استفاده شده برای درخت دارای توالی‌هایی با طول حداقل ۵۴۸ باز آلی و حداکثر ۷۱۶ باز بود. از آنجایی که توالی کوتاه‌تر مربوط به دریای عمان بود، برای ترسیم شبکه و محاسبه فاصله، این توالی مبنا قرار گرفت و سایر توالی‌های مورد استفاده در ترسیم شبکه و تعیین فاصله از قسمت‌های ابتدایی و انتهایی کوتاه شده و هم‌اندازه با توالی دریای عمان (۵۴۸) باز شدند.

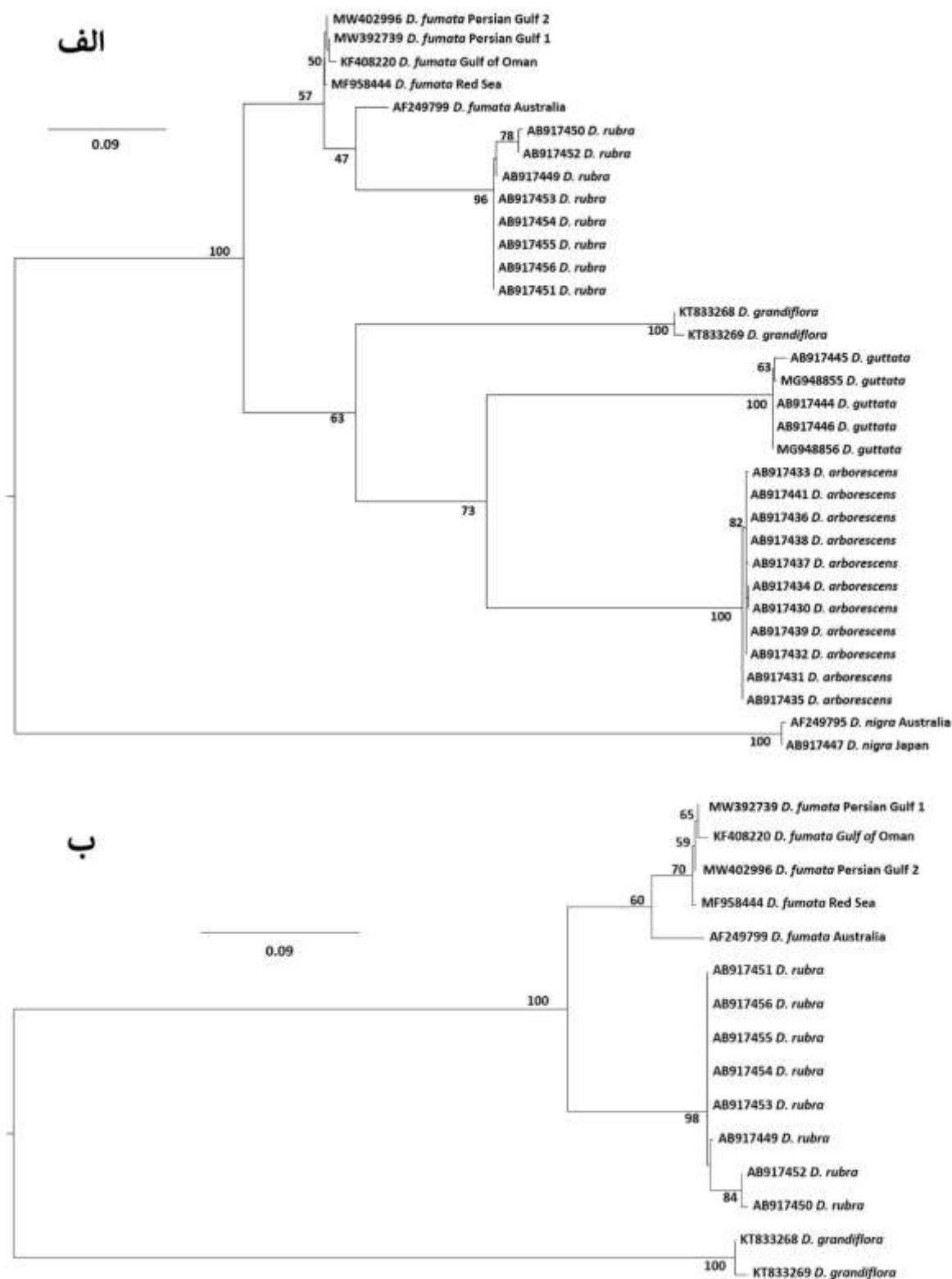


شکل ۲. تصویر نمونه زنده *D. fumata*. الف) آبشش، ب) لکه‌های تیره‌ی سطح پشتی بدن، پ) حاشیه نازک و موجدار سطح پشتی بدن، ت) نوک سفید رینوفورها، ث) چین‌های عمودی سطح پشتی بدن.

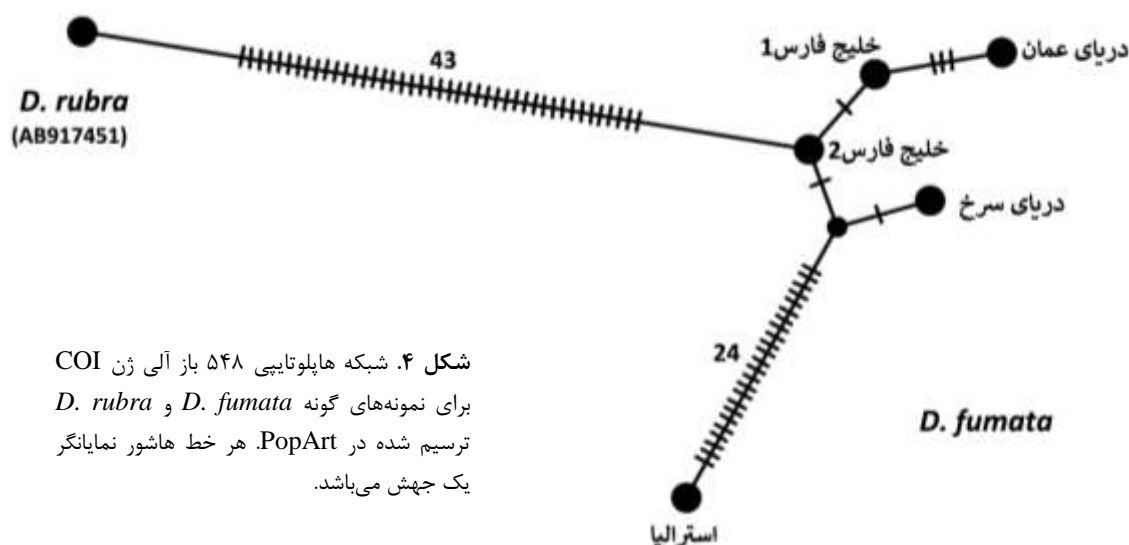
پس از ترسیم درخت فیلوژنی اولیه با روش حداکثر احتمال، مشاهده شد که گونه *D. fumata* یک حالت پارافیلیتیک را نشان می‌دهند. بدین صورت گونه *D. rubra* به همراه نمونه استرالیایی *D. fumata* به صورت یک کلاد مونوفیلیتیک (تک نیا) در داخل کلاد گونه *D. fumata* قرار گرفتند (شکل ۳ الف). البته تمام اعضای گونه *D. fumata* مجزا از سایر گونه‌ها از جمله *D. nigra* قرار گرفتند. این حالت پارافیلیی به نظر می‌آید که به علت عدم انتخاب برون گروه مناسب باشد. شاید به همین علت است که در درخت بعدی که برون گروه مناسب (*D. brandiflora*) انتخاب شد، همه نمونه‌های *D. fumata* از جمله نمونه استرالیا، در زیر یک کلاد مونوفیلیتیک حمایت شده قرار گرفتند. در این درخت، کلاد گونه *D. rubra* حالت خواهری نسبت به کلاد گونه *D. fumata* دارد. نمونه‌های خلیج فارس و دریای عمان نیز در کلاد *D. fumata* قرار گرفتند که شامل دو زیرکلاد شمال غرب اقیانوس هند (شامل دریای عمان، خلیج فارس و دریای سرخ) و کلاد صخره‌های بزرگ مرجانی استرالیا می‌باشد (شکل ۳ ب).

برای ترسیم شبکه هاپلوتایپی علاوه بر نمونه‌های گونه *D. fumata* یک توالی از گونه خواهری آن یعنی *D. rubra* انتخاب شدند (شکل ۴). متناسب با درخت‌های به دست آمده، در شبکه نیز توالی‌های خلیج فارس، عمان و دریای سرخ در یک گروه و نزدیک به هم با فاصله یک تا شش جهش قرار گرفته‌اند. نمونه استرالیا اما با فاصله چشمگیر حداقل ۲۵ جهش (از ۵۴۸ باز آلی) از سایر نمونه‌های این گونه قرار گرفته است. گونه *D. rubra* نیز حداقل ۴۳ جهش با نمونه‌های گونه *D. fumata* فاصله دارد.

نتایج محاسبه فاصله ژنتیکی (K2P) مشخص نشان داد که فاصله‌ی ژنتیکی در بین نمونه‌های گونه *D. fumata* خیلی کمتر از این فاصله بین نمونه‌های این گونه و گونه نزدیک آن یعنی *D. rubra* است (جدول ۱). حداکثر فاصله درون‌گونه‌ای در *D. fumata* بین نمونه دریای عمان و نمونه استرالیا بود، یعنی ۵٫۶ درصد (از ۵۴۸ باز آلی). این در حالی است که حداقل فاصله بین نمونه‌های *D. fumata* و نمونه *D. rubra* ۸٫۶ درصد است. فاصله بین دو نمونه خلیج فارس ۰٫۲ درصد، تفاوت بین نمونه‌های اول و دوم خلیج فارس با نمونه‌ی دریای عمان به ترتیب ۰٫۶ و ۰٫۷ درصد، این میزان بین نمونه‌های خلیج فارس و نمونه دریای سرخ به ترتیب ۰٫۶ و ۰٫۴ درصد می‌باشد. در منطقه شمال غرب اقیانوس هند بیشترین فاصله بین نمونه دریای عمان و نمونه دریای سرخ، ۱٫۱ درصد است.



شکل ۳. درخت فیلوژنی حداکثر احتمال (ML) بر اساس توالی نوکلئوتیدی ژن میتوکندریایی سیتوکروم اکسیداز (COI) برای گونه *D. fumata* و سایر گونه‌های خویشاوند، به کمک نرم‌افزار raxmlGUI با ۱۰۰۰ تکرار بوتسترپ. الف. برای توالی‌های مطالعه حاضر و ۳۱ توالی مقایسه‌ای از بانک جهانی ژن (NCBI) استخراج شده (شماره ثبت در درخت قابل مشاهده است)، بدون انتخاب برون گروه. ب. برای گونه *D. fumata* و گونه نزدیک آن *D. rubra* با انتخاب *D. grandiflora* به عنوان برون گروه. اعداد حمایتی بوتسترپ ۵۰ به بالا نشان داده شده‌اند.



شکل ۴. شبکه هاپلوتایپی ۵۴۸ باز آلی ژن COI برای نمونه‌های گونه *D. rubra* و *D. fumata* ترسیم شده در PopArt. هر خط هاشور نمایانگر یک جهش می‌باشد.

جدول ۱. نتایج محاسبه فاصله ژنتیکی (K2P) (درصد) برای نمونه‌های گونه *D. fumata* مربوط به خلیج فارس، دریای عمان، دریای سرخ و استرالیا و یک نمونه *D. rubra*

<i>D. fumata</i>					
	Persian Gulf (1)	Persian Gulf (2)	Gulf of Oman	Red Sea	Australia
Persian Gulf (1)					
Persian Gulf (2)	0.2				
Gulf of Oman	0.6	0.7			
Red Sea	0.6	0.4	1.1		
Australia	5	4.8	5.6	4.8	
<i>D. rubra</i>	8.8	8.6	9	9	9.9

بحث

خلیج فارس با داشتن مساحتی بالغ بر ۲۵ هزار کیلومتر مربع و متوسط عمق ۳۵ متر، از مهم‌ترین پهنه‌های آبی ایران است که با داشتن شرایط خاص اکولوژیکی مثل دما و شوری بالا و نیز داشتن زیستگاه‌ها و بسترهای منحصر به فرد، می‌تواند به لحاظ تاکسونومیک برای گروه‌های مختلف جانوری مهم باشد و تنوع زیستی آن می‌بایست به صورت دقیق بررسی شود (Reynolds, 1993; Maghsoudlou *et al.*, 2017; Naderloo, 2017). از این میان، نرم‌تنان و بخصوص شکم پایان با بیش از ۸۰۰ گونه‌ی متفاوت، نقش مهمی را در اکوسیستم این پهنه‌ی آبی ایفا می‌کنند و با داشتن تنوع بسیار بالا می‌توانند برای جانورشناسان بسیار جالب باشند (Bosch *et al.*, 1998; Rezai *et al.*, 2016). به دلیل وجود زیستگاه‌ها و بسترهای مختلف، می‌توان انتظار داشت که تنوع لیسه‌های دریایی در خلیج فارس بالا باشد، کما اینکه شماری از مطالعات پراکنده‌ی انجام شده، بر این ادعا صحت می‌گذارد (Rezai *et al.*, 2016; Yonow, 2012; Jones, 1986).

از گونه‌هایی با فراوانی بالا در آب‌های ایران (نسبت به سایر گونه‌ها) می‌توان به گونه‌های جنس *Dendrodoris* اشاره کرد. تاکنون دو گونه (*D. nigra* و *D. fumata*) از این جنس برای آب‌های ایران گزارش شده است. با توجه به اینکه در همه‌ی مطالعات انجام شده هیچ تصویر و توصیفی از این گونه‌ها ارائه نشده است و فقط به محل جمع‌آوری نمونه‌ها اشاره شده است (Rezai et al., 2016; Fatemi and Attaran, 2015) و از طرفی این دو گونه به لحاظ ریختی بسیار شبیه هستند و سوهانک (به عنوان مهم‌ترین ابزار شناسایی) ندارند، انجام مطالعات مولکولی جهت بررسی هویت و تبارشناختی این گونه در منطقه احساس نیاز می‌شد.

گونه‌ی *D. fumata* برای اولین بار توسط Rüppell و Leuckart (۱۸۳۰) در دریای سرخ توصیف شد. در طی سال‌های متمادی، این گونه از مناطق مختلف از جمله دریای عمان، هند، استرالیا و ژاپن نیز گزارش شد (Wägele et al., 2003; Yonow, 2008; Hirose et al., 2014; Fatemi and Attaran, 2015; Gosliner et al., 2018). مهم‌ترین ویژگی‌های ریختی قابل تشخیص در این گونه، وجود آب‌شش‌های ۵ شاخه‌ای است که تا قسمت انتهایی بدن را پوشانده‌اند. از گونه‌های نزدیک به آن در خلیج فارس می‌توان به گونه‌ی *D. nigra* اشاره کرد که به لحاظ رنگی، شکل بدن، اندازه (فاکتورهای مهم در شناسایی لیسه‌های دریایی) کاملاً شبیه به *D. fumata* است. البته در بعضی از نمونه‌های *D. nigra* وجود یک نوار نارنجی‌رنگ در حاشیه‌ی بدن و نیز در بعضی دیگر لکه‌های سفیدرنگی در سطح پشتی بدن، شناسایی آن را راحت می‌کند؛ اما این ویژگی‌های افتراقی در همه‌ی نمونه‌های آن دیده نمی‌شود و نمونه‌هایی که فاقد این دو ویژگی هستند، بسیار شبیه به *D. fumata* می‌باشند. بدن *D. fumata* تا حدودی کشیده و استوانه‌ای است. سطح پشتی بدن صاف و لزج و در قسمت میانی برآمده است. به رنگ‌های مختلفی چون قرمز، صورتی (در نابالغین) و قهوه‌ای تیره یا سیاه (در بالغین)، دیده می‌شود. شمار اندکی چین‌خوردگی عمودی در میانه سطح پشتی بدن و در نمونه‌های بالغ دیده می‌شود. لکه‌های تیره‌ی قهوه‌ای رنگی در سطح پشتی بدن دیده می‌شود (گاهاً در بعضی از نمونه‌های لکه‌های سفیدی بر سطح پشتی بدن دیده می‌شود). از مهم‌ترین ویژگی‌های ممیز این گونه از *D. nigra* وجود آب‌شش‌های پنج شاخه‌ای در *D. fumata* بوده که تا قسمت انتهایی سطح بدن کشیده می‌شوند (آب‌شش‌ها در *D. nigra* تا قسمت انتهایی بدن کشیده نمی‌شوند). در *D. fumata* رینوفورهای هم‌رنگ سطح پشتی بدن بوده و در نوک خود سفیدرنگ‌اند و سطح شکمی کمی روشن‌تر از سطح پشتی و فاقد لکه‌های قهوه‌ای است.

نمونه‌های جمع شده از خلیج فارس با داشتن چنین ویژگی‌هایی *D. fumata* تشخیص داده شدند. این نمونه در خلیج فارس، بیشتر در بستریایی با پوشش جلبکی (عموماً پادینا) زیست می‌کنند و اغلب به صورت چسبیده به سنگ‌ها دیده می‌شود. در زمان جزر به زیر سنگ‌ها رفته و خود را به صورت بسیار محکم و چسبناکی در شکاف سنگ‌ها جای می‌دهند. اغلب به صورت زوج دیده می‌شود.

در مطالعه‌ی تبارشناسی مولکولی Hirose و همکاران (۲۰۱۴)، کلاد *D. fumata* بیشترین نزدیکی را به کلاد *D. rubra* و بیشترین فاصله را با کلاد *D. nigra* داشته است که از این لحاظ با نتایج تحقیق حاضر همپوشانی دارد. در مطالعه Moosavipoor (۲۰۱۳) نمونه‌ی دریای عمان گونه‌ی *D. fumata* در کنار نمونه‌ی استرالیا و با ۹۹ درصد بوتسترپ حمایت قرار گرفت و همچنین کلاد *D. fumata* با ۷۴ درصد بوتسترپ حمایت، کلاد خواهری گونه‌ی *D. nigra* را تشکیل داد، اما در مطالعه‌ی حاضر کلاد *D. fumata*، از میان گونه‌های بررسی شده، بیشترین فاصله را با کلاد *D. nigra* نشان داد. نزدیک‌ترین کلاد به کلاد *D. fumata* در این مطالعه مربوط به کلاد *D. rubra* از آب‌های جنوب شرق آسیا می‌باشد. از طرفی نمونه‌های خلیج فارس به ترتیب بیشترین نزدیکی را با نمونه‌های دریای عمان سپس دریای سرخ و در آخر نمونه‌ی صخره‌های بزرگ مرجانی استرالیا داشته است. در آنالیز درخت اولیه گونه *D. fumata* شاید پارافیلیتیک به نظر می‌رسد (شکل ۳ الف) که با انتخاب برون‌گروه مناسب در مرحله بعد این شبهه رفع شد (شکل ۳ ب). اما به هر حال در همه آنالیزهای مطالعه حاضر شمال درخت‌های تبارشناختی، شبکه‌های پلوتاییبی و فاصله K2P، نمونه‌های این گونه در دو گروه کاملاً متفاوت، شامل استرالیا و شمال غرب اقیانوس هند قرار گرفتند. این میزان واگرایی ژنتیکی اگر با تفاوت‌های ریخت‌شناختی همراه باشد، از آن جایی که محل

تایپ دریای سرخ است، ممکن است منجر به معرفی نمونه‌های استرالیایی به عنوان گونه جدید بشود. مطالعات و بررسی نمونه‌های بیشتر از آن مناطق به هر حال نیاز می‌باشد تا این فرضیه تأیید شود.

با توجه به اینکه از آب‌های خلیج فارس و دریای عمان فقط دو گونه *D. nigra* و *D. fumata* از جنس *Dendrodoris* گزارش شده است (Jones, 1986; Mousavipoor, 2013; Rezai *et al.*, 2016) و به واسطه فقدان ردولا و تشابه ریختی زیاد این دو گونه از هم، سعی شد با کمک نشانگرهای مولکولی صحت شناسایی بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی نیز مورد تأیید قرار گیرد. نتایج، تطابق ریخت‌شناسی و صفات ژنتیکی را تأیید نموده و نشان داد که نمونه‌های آب‌های ایران در کلادی کاملاً مجزا نسبت به گونه‌ی *D. nigra* قرار می‌گیرند.

در پایان پیشنهاد می‌شود با توجه به اینکه بر اساس مطالعات انجام گرفته در آب‌های مجاور، مثل دریای سرخ و دریای عمان (Yonow 2008, 2012; Fatemi and Attaran, 2015)، تخمین زده می‌شود گونه‌های بیشتری از جنس *Dendrodoris* در خلیج فارس وجود داشته باشند که خود انجام مطالعات گسترده‌تر را می‌طلبد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از سرکار خانم طهیرا هاشمی مسئول آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه هرمزگان، به جهت همکاری‌های صمیمانه‌شان در طول تحقیق، کمال تشکر را دارند.

منابع

- Bergh, R. 1876. Malacologische Untersuchungen 10. In: Smeper, C. (ed.). Reisen im Archiel der Philopponen. 2. Teil 2. Bd. pp. 377-427.
- Bosch, D., Dance, S.P., Molenbeek, R.G., Oliver, P.G. 1998. Seashells of Eastern Arabia. Art Books International. Los Angeles. 296p.
- Brodie, G.D., Willan, R.C., Collins, J.D. 1997. Taxonomy and occurrence of *Dendrodoris nigra* and *Dendrodoris fumata* (Nudibranchia: Dendrodorididae) in the Indo-west Pacific region. Journal of Molluscan Studies. 63: 407-423.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. Nature Methods. 9: 772.
- Fatemi, Y., Attaran, G. 2015. Checklist of the opisthobranchs (Heterobranchia: Gastropoda) along the Iranian coasts of the Gulf of Oman. Journal of Biodiversity and Environmental Sciences. 6(3): 1-7.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Molecular Marine Biology and Biotechnology. 3: 294-299.
- Gosliner, T.M., Valdes, A., Behrens, D.W. 2018. Nudibranch & Sea Slug Identification - Indo-Pacific. 2nd edition. New World Publications. Florida. 452 p.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series. 41: 95-98.
- Hirose, M., Hirose, E., Kiyomoto, M. 2014. Identification of five species of *Dendrodoris* (Mollusca: Nudibranchia) from Japan, using DNA barcode and larval characters. Marine Biodiversity. 45(4): 1-12.
- Jones, D.A. 1986. A field guide to the sea shores of Kuwait and the Arabian Gulf. University of Kuwait. 192 p.
- Leigh, J.W., Bryant, D. 2015. PopART: Full-feature software for haplotype network construction. Methods in Ecology and Evolution. 6: 1110-1116.
- Maghsoudlou, A., Momtazi, F., Nasiri, K., Pazooki, S., Molavi-Arabshahi, M., Sepahvand, V., Hekmatara, M., Khaledi, H. 2017. A review on the state of the biodiversity knowledge on Iran's southern seas: introducing a methodology to evaluate the validity of the reported cases. Marine Biodiversity. 49: 563-581.

- Mousavipoor, Y. 2013. Molecular and morphological analysis of some Heterobranchia species (Mollusca) from Chabahar coasts. MsC thesis. Marin biology department. Chabahar Maritime University. 143 p. (in Persian)
- Naderloo, R. 2017. Atlas of Crabs of the Persian Gulf. Springer International Publishing. Switzerland. 290 p.
- Nithyanandan, M. 2012. New and rare nudibranch records from Kuwait, Persian Gulf (Mollusca: Opisthobranchia). *Marine Biodiversity Records*. 5: 1-7.
- Reynolds, R.M. 1993. Physical oceanography of the Gulf, Strait of Hormuz, and the Gulf of Oman Results from the Mt Mitchell expedition. *Marine Pollution Bulletin*. 27: 35-59.
- Rezai, H., Mohtarami, S.A., Dehghani, H., Tavakoli-Kolour, P., Bargahi, H.R., Kabiri, K. 2016. Nudibranchs from the Northern Persian Gulf. *Journal of the Persian Gulf*. 7(23): 71-77.
- Silvestro, D., Michalak, I. 2012. RAxML GUI: a graphical front-end for RAML. *Organisms Diversity & Evolution*. 12: 335-337.
- 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 method. *Molecular Biology and Evolution*. 28: 2731-2739.
- Wägele, H., Vonnemann, V., Wägele, J.W. 2003. Towards a phylogeny of the Opisthobranchia. In: Lydeard, C., Lindberg, D. (eds.). *Molecular systematics and phylogeography of mollusks*. Smithsonian Institution Press, Washington, DC. pp. 185-228.
- Yonow, N. 2008. *Sea Slugs of the Red Sea*. Pensoft Publishers, Sofia-Moscow. 304 p.
- Yonow, N. 2012. Opisthobranchs from the western Indian Ocean, with descriptions of two new species and ten new records (Mollusca, Gastropoda). *ZooKeys*. 197: 1-129.