Archive of SID

مجله علمی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی
تابستان ۱۳۸۸، دوره یکم، شماره اول، صفحه ۴۰ -۳۲

بررسی و شناسایی ملکولی جلبک‌های همزیست زوگزانتله با آبسنگ‌های مرجانی غالب جزیره کیش، خلیج فارس

پرگل قوام‌مصطفوی[۱]، سیدمحمدرضا فاطمی[۱]، محمدحسن شاه‌حسینی[۲]، غلامحسین وثوقی[۳]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه بیولوژی دریا حصارک، تهران
۲- دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرقدس، گروه میکروبیولوژی
۳- دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران

نویسنده مسؤول: دکتر پرگل قوام‌مصطفوی، گروه بیولوژی دریا واحد علوم و تحقیقات mostafavi_pa@srbiau.ac.ir

دریافت: ۸۸/۲/۲ پذیرش: ۸۸/۴/۲

چکیده

سابقه و هدف: مرجان‌های خلیج فارس همواره در معرض شرایط سخت محیطی شامل شوری بالا و تغییرات فصلی درجه حرارت می‌باشند. مطالعات قبلی در سراسر جهان نشان داده است که برخی از گروه‌های *Symbiodinium* مانند کلاد D نسبت به استرس‌های شدید حرارتی مقاوم‌تر می‌باشند. در این تحقیق برای اولین بار شناسایی کلادهای *Symbiodinium* به روش ملکولی در آبسنگ‌های مرجانی سواحل ایرانی خلیج فارس انجام گرفته است.

روش بررسی: نمونه‌های ۸ گونه مرجان در ۲ عمق مختلف (۵ -۳ متر و ۱۰ -۷ متر) از ساحل شرقی جزیره کیش در شمال خلیج فارس جمع‌آوری شده است: زیر واحد بزرگ ریبوزومی ۲۸s با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) تکثیر شده و سپس با استفاده از روش پلی‌مورفیسم تأییدی تک رشته‌ای(SSCP) و آنالیز فیلوژنی سکانس زیر واحد بزرگ ریبوزومی DNA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته است.

یافته‌ها: بر روی مرجان‌های مورد مطالعه تنها دو کلاد متفاوت شناسایی شده است که کلاد D در ۸ گونه مرجان و کلاد C تنها در ۲ گونه شناسایی شده است.

نتیجه‌گیری: غالب بودن کلادD به علت درجه حرارت بالای خلیج فارس قابل توجیه است.

واژگان کلیدی: خلیج فارس، کلاد D، آبسنگ مرجانی، *Symbiodinium*

مقدمه

زوگزانتله همزیست با مرجان‌های آبسنگ‌ساز یک جلبک تک‌سلولی دوتاژکی متعلق به جنس *Symbiodinium* می‌باشد. این همزیست‌های درون‌سلولی بخش عمده‌ای از انرژی مورد نیاز مرجان میزبان را از طریق عمل فتوسنتز تأمین می‌کنند (۱ و ۲) تا جایی که برخی مرجان‌ها برای بقاء خود وابسته به تولید اولیه این همزیست‌ها هستند. *Symbiodinium* و مرجان میزبان نسبت به استرس‌های محیطی شامل شوری (۳) درجه حرارت‌های بالا، درجه حرارت‌های پایین، سطح نوری بالا (۴) و کدورت (۵) حساس بوده، لذا بررسی موقعیت آبسنگ‌های مرجانی معمولاً شاخص سلامت آبسنگ است (۶). امروزه روش‌های تشخیص ملکولی برای شناسایی انواع *Symbiodinium* مورد استفاده قرار گرفته و بر این اساس ۸ کلاد ژنتیکی به صورت کلادهای A-B-C-E-F-G-H (۹ -۷) مشخص شده است. مارکرهای ژنتیکی به کار گرفته شده برای شناسایی انواع *Symbiodinium* عبارتند از فضاهای تعریف شده درون سلول ITS 1,2 همراه با نواحی ۵/۸S (۱۰ و ۱۱) ژن زیر واحد کوچک ریبوزومی (SSU) (۱۲) بخشی از ژن زیر واحد بزرگ ریبوزومی(LSU) (۱۵ -۱۳) می‌باشند. انواع

www.SID.ir

Archive of SID

مختلف *Symbiodinium*، فیزیولوژی مختلفی داشته و این مسأله نقش مهمی در بقاء مرجان‌ها ایفا می‌کند (۸). پدیده سفیدشدگی مرجان که عمدتاً نسبت تأثیر بالا رفتن بیش از حد درجه حرارت سطح آب دریا در طی پدیده El- ENSO) (Niño Southern Oscillation است (۶)، باعث مرگ‌ومیر وسیع مرجان‌ها شده است (۱۶). درجه حرارت‌های بالاتر از حد نرمال یک محیط می‌تواند بر مکانیسم فتوسنتزی *Symbiodinium* تأثیر گذاشته (۱۷)، منجر به آسیب و از دست دادن این جلبک‌های همزیست و در نتیجه پدیده سفیدشدگی شود. در جایی که تنوع ژنوتیپی وسیعی از *Symbiodinium* وجود دارد امکان حضور ژئوتیپ‌های مقاوم به حرارت و به دنبال آن کاهش مرگ‌ومیر مرجان بیشتراست. اما شواهد زیادی وجود دارد که کلاد D نسبت به استرس‌های ناشی از درجه حرارت بالا مقاومت بیشتری داشته (18) و شرایطی که معمولاً رشد مرجان‌ها را به خطر می‌اندازد، بهتر تحمل می‌کند (۱۹ و ۲۰). امروزه، بیشتر مطالعات مربوط به تنوع زیستی *Symbiodinium* در دریای کارائیب (۲۴- ۲۱) و اقیانوس آرام انجام شده است (۱۰، ۲۵، ۲۶) و مطالعات نسبتاً کمی در اقیانوس هند صورت گرفته است که بر روی مرجان های شرق آفریقا (کلاد C , D) (۲۷ و ۲۸)، دریای سرخ (کلاد C, A;۲۸) و ساحل جنوبی خلیج فارس در ناحیه عربستان سعودی (کلاد A، C و D) (۲۸) می‌باشد.

در این مطالعه کار بر روی مرجان‌های خلیج فارس انجام شده است. خلیج فارس دریای نیمه بسته‌ای است که در شمال غربی اقیانوس هند و در ناحیه نیمه گرمسیری واقع شده است و از طریق تنگه هرمز به طور محدود با دریای باز تبادل آب دارد. به این دلیل و به دلیل بالا بودن درجه حرارت سطح دریا که می‌تواند به بیش از ۳۰ در تابستان و زیر $16^{\circ}C$ در زمستان برسد (۲۹)، شرایط آب‌های خلیج فارس برای تشکیل آبسنگ‌های مرجانی، شرایط مناسبی نمی‌باشد. مرگ‌ومیر مرجانی در آب‌های ایران در شمال خلیج فارس، اغلب مرتبط به درجه حرارت‌های بالای آب دریا می‌باشد.در شمال خلیج فارس، ۱۷ جزیره دور از خط ساحلی وجود دارد که دارای مرجان‌های حاشیه‌ای هستند (۳۰). از میان این جزایر، جزیره کیش در آب‌های بسیار شور و الیگوتروف داخل خلیج فارس قرار گرفته است. در سواحل ایرانی نسبت به حاشیه جنوبی خلیج فارس مرجان‌ها از تنوع گونه‌ای کمتری برخوردار بوده، به طوری که درحاشیه عربستان این تعداد تا ۵۰ گونه گزارش شده است، در حالی که در اطراف جزیره کیش تنها ۲۱ گونه مرجان شناسایی شده است. که احتمالاً به علت شرایط نامساعد رشد مرجان در آب‌های شمالی است (۳۱). در طی پدیده ENSO در ۱۹۹۶ و ۱۹۹۸، سفیدشدگی و مرگ‌ومیر شدید مرجان‌ها در اطراف جزیره کیش رخ داده که به علت گرم شدن آب دریا بوده است. اگر پدیده سفیدشدگی طبق آنچه که پیش‌بینی می‌شود به طور مداوم رخ دهد (۶) جمعیت مرجانی سواحل ایران نسبت تنوع پایین گونه‌ای و شرایط نامساعد موجود، در معرض آسیب جدی قرارخواهند گرفت.

شواهد نشان می‌دهد که *Symbiodinium* کلاد D نسبت به سایر کلادهای مشاهده شده در مرجان‌ها به درجه حرارت بالا مقاوم‌تر می‌باشد(۱۸). مقاوم بودن این کلاد نسبت به حرارت بالا، منجر به این فرضیه شده است که پراکندگی این کلاد در آبسنگ‌های مرجانی که در معرض سفیدشدگی ناشی از استرس حرارتی قرار داشته‌اند، بالاتر می‌باشد. از آنجا که جزیره کیش در طی تابستان در معرض درجه حرارت‌های بسیار بالا می‌باشد، به نظر می‌رسد که مرجان‌های جزیره کیش دارای این نوع کلاد باشند. هدف از این مطالعه، بررسی تنوع ژنتیکی *Symbiodinium* در گونه‌های مرجانی جزیره کیش درمقایسه با *Symbiodinium* های جوامع مرجانی سراسر جهان است. نتایج حاصل، دیدگاه ارزشمندی برای حفظ حیات آبسنگ‌های مرجانی ایران و مدیریت آن‌ها، در برابر خطرات آینده ناشی از گرم شدن کره زمین ارایه خواهد داد.

روش بررسی

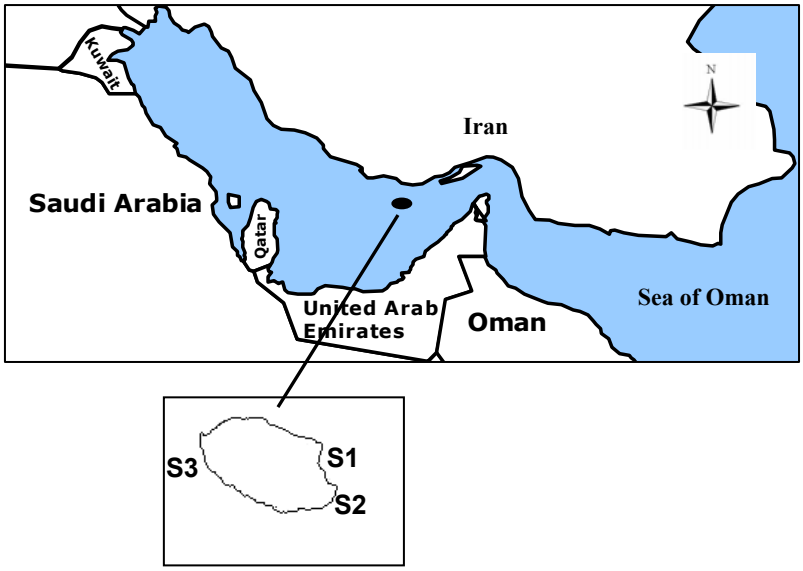
نمونه‌برداری و استخراج DNA: قطعات مرجان‌های آهکی با غواصی از ۳ ایستگاه متفاوت در جزیره کیش به نام‌های S1 (عرض جغرافیایی ″۴۸/۵ ′۳۱ °۲۶ شمالی و طول جغرافیایی ″۱۶/۶ ′۰۲ °۵۴ شرقی) ، S2 (عرض جغرافیایی ″۲۳/۸ ′۳۲ °۲۶ شمالی و طول جغرافیایی ″۴۸ ′۰۱ °۵۴ شرقی) ،S3 (عرض جغرافیایی ″۱۵ ′۳۳ °۲۶ شمالی و طول جغرافیایی ″۳۲ ′۵۴ °۵۳ غربی) (شکل۱) در عمق‌های ۵ -۳ متر و ۱۰ -۷ متر در ژانویه ۲۰۰۵، جمع‌آوری شدند.

گونه‌های مرجان جمع‌آوری شده عبارتند از: *Acropora clathrata* Brook 1891 (تعداد کلنی n = 15) ، *Favia pallida* Dana 1864 (n=15)، *Cyphastrea microphthalma* Lamarck 1816 (n= 15) , *Proites compressa* Dana 1846 (n=۰10) *Platygyra daedalea* Ellis and Solander 1786 (n=15), *Pavona decussata* Dana 1846 (n=10)، *Psammocora contigua* Esper 1797 (n= 10) و *Turbinaria reniformis* Bernard, 1896 (n= 1). جزئیات مربوط به نمونه‌برداری در جدول ۱ آورده شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

قطعات مرجان جمع‌آوری شده در بافر نمکی دی متیل سولفوکساید (20% DMSO ، 250 mM EDTA، اشباع شده با NaCl، pH=8) نگهداری شده و سپس با بافر DNAB (0.4 M NaCl ، 50 mM EDTA ، pH=8) و دستگاه شست‌وشو با هوا (Air Brush) زوگزانتله‌ها از درون بافت مرجان جدا شدند. توده لزج جدا شده جمع‌آوری و در درجه حرارت $^{\circ}C$ ۲۰- در فریزر نگهداری شدند. استخراج DNA از توده زوگزانتله با استفاده از روش CTAB و کلروفرم جدا شد (۱۵).



شکل ۱- مناطق نمونه‌برداری در خلیج فارس. ایستگاه‌های نمونه‌برداری به صورت S1، S2، S3 مشخص شده‌اند

جدول ۱- لیست گونه‌های میزبان، تاریخ و ایستگاه‌های نمونه‌برداری طول قطعه سکانس شده و شماره مسلسل در بانک ژنی

Collection Site and (depth)	Date of collection	LSUsequence length	*Symbiodnium* clade	GenBank Accession Numbers
Kish Island, S1 (4 m)	Jan 2005	625nt	Clade D	DQ312302*
Kish Island, S2 (9 m)	Jan 2005	621 nt	Clade D	DQ312304
Kish Island, S1 (4 m)	Jan 2005	643 nt	Clade D	DQ312305
Kish Island, S1 (4 m)	Jan 2005	657 nt	Clade D	DQ312307
Kish Island, S1 (4 m)	Jan 2005	671 nt	Clade D	DQ312308*
Kish Island, S2 (9 m)	Jan 2005	664 nt	Clade D	DQ312309
Kish Island, S1 (5 m)	Jan 2005	675 nt	Clade D	DQ312310*
Kish Island, S1 (5 m)	Jan 2005	623 nt	Clade D	DQ312311
Kish Island, S1 (4 m)	Jan 2005	618 nt	Clade D	DQ312313
Kish Island, S2 (9 m)	Jan 2005	633 nt	Clade D	DQ312314
Kish Island, S1 (4 m)	Jan 2005	627 nt	Clade D	DQ312316*
Kish Island, S3 (5 m)	Feb 2004	682 nt	Clade D	DQ312318
Kish Island, S2 (3 m)	Jan 2005	619 nt	Clade D	DQ312317
Kish Island, S1 (3 m)	Jan 2005	610 nt	Clade D	DQ312319
Kish Island, S1 (3 m)	Jan 2005	624 nt	Clade D	DQ312320
Kish Island, S2 (9 m)	Jan 2005	660 nt	Clade D	DQ312321
Kish Island, S2 (9 m)	Jan 2005	625 nt	Clade C	DQ312323
Kish Island, S1 (5 m)	Jan 2005	659 nt	Clade C	DQ312324*
Kish Island, S2 (8 m)	Jan 2005	686 nt	Clade C	DQ312326
Kish Island, S1 (3 m)	Jan 2005	644/631 nt	Clade C/D	DQ312327/DQ312322 8*

*سکانس DNA روی باند بریده شده روی ژل SSCP انجام شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز PCR: قطعه‌ای از ژن زیر واحد بزرگ ریبوزومی ۲۸ S *Symbiodinium* (دومین‌های D_1/D_2) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی *Symbiodinium* طراحی شده توسط برنامه Gene Runner تکثیر شد که به صورت به ترتیب Mos Forward و Mos Reverse بودند.

5`-ATA TAA GTA AGC GGA GGA AAAG-3`
5`-CTT TCG GGT CCT AAC ACA CAT G-3`

همه واکنش‌های PCR شامل ۲۰ نانوگرم از DNA الگو، 0/5mM dNTP, ۷/۵pmol از هر پرایمر و ۱/۵ U آنزیم Taq DNA Polymerase (Ampli-Taq, Cinnagen) در حجم کل ۲۵µ استفاده شده و واکنش‌ها در دستگاه ترموسایکلر Hybaid PCR Express با پروفایل حرارتی زیر انجام شدند: ۳۰ ثانیه در $^{\circ}C$ ۹۴، ۱ دقیقه در $^{\circ}C$ ۵۸، ۳۰ ثانیه در $^{\circ}C$ ۷۲ برای ۳۰ سیکل و یک مرحله نهایی ساخت رشته مکمل به مدت ۵ دقیقه در $^{\circ}C$ ۷۲. محصول PCR در ژل آگارز ۱/۵٪ (V:100, 40mA) الکتروفورز و با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شد.

تحلیل پلی‌مورفیسم تأییدی تک‌رشته‌ای: آنالیز پلی‌مورفیسم تأییدی تک رشته‌ای (SSCP) با استفاده از ۱۰µ محصول PCR که با بافر راهنما (۹۵ ٪ فرم مامید، 10mM NaOH ، ۰/۲۵ ٪ بروموفنل بلو و ۰/۲۵ ٪ گزیلن سیانول) حجم حجمش مخلوط شده و به مدت ۵ دقیقه درحرارت $^{\circ}C$ ۹۵ قرار گرفته است، انجام شد پس از باز شدن دو رشته، لوله‌ها سریعاً با استفاده از یخ خرد شده، سرد گردیده و بر روی ژل MDE پلی اکریل آمید (FMC Bioproducts Maine) در بافر TBE x ۰/۶ در ولتاژ ۱۶۰ ولت به مدت ۱۳ ساعت در درجه حرارت اتاق الکتروفورز گردیدند. سپس با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شده و با دستگاه UV ترانس ایلومینیتور مشاهده گردید. باندهای مجزای SSCP از ژل جدا شده و پس از خرد کردن، µl ۲۰ آب دیونیزه به آن اضافه گردید و برای یک شبانه روز در $^{\circ}C$ ۴ قرار داده شد. محلول رویی به عنوان DNA الگو استفاده شده و طبق آنچه قبلاً گفته شد، عمل PCR روی آن صورت گرفت.

توالی‌یابی و آنالیز فیلوژنی: سکانس DNA در جهت Forward با استفاده از امکانات سکانس اتوماتیک ترمیناتور رنگی در مرکز تحقیقات ژنومی استرالیا در دانشگاه کوئینزلند انجام گرفت همه سکانس‌های *Symbiodinium* از ۲۳ نمونه مرجان برای آنالیز فیلوژنی استفاده گردید. همه سکانس‌ها با استفاده از ClustalX تنظیم گردید (۳۲). بسیاری از کلادهای E شناخته شده در بانک ژنی متعلق به کلاد D می‌باشد. کلاد E متعلق به گونه *varians* (*Gymnodinium*) *Symbiodinium* و برخی ژنوتیپ‌های متعلق به آب‌های مناطق معتدله می‌باشد (۸)، سکانس‌های استفاده شده دراین جا عبارتند از: کلاد A (AY596824, AF427453)، کلاد B (AY596825, AF427459, AF427457)، کلاد C (DQ060734 AF427463 , AJ620934 , AJ620935 , AJ620944 , AJ621128 , DQ060763 , AF279914)، کلاد D (AF396626 , AF396628 , AJ308902 AF170149، AF349547 , AY588448)، کلاد E (AF060899 , *S.varians* , AY684264) کلاد F (AJ621142، AJ621146 , AJ621144)، کلاد G (AJ291536)، کلاد H (AJ621132 , AJ621131 , AJ621149 , AJ621129)، درخت بر ریشه *beii* *Gymnodinium* (AF0620900) رسم گردید.

رفرانس‌های کلاد C, D پس از جستجوی BLASTN (۳۳)، بر مبنای حداکثر همخوانی با سکانس‌های ما انتخاب شدند. درخت فیلوژنی با استفاده از maximum likelihood (ML)، حداکثر parsimony (MP) و روش‌های Bayesian رسم شد. قبل از این آنالیزها MODELTEST , مدل ۲/۰۶ (۳۴) برای تشخیص حداکثر تناسب مدل انتخابی برای داده‌های Bayesian, ML استفاده گردید.

با استفاده از تست AIC، که (GTR+ I+ G) برای DNA ریبوزومی 28S *Symbiodinium* را نشان می‌دهد. آنالیزهایML, MP با استفاده از مدل بتا PAUP 4.0b10 انجام شده است (۳۵). همه کاراکترهاارزش یکسان داشته و خارج از نظم بودند. برای ML، یک heuristic Search با۱۰۰ گونه اضافی به طور اتفاقی انجام گرفت. کلادهای ML با ۱۰۰ تکرار bootstrap بررسی شدند که این کار با استفاده از همان مدل heuristic Search انجام شد. کلادهای MP با ۱۰۰ تکرار اتفاقی bootstrap به استثناء کاراکترهای نامشخص بررسی شدند با ۱۰۰ گونه اضافی که به طور اتفاقی برای هر تکرار استفاده شد. آنالیز Bayesian با نرم‌افزار Mr Bayes (۳۶) و بر پایه Modeltest که در بالا گفته شد، پایه‌گذاری شده است. با شروع از درخت‌های راندوم، چهار زنجیره Markov (با ۳ زنجیره heated) همزمان با درخت‌های نمونه با استفاده از پایه Markov Chain Monte (MCMC) Corlo بررسی شدند. پس از فاز burn-in (۱۲۹۰۰ نسل اول، جدا شده بود)، هر ۱۰۰ درخت در بین ^{6} ۱۰در نظر گرفته شد. درخت‌های فیلوژنی ایجاد شده در همه آنالیزها با استفاده از برنامه TREEVIEW مدل 1.6.5 قابل مشاهده شد (۳۷).

www.SID.ir

Archive of SID

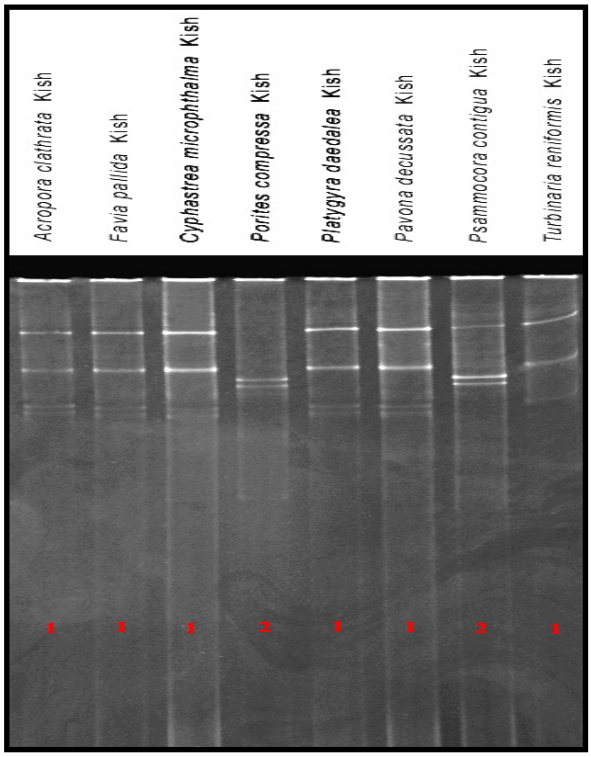
یافته‌ها

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز PCR: اندازه محصول واکنش زنجیره‌ای PCR بر روی ژن RNA ریبوزومی ۲۸S *Symbiodinium*، ۷۸۰bp بوده که در هر ۸ گونه مرجان مانند هم می‌باشد. این محصول برای آنالیزهای SSCP و سکانس DNA مورد استفاده قرار گرفت.

آنالیز SSCP: بخشی از DNA ریبوزومی ۲۸S *Symbiodinium*، که از مرجان‌های آهکی اطراف جزیره کیش تکثیر شده (۳ ایستگاه)، با روش تشخیص مولکولی SSCP مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که به طور کلی جمعیت *Symbiodinium* در میان و در بین جمعیت‌های ۸ گونه مرجان مورد مطالعه یکسان بوده است. پروفایل‌های SSCP نشان داده شده در شکل ۲، معرف هر گونه مرجان به طور مجزاست و پروفایل‌های همه کلنی‌های مرجان نیز در دسترس است. خلاصه‌ای از پروفایل‌های SSCP، گونه‌های مرجان، محل و عمق نمونه‌برداری درجدول ۱ نشان داده شده است. در جزیره کیش *Acropora clathrata* (n= 15)، *Favia pallida* (n= 15)، *Cyphastrea microphthalema* (n= 15)، *Pavona decussata* (n= 10)، *Platygyra daedalea* (n= 15) پروفایل SSCP یکسان نشان می‌دهند (شکل ۲ - پروفایل۲) و در بین کلنی‌ها، ایستگاه‌ها و عمق‌های مختلف هیچ تفاوتی دیده نمی‌شود.

یک پروفایل SSCP متفاوت (شکل ۲ - پروفایل ۲) در کلنی‌های *Psammocora contigua* (n= 10) *Porites compressa* (n= 15) دیده می‌شود که در کلنی‌های متفاوت یکسان بوده و در ایستگاه‌ها و عمق‌های متفاوت نیز تغییری نداشته است .

توالی‌یابی DNA: توالی‌یابی سکانس مستقیم بر روی محصولات PCR از گونه‌های مرجانی موجود و از کلنی‌هایی که در پروفایل SSCP دیده شد، انجام گرفت. توالی‌های *Symbiodinium* به طور واضح و روشن به دست آمد (جدول ۱). آنالیزهای BLASTN سکانس‌ها نشان داد که نتایج حداکثر تشابه را (>۹۹٪) با زیرکلادهای C۹۰ و D_1 دارند. نتایج نشان دادند که باندهای غالب در پروفایل ۱ و ۲ SSCP به ترتیب معرف جمعیت‌های *Symbiodinium* متعلق به کلاد D و C هستند. این‌گونه در نظر گرفته شد که باندهای ضعیف اشکالی در سکانس مستقیم به وجود نیاورده‌اند، چرا که مقدار آن‌ها بسیار کم بوده و می‌توانند نشانگر هترودوپلکس‌ها و یا ژن‌های کاذب همان ژنوتیپ باشد. برای تأیید این نتایج، باندهای غالب از ژل بریده شده (در *F.pallida* , *A.clathrata* *C.microphthalma*) (شکل ۲). بر روی DNA موجود در این باندها PCR و سپس سکانس انجام گرفت. سکانس‌های به دست آمده تأیید می‌کرد که باندهای غالب DNA تک رشته‌ای، کلاد D هستند (باندهای بریده شده در شکل ۲ نشان داده شده است). سکانس باندهای غالب بریده شده از پروفایل ۲ نیز نشان دهنده کلاد C بود. باندهای ضعیف بریده شده از پروفایل ۲ در *P.contigua* تکثیر یافته و پس از سکانس مشخص شد که متعلق به کلاد D می‌باشد. هر چند که این باند کمی با پروفایل ۱ (کلاد D) متفاوت است، البته درصد شباهت زیادی با ژنوتیپ کلاد D حاصل از سکانس مستقیم نشان می‌دهد. *P.contigua* کلاد C و D را به طور همزمان دارا می‌باشد. همه سکانس‌ها در بانک ژنی قرار گرفته‌اند و نمره مسلسل آن‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است.



شکل ۲- پروفایل‌های پلی‌مورفیسم تائیدی تک‌رشته‌ای (SSCP) از قطعه ژن ریبوزومی ۲۸S تکثیر شده توسط PCR (دومین‌های D_1/D_2). پروفایل‌های SSCP بیانگر کلنی‌های جزیره کیش بوده که در هر خط نشان داده شده است. نام گونه، مرجان میزبان و محل آن، در هر ردیف نشان داده شده است. پروفایل ۱ و ۲ معرف جمعیت *Symbiodinium* بوده که ریز کلاد D_1 و C۹۰ به ترتیب غالب هستند.

www.SID.ir

Archive of SID

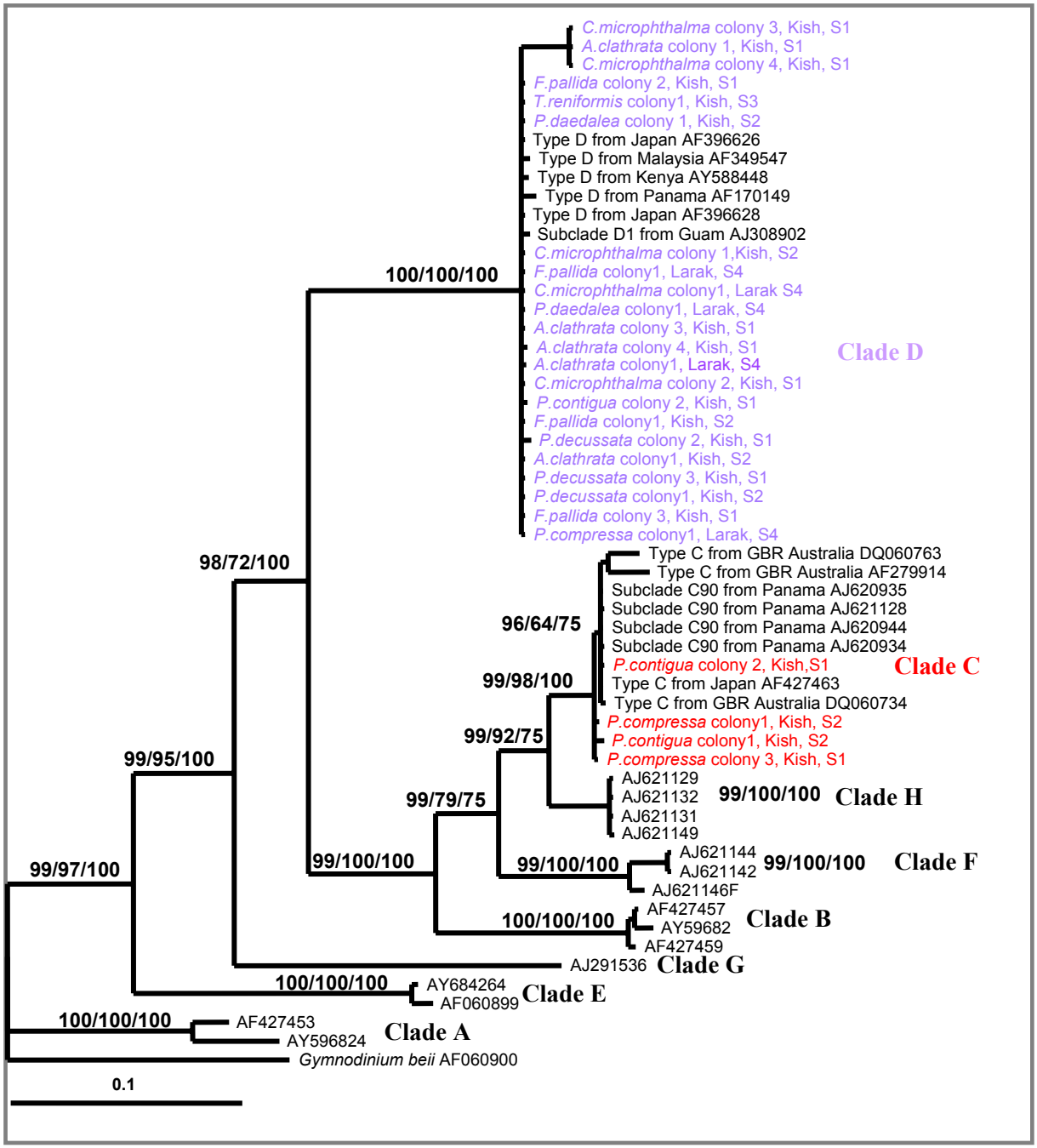
تجزیه فیلوژنی: طول قطعه سکانس شده DNA ریبوزومی 28S در محدوده‌ای بین ۵۰۰ تا ۷۶۵ جفت باز قرار دارد. (به جدول برای طول هر قطعه مراجعه شود). مقایسه سکانس‌های 28S به دست آمده با سکانس‌های رفرانس بانک ژنی ۷۶۳ موقعیت را نشان می‌دهد که ۳۰۰ عدد از آن informative-Parsimony می‌باشد. از نتیجه آنالیز MP، ۱۰۰۰ درخت equally-parsimonious و از نتیجه ML، ۸۸ درخت به دست آمد که با مطابقت با درخت Bayesian یک توپولوژی مشابه با سایر متدولوژی‌ها به دست آمد. از آنجا که درخت به دست آمده در همه آنالیزها یکسان بود، مقادیر bootstrap، آنالیز MP و ML بر درخت Bayesian نشان داده شد (شکل ۳). کلادهای *Symbiodinium* در این جا به گروه‌های کلاد D و C تعلق دارند. کلاد D از *A.clathrata* , *F.pallida* , *P.daedalea* , *P.decussata* , *C.microphthalma* *P.contigua* , *T.reniformes* در دسته کلاد D_1 قرار می‌گیرند که در مرجان‌های سراسر دنیا نیز دیده شده است. کلاد C مشخص شده در این تحقیق بسیار نزدیک به کلاد C۹۰ بوده که فقط در فرامینیفراهای شرق اقیانوس آرام یافت شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

غالبیت کلاد D در خلیج فارس: در آبسنگ‌های مرجانی اطراف جزیره کیش، کلنی‌های *A. clathrata*، *C.microphthalma*، *F.pallida*، *P.contigua*، *P.decussata*، *P.daedalea*، *T.reniformes*. میزبان *Symbiodinium* کلاد D هستند که به عنوان زیر کلاد D_1 (شباهت ٪۹۹<) در نظر گرفته شده است. مطالعات قبلی در مورد کلادهای *Symbiodinium* توسط Baker و همکاران بر روی تعداد کمی از کلنی‌های هر گونه مرجان (۱ تا ۴ کلنی) در آبسنگ‌های مرجانی عربستان سعودی در جنوب خلیج فارس انجام شده است. در مطالعه حاضر که بر روی ۱۵ کلنی از هر ۸ گونه مرجان که معمول‌ترین گونه‌های مرجان‌های آهکی آبسنگ‌های ایرانی هستند، انجام شد، مشخص گردید که زیر کلاد D_1 غالب‌ترین جمعیت *Symbiodinium* در این ناحیه است. همه کلنی‌های ۸ گونه که به طور مشابه زیر کلاد D_1 را دارا می‌باشند متعلق به دامنه وسیعی از خانواده‌های مرجانی شامل Acroporidae Agariciidae, Dendrophyllidae, Faviidae, Poritidae, Siderastreidae می‌باشند. حضور کلاد D_1، ارتباطی به ایستگاه‌ها و عمق‌های متفاوت نداشته و در همه آنها به طور یکسان دیده شده است. مطالعات Baker و همکاران (۲۰۰۴)(۲۸) نیز به طور مشابهی غالب بودن کلاد D در حاشیه جنوبی خلیج فارس را نشان می‌دهد. در مقایسه با آن در همین جنس یا گونه‌های مشابه، در عمق‌های مشابه از سایر مناطق مانند اقیانوس هند (۲۸) و آبسنگ مرجانی بزرگ استرالیا (۱۰) به ترتیب زیر کلادهای A و C غالب هستند. غالبیت کلاد D به خصوص در گونه‌های مرجانی خلیج فارس و نه سایر قسمت‌های اقیانوس هند و آرام نشان می‌دهد که کلاد D یک کلاد مخصوص به این ناحیه است. این مسأله، سایر مطالعاتی که تنوع جغرافیایی زیستی کلادهای *Symbiodinium* را در مرجان‌های سراسر دنیا نشان می‌دهد، تأیید می‌کند(۱۴ و ۳۸). مقاومت کلادهای ژنوتیپی *Symbiodinium* نسبت به درجه حرارت‌های بالا متفاوت است (۱۵ و ۲۵). Jones و همکاران (۳۹) نشان دادند که درجه حرارت‌های بالاتر از حد نرمال می‌تواند عمل فتوسنتز در *Symbiodinium* را متوقف کنند، و منجر به پدیده سفیدشدگی مرجان شوند. مکانیسم فتوسنتزی کلاد D *Symbiodinium*، شواهدی دال بر مقاومت درجه حرارت بالا نسبت به سایر کلادها نشان می‌دهد (۱۸) از نظر جهانی کلاد D به طور معمول در مرجان‌های محیط‌هایی با درجه حرارت و شوری بالا، درجه حرارت زیاد و نور کم (۴۰) و تأثیرات قابل توجه خشکی بر دریا مانند کدورت (۲۰ و ۲۵) دیده می‌شوند. حضور کلاد D_1 ممکن است بیانگر سازش‌هایی به حداقل دو فاکتور محیطی نامناسب آب‌های خلیج فارس شامل نوسانات فصلی درجه حرارت سطح دریا ($^{(C)}$۳۴-۱۴) و شوری بالا (تا ppt ۴۰) باشد (۴۱) که محیطی با شرایط نامناسب برای تکامل آبسنگ‌های مرجانی ایجاد می‌کند (۳۱). کلاد D_1 *Symbiodinium* ممکن است به یک یا چند شرایط سخت محیطی سازش داشته باشد بنابراین می‌تواند به عنوان همزیست مرجان‌های خلیج فارس در نظر گرفته شود. Glynn و همکاران (۲۶) و Baker و همکاران (۳۲) پیشنهاد دارند که مرجان‌های دارای کلاد D *Symbiodinium* نسبت به سفیدشدگی مرجان ناشی از حرارت مقاوم‌تر بوده و بنابراین پس از پدیده سفیدشدگی فراوانی بیشتری دارند. آبسنگ‌های مرجانی ایران در جزیره کیش در معرض سفیدشدگی شدید در طی سال‌های ۱۹۹۶ و ۱۹۹۸ قرار گرفته‌اند (۱۶). البته نمی‌توان ارتباطی بین فراوانی کلاد D در مرجان‌هایی که بقاء یافته‌اند و پدیده سفیدشدگی ایجاد کرد، زیرا هیچ یک از مرجان‌ها در این ناحیه قبل از ۲۰۰۴ بررسی نشده‌اند. Thornhill و همکاران (۳۲) شواهد زمان‌بندی شده و دقیقی ارایه داده‌اند که کلاد D موجود در مرجان‌های کارائیب پس از ۱۹۹۸، به تدریج تا سال ۲۰۰۴ با سایر کلادها جایگزین شده است. از غالبیت جمعیت کلاد D در خلیج فارس چندین سال پس از سفیدشدگی (۱۹۹۸) این گونه به نظر می‌رسد که این کلاد همزیست ثابت و دایمی در این ناحیه است.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳- درخت Bayesian از ژنوتیپ‌های DNA ریبوزومی ۲۸S از مرجان‌های جزیره کیش (شماره مسلسل در جدول آورده شده است) کلادهای کنترل (A, B, C, D, E, F, G) و یک موجود Outgroup (*Gymnodinium beii*) در آنالیز قرار دارند (شماره مسلسل در شکل نشان داده شده است). اختلالات بعدی Bayesian / درصدهای بوت استراپ پارسیمونی از ۱۰۰۰ درخت / درصد بوت استراپ حداکثر لایکلی هود از ۱۰۰ درخت در گره‌ها نشان داده شده است. تنها بوت استراپ‌های ارزش بیش از ۹۵٪ نشان داده شده است مگر آن‌هایی که وجود نداشته است. فواصل بیانگر تعداد موقعیت‌ها در هر ۱۰۰ باز است. گونه‌های مرجان‌های میزبان عبارتند از: *Acropora clathrata*، *Favia pallida*، *Cyphastrea microphthalma*، *Porites compressa*، *Platygyra daedalea*، *Pavona decussata*، *Psammocora contigua* و *Turbinaria reniformes*.

www.SID.ir

Archive of SID

زیر کلاد C۹۰ در ۲ گونه از مرجان‌های آبسنگ‌ساز: در اغلب *Symbiodinium* های مورد بررسی در اقیانوس هند، آرام، کلاد C، کلاد غالب می‌باشد (28 ;49). در این مطالعه تنها ۲ گونه مرجان*P.compressa* , *P.contigua* از ۸ گونه، میزبان کلاد C بودند که به عنوان زیر کلاد C۹۰ (بیش از ۹۹٪ شباهت) مشخص شده است. حضور زیر کلاد C۹۰ در *P.compressa* , *P.contigua* در سواحل شگفت‌آور است، چراکه C۹۰ نوعی از کلاد C است که تنها در فرامینفراهای شرق اقیانوس آرام (۹) یافت شده است و از این رو هیچ موردی از حضور این زیر کلاد در کنیداریاها وجود ندارد. با استفاده از سکانس‌های ITS2 DNA مشخص شده است که مرجان‌های گروه Poritid، در سراسر دنیا میزبان زیر کلاد C_{15} هستند (۹ و ۱۰). به نظر می‌رسد که زیر کلاد C_{15} معمول در مرجان‌های *Porites* از C۹۰ که به عنوان نوع «اجدادی» در نظر گرفته می‌شود مشتق شده است (۹).

هرچند Pochon و همکاران(۹) پیشنهاد می‌دهند که ارتباط بین C_{15} و C۹۰ نمی‌تواند با استفاده از فیلوژنی LSU تجزیه و تحلیل گردد، اما سکانس‌های کلاد C از *Porites* به طور کاملاً واضحی با زیر کلاد C_{15} مشابه نبوده (شباهت ۹۸/۷٪ در مقایسه با سکانس C_{15}، شماره مسلسل AY239387، تاریخ ثبت در بانک ژنی مشخص نشده است). جمعیت‌های *Symbiodinium* همزیست با *P.contigua* دارای زیر کلادهای C۹۰ و D_1 می‌باشند. برخی مرجان‌های آهکی دارای چندین نوع کلاد در یک کلنی منفرد هستند (۲۲). پراکندگی انواع همزیست‌ها در کلنی‌های مرجان از اعماق کم یا متوسط. مشابه تحقیق حاضر، مرتبط به سطوح نوری بوده و ممکن است با فوتوفیزیولوژی متفاوت در میان همزیست‌ها ارتباط داشته باشد (۲۵) حضور کلاد C ,D در *P.contigua* می‌تواند نشان‌دهنده سازش به شرایط محیطی باشد.

اشاره‌ای به آبسنگ‌های مرجانی ایران: هنوز مشخص نیست که آیا مقاومت کلاد D *Symbiodinium* نسبت به گرما در طبیعت نیز به همان اندازه که در آزمایشات انجام شده توسط Rowan (۱۸) به دست آمده است می‌باشد، یا خیر؟ اگر چنین است، غالب بودن کلاد D در اغلب گونه‌های مرجانی آبسنگ‌های ایران و عربستان سعودی درخلیج فارس، می‌توانند در حفظ مرجان‌ها از استرس‌های حرارتی آینده که می‌توانند منجر به پدیده سفیدشدگی شود، داشته باشد. این‌گونه حفاظت‌ها، اگر وجود داشته باشد، تنها تا حد آستانه حرارتی کلاد D مناسب بوده و ممکن است با درجه حرارت‌های آینده کره زمین که توسط Hoegh-Guldberg (۶) پیش‌بینی شده است. بر هم زده شود. با این همه، حقیقت این است که محدوده وسیعی از مرجان‌های جزیره کیش دارای این کلاد بوده و می‌توانند در آینده یک حالت اپتیمم (مطلوب) برای نگهداری تنوع مرجان‌ها در آبسنگ‌های مرجانی ایران در مقابل گرم شدن کره زمین ایجاد کنند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مراتب تشکر وقدردانی خود را از دفتر محیط زیست دریایی سازمان حفاظت محیط زیست برای تأمین بودجه این تحقیق، مرکز مطالعات دریایی دانشگاه Queensland استرالیا برای در اختیار قرار دادن تمام امکانات آزمایشگاهی و مرکز تحقیقات علوم سلولی و ملکولی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به خصوص آقای دکتر بهرام کاظمی، خانم‌ها مژگان بنده‌پور و نگار سید، ابراز می‌دارند.

References

1- Trench RK. *Dinoflagellates in non-parasitic symbioses*. In: Taylor FJR (ed) Biology of dinoflagellates. Blackwell, Oxford, 1986, 530- 570.

2- Muscatine L, Falkowski PG, Porter, JW, Dubinsky Z. *Fate of photosynthetic fixed carbon in light and shade-adapted colonies of the symbiotic coral Stylophora pistillata*. Proc R Soc Lond Ser B 1984, 222: 181- 202.

3- Reimer AA. *Observations on the relationship between several species of tropical zoanthids (Zoanthidae, Coelenterata) and their zooxanthellae*. J Exp Mar Biol Ecol 1971, 7: 207- 217.

4- Hoegh-Guldberg O, Smith J. *The effect of sudden changes in temperature, light and salinity on the population density and export of zooxanthellae from the reef corals Stylophora pistillata Esper and Seriatopora hystrix Dana.* J Exp Mar Biol Ecol. 1989; 129: 279- 303.

5- Ulstrup KE, van Oppen MJH. *Geographic and habitat partitioning of genetically distinct zooxanthellae (Symbiodinium) in Acropora corals on the Great Barrier Reef.* Mol Ecol. 2003,12: 3477- 3484.

6- Hoegh-Guldberg O. *Climate change, coral bleaching, and the future of the world's coral reefs*. Mar Fresh w Res .1999, 50: 839- 866.

7- Rowan R, Powers DA. *A molecular genetic classification of zooxanthellae and the evolution of animal- algal symbiosis*. Science. 1991, 251: 1348- 1351.

8- Baker AC. *Flexibility and specificity in coral-algal symbiosis: diversity, ecology and biogeography of Symbiodinium. Annu Rev Ecol Evol Syst*. 2003, 34: 661- 689.

9- Pochon X, LaJeunesse TC, Pawlowski J. *Biogeographic partitioning and host specialization among foraminiferan dinoflagellate symbionts (Symbiodinium; Dinophyta*). Mar Biol .2004, 146: 17- 27.

10- LaJeunesse TC, Loh WKW, van Woesik R, Hoegh-Guldberg O, Schmidt GW, Fitt WK. *Low symbiont diversity in southern Great Barrier Reef corals, relative to those of the Caribbean.* Limnol Oceanogr. 2003, 48: 2046- 2054.

11- Wilkinson C. *The 1997-98 mass coral bleaching and mortality events: 2 years on*. In: Wilkinson CR (ed) Status of

www.SID.ir

Archive of SID

coral reefs of the world: 2000. Australian Institute of Marine Science, Townsville, 2000, 21- 34.

12- Rowan R, Powers DA. *Ribosomal RNA sequences and the diversity of symbiotic dinoflagellates (zooxanthellae).* Proc Natl Acad Sci. USA 1992, 89: 3639- 43.

13- Pochon X, Pawlowski J, Zaninetti L, Rowan R. *High genetic diversity and relative specificity among Symbiodinium-like endosymbiotic dinoflagellates in soritid foraminiferans*. Mar Biol. 2001, 139: 1069- 1078.

14- Loh WKW, Loi T, Carter D, Hoegh-Guldberg O. *Genetic variability of the symbiotic dinoflagellates from the wide ranging coral species Seriatopora hystrix and Acropora longicyathus in the Indo-West Pacific*. Mar Ecol Prog Ser. 2001, 222: 97- 107.

15- Baker AC. *Symbiosis ecology of reef-building corals*. PhD dissertation, University of Miami, 1999; 120.

16- Wilcox TP. *Large subunit ribosomal RNA systematic of symbiotic dinoflagellates: morphology does not recapitulate phylogeny*. Mol Phylogenet Evol .1998, 10: 436- 448.

17- Hoegh-Guldberg O, Jones RJ, Ward S, Loh WK. *Is coral bleaching really adaptive*? Nature. 2002, 415: 601- 602.

18- Rowan R. *Thermal adaptation in reef coral symbionts*. Nature. 2004, 430: 742.

19- Van Oppen MJH, Willis BL, van Vugt HWJA, Miller DJ. *Examination of species boundaries in the Acropora cervicornis group (Scleractinia, Cnidaria) using nuclear DNA sequence analyses*. Mol Ecol.2000, 9: 1363- 1373.

20- Chen CA, Lam KK, Nakano Y, Tsai WS. *Stable association of a stress-tolerant zooxanthellae, Symbiodinium clade D, with the low-temperate tolerant coral Ouastrea ∏rispate, (Scleractinia; Faviidae) in subtropical nonreefal coral communities*. Zool Stud. 2003, 42: 540- 550.

21- Visram S, Obura DO, Wiedenmann J, Douglas AE. *The diversity of zooxanthellae (Symbiodinium) in Kenyan corals and Mediterranean sea anemones*. Coral Reefs. 2006, 25: 172 - 176.

22- Baker AC, Rowan R, Knowlton N. *Symbiosis ecology of two Caribbean acroporid corals*. In: Lessios HA, MacIntyre IG (eds). Proceedings of the 8th International Coral Reef Symposium, vol 2. Smithsonian Tropical Research Institute, Balboa, Panama, 1997, 1295- 1300.

23- Diekmann OE, Olsen JL, Stam WT, Bak PPM. *Genetic variation within Symbiodinium clade B from the coral genus Madracis in the Caribbean (Netherlands Antilles) Coral Reefs* 2003; 22: 29- 33.

24- Rowan R, Knowlton N, Baker A, Jara J. *Landscape ecology of algal symbionts creates variation in episodes of coral bleaching.* Nature .1997, 388: 265- 269.

25- Loh WKW, Carter D, Hoegh-Guldberg O. *Diversity of zooxanthellae from scleractinian corals of One Tree Island (The Great Barrier Reef)*. In: Greenwood JG, Hall NJ (eds). Proceedings of the Australian Coral Reef Society's 75th Anniversary, Heron Island-GBR. School of Marine Science, University of Queensland, Brisbane, 1998, 141- 149.

26- Glynn PW, Mate´ JL, Baker AC, Calderón MO. *Coral bleaching and mortality in Panama and Ecuador during the 1997-1998 El Niño-Southern oscillation event:spatial/temporal patterns and comparisons with the 1982-1983 events.* Bull Mar Sci. 2001, 69: 79- 109.

27- Wilson SS, Fatemi MR, Shokri MR, *Claereboudt M. Status of coral reefs of the Persian/Arabian Gulf and Arabian Sea region*. In: Wilkinson CR (ed) Status of coral reefs of the world: 2002, GCRMN Report, Australian Institute of Marine Science, Townsville, 53- 62.

28- Baker AC, Starger CJ, McClanahan TR, Glynn PW. *Corals' adaptive response to climate change*. Nature .2004, 430: 741.

29- Downing N. *Coral reef communities in an extreme environment: the northwestArabian Gulf*. In: Gabrie C, Salvat B, Bayesian Lacroix C, Toffart, JL (eds). Proceedings of the 5th International Coral Reef Congress, vol 6, Antenne Museum-EPHE Moorea, Tahiti, French Polynesia, 1985, 343- 348.

30- Shokri MR, Fatemi SMR, Crosby MP. *The status of butterflyfishes (Chaetodontidae) in the northern Persian Gulf, I.R. Iran.* Mar Freshw Ecosyst .2005, 15: S91- S99.

31- Fatemi SMR, Shokri MR. *Iranian coral reefs status with particular reference to Kish Island, Persian Gulf.* International Coral Reef Initiative, Indian Ocean Regional Workshop, Maputo.2001.

32- Thornhill DJ, LaJeunesse TC, Kemp DW, Fitt WK, Schmidt GW. *Multi-year, seasonal genotypic surveys of coral-algal symbiosis reveal prevalent stability or post-bleaching reversion*. Mar Biol .2006, 148: 711- 722.

33- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, et al. *Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs*. Nucleic Acids Res. 1997, 25: 3389- 3402.

34- Posada D, Crandall KL. *MODELTEST: testing the model of DNA substitution*. Bioinformatics. 1998, 14: 817- 818.

35- Swofford DL. *PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods),* Version 4.0b10, Sinauer Associates, Sunderland, Mass. USA. 2002.

36- Ronquist F, Huelsenbeck JP. *MRBAYES 3: phylogenetic inference under mixed models.* Bioinformatics. 2003, 19: 1572- 1574.

37- Page RDM. *TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers*. Comput Appl Biosci. 1996, 12: 357- 358.

38- Rodriguez-Lanetty M, Loh W, Carter D, Hoegh-Guldberg O. *Latitudinal variability in symbiont specifity within the widespread scleractinian coral Plesiastrea versipora*. Mar Biol. 2001, 138: 1175- 1181.

39- Jones RJ, Hoegh-Guldberg O, Larkum AWD, Schreiber U. *Temperature-induced bleaching of corals begins with impairment of the CO_2 fixation mechanism in zooxanthellae*. Plant Cell Environ. 1998, 21: 1219- 1230.

40- Van-Oppen MJH. *Mode of zooxanthellae transmission does not affect zooxanthellae diversity in acroporid corals.* Mar Bio.l 2004, 144:1- 7.

41- Coles SL, Fadlallah YH. *Reef coral survival and mortality at low temperatures in the Arabian Gulf: new species-specific lower temperature limits*. Coral Reefs. 1991, 9: 231- 237.

42- Rowan R, Powers DA . *A molecular genetic identification of symbiotic dinoflagellates (zooxanthellae).* Mar Ecol Prog Ser .1991, 71: 65- 73.

www.SID.ir