Archive of SID

اقیانوس‌شناسی/ سال یازدهم/ شماره ۴۲/ تابستان ۱۳۹۹/۱۱/۱۴۷_۱۳۷

Downloaded from joc.inio.ac.ir at 9:44 IRST on Tuesday March 9th 2021

بررسی روابط فیلوژنتیک پرتاران جنس *Perinereis* در سواحل دیلم، بوشهر، دیر و بندرعباس در خلیج فارس

سارا امیری[۱]، پرگل قوام مصطفوی[۲*]، سید محمدباقر نبوی[۳]، محمدحسن شاه حسینی[۴]

۱- گروه علوم دریایی، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران.
۲- گروه علوم دریایی، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، پست الکترونیکی: mostafavi_pa@srbiau. ac.ir
۳- گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، ایران.
۴- دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر قدس، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۸/۹/۲۷ * نویسنده مسوول تاریخ پذیرش: ۹۹/۴/۲۰

چکیده

پرتاران علاوه بر اهمیت اکولوژیک در زنجیره غذایی دریایی، جهت پایش اکوسیستم ها و ارزیابی استرس محیطی جایگاه ویژه‌ای دارند. از بارکدینگ DNA میتوکندریایی و توالی یابی ژن COI جهت مقایسه واگرایی‌های نوکلئوتیدی در این مطالعه جهت آنالیز مولکولی پرتاران جنس *Perinereis* (خانواده Nereididae) استفاده شد. آنالیز ۵۰ نمونه توالی یابی شده در این تحقیق، ۳۹ توالی ژنی جدید و ۱۱ توالی با قرابت ۱۰۰ درصد با رکوردهای ژن بانک از پرتاران *Perinereis* را آشکار نمود و میزان واگرایی های بین گونه ای ۱/۸ برابر فواصل درون گونه‌ای مشاهده گردید (۱/۹۶ درصد نسبت به ۳/۵۲ درصد). آنالیزهای فیلوژنتیک نشان داد که بسیاری از گونه های پرتاران *Perinereis* مشاهده شده سواحل خلیج فارس، قرابت ژنتیکی بالایی با گونه‌های مشابه در آب های مناطق دیگر جهان نداشتند.با بررسی میزان شباهت ژنتیکی مشخص گردید که پرتاران *Perinereis* مستقر در سواحل استان بوشهر قرابت ژنی نسبتا بالایی با یکدیگر داشته و با جنس *Perinereis* مستقر در بندرعباس تا حدودی متفاوت بودند ولی این تفاوت ها عمدتا در حد زیرگونه ای بوده و به لحاظ ساختار گونه ای، پرتاران *Perinereis* در سواحل ایستگاه های دیلم، بوشهر، دیر و بندر عباس واگرایی ژنتیکی اندکی نسبت به یکدیگر داشتند.

کلمات کلیدی: *پرتاران، Perinereis، COI، بارکدینگ، خلیج فارس.*

۱. مقدمه

خانواده Nereididae (Blainville, 1818) از رده پرتاران از شاخهٔ حلقویان Annelida با دارا بودن ۴۵ جنس و ۶۹۰ گونه (Read and Fauchald, 2019) و از متنوع ترین خانواده های پرتاران به شمار می آید(Hutchings & Fauchald, 2000). نرئیدیده های دریازی معمولاً در نزدیکی مصب رودها زندگی می کنند و لاروآنها به و عنوان شاخص طبیعی اکوسیستم‌های آبی و همچنین جهت بهبود کیفیت رسوبات بنتیک و پایش آلاینده‌ها نیز اهمیت دارند (Jiang & Liu, 2008). جنس Perinereis با ۸۳ گونه از متنوع ترین جنس‌های کرم های نرئید است (Read and Fauchald, 2019). حضور این جنس قبلا در طی تحقیقات پیشین در خلیج فارس و دریای عمان گزارش شده است (سلیمانی راد و همکاران، ۱۳۹۲؛ دریا و همکاران، ۱۳۹۵؛

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from joc.inio.ac.ir at 9:44 IRST on Tuesday March 9th 2021

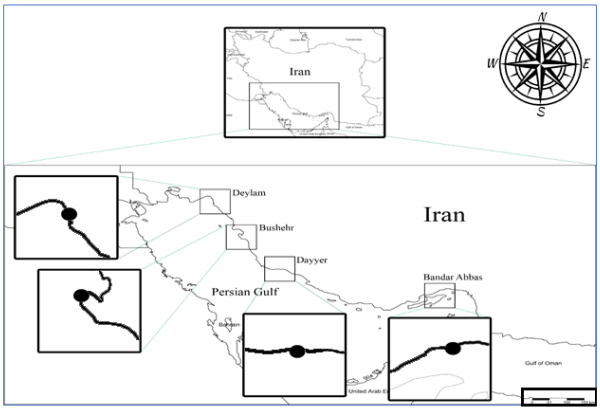
Ahmed Al-Omari, 2011؛ Bonyadi-Naeini et al., 2017). ابزار مولکولی هر روزه اهمیت بیشتری در شناسایی مرزهای بین گونه‌ای، بررسی کیفیت تنوع زیستی و نمایان کردن پراکنش گروه‌های مورد مطالعه را نشان می دهد (Neal et al,. 2018; Malakauskas et al., 2016; Sun et al., 2018). تحقیقات زیادی با تمرکز بر تاکسون‌ها به بررسی تغییرات DNA میتوکندریایی (mtDNA) پرداخته اند و مشخص کرده اندکه این گونه بررسی ها به جهت جدا کردن گونه‌های پرتاران نزدیک به هم بسیار ارزشمند هستند (برای مثال Barroso et al., 2009 Bleidorn et al., 2006; Nygren & Pleijel, 2011; Glover et al., 2005; Rice et al., 2008). روش پیشگام بارکد DNA با هدف فهرست کردن تنوع زیستی جهانی از طریق ارتباط داده‌های توالی‌ها با گونه های مرتبط در جریان است (Ratnasingham & Hebert, 2007; Hebert et al., 2003). ناحیه ی بارکدینگ شامل قطعه ی ۶۵۰ جفت بازی از ژن میتوکندریایی COI می باشند. بارکدینگ متداولا برای شناسایی گونه های موقت در گروه هایی که تاکسونومی ناقصی دارند استفاده شده است (برای مثال Floyd et al., 2002; Smith et al., 2005;) و تفاوت های مورفولوژیک، اکولوژیک و رفتاری مرتبا با بررسی بیشتر تاکسون های متمایز مشخص شده است (برای مثال Hebert et al., 2004). بارکدینگ مخصوصا در سیستم‌های دریایی پرکاربرد بوده است (Radulovici et al., 2010).

در مواردی که مراحل حیاتی و تولید مثلی متفاوت است و یا مواردی که گونه ها در طی نمونه برداری آسیب دیده اند، شناسایی تاکسون های حتی مشهور نیز در این شرایط دشوار می-گردد (Knowlton, 1993). بنابر این بارکد ها امکان مقایسه ی سریع تاکسون های مختلف در مناطق جغرافیایی گسترده را فراهم کرده و پتانسیل عظیمی برای ارزیابی پیوستگی ژنتیکی و رد گیری الگوهای زیست جغرافیایی در سطح گسترده دارد. در حالی که تحقیقات زیادی کارایی COI را در جداسازی گونه‌ای تایید کرده‌اند (Barroso et al., 2009; Nygren & Pleijel, 2011; Rice et al., 2008; Olson et al., 2009; Pleijel et al.,2009). هدف این پژوهش، بررسی روابط فیلوژنتیک پرتاران جنس *Perinereis* با بهره گیری از تکنیک بارکدینگ DNA و توالی یابی ژن COI بوده است و در طی آن واگرایی‌های نوکلئوتیدی اعضاء این جنس در سواحل دیلم، بوشهر، دیر و بندرعباس مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج این پژوهش می تواند در تحلیل اثر فاکتورهای محیطی بر روند گونه زایی و ارزیابی قرابت ژنتیکی پرتاران خلیج فارس کاربرد داشته باشد.

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱ نمونه برداری

این بررسی در سواحل بین جزر و مدی بوشهر، دیر، دیلم و بندر عباس بر روی پرتاران در سه منطقه بالا، میان و پایین بین جزرومدی صورت گرفت و نتایج آن ثبت گردید.



شکل ۱: موقعیت ایستگاه های نمونه برداری بر روی نقشه

نمونه برداری در سواحل بین جزر و مدی بندرعباس، بندر بوشهر، بندر دیلم و دیر بر روی پرتاران به صورت ماهانه از فروردین سال ۱۳۹۴ تا فروردین ۱۳۹۵ در طول یک سال در زمان جزر کامل انجام شد و نتایج آن ثبت گردید. جمع آوری نمونه ها به صورت ۳ تکرار در هر منطقه بالا بین جزرومدی، میان بین جزرومدی و پایین بین جزرو مدی با پرتاب کوادرات ۵۰ در ۵۰ سانتی متر به صورت تصادفی انجام شد، ناحیه زیرین کوادرات با استفاده از دستگاه مغزه گیر (Corer) دستی با مساحت ۰/۰۱ متر مربع تا عمق ۱۲ سانتیمتر حفاری شد. جداسازی اولیه در محل نمونه برداری توسط الک ۵۰۰ میکرون صورت گرفت و جمعا ۳۰۸ نمونه کرم پرتار جمع آوری شدند.

نمونه های پرتاران جداسازی شده ابتدا به ظرف حاوی 8% MgCl2 و آب دریا منتقل شدند تا بیهوش شده و خروج آرواره ها امکان پذیر شود. سپس نمونه ها با اتانول ۹۰ درصد فیکس و پس از انتقال به آزمایشگاه بیوتکنولوژی دریایی مرکز تحقیقات

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from joc.inio.ac.ir at 9:44 IRST on Tuesday March 9th 2021

طب گرمسیری خلیج فارس دانشگاه علوم پزشکی بوشهر در اتانل ۷۰ درصد نگهداری شدند. جهت بررسی، نمونه های پرتار به مدت ۴۵ دقیقه با محلول رزبنگال ۱ گرم بر لیتر اضافه رنگ آمیزی و سپس شناسایی و شمارش آنها انجام گرفت.

۲-۲ *شناسایی مورفولوژیک*

تمام کرم های پرتار با استفاده از لوپ (Olympus, SZ6045, Japan) و میکروسکوپ نوری (مدل CETI، ساخت بلژیک) شمارش و شناسایی شدند. جداسازی نمونه ها در حالی انجام شد که در الکل غوطه ور بودند و از آنجا که لامپ میکروسکوپ باعث تبخیر الکل میشود مرتبا به آن الکل اضافه شد بطوری که در الکل غوطه ور بمانند. برای شناسایی ریخت شناسی پرتاران در حد جنس از بخش جلویی بدن، تعداد و نحوه قرار گیری زوائد با بهره گیری از کلیدهای رایج تاکسونومی مورفولوژیک صورت پذیرفت (Fauchald, 1977; Hartman, 1965; Beesley et al., 2000. Hutchings & Fauchald, 2000; Day, 1967; Fauchald & Rouse, 1997; Rouse & Pleijel, 2008).

۲-۳ *استخراج و تکثیر ژن COI*

پس از جداسازی و شناسایی مورفولوژیک نمونه های متعلق به جنس *Perinereis*، نمونه ها جهت انجام مطالعات مولکولی در الکل ۷۰ درصد درون فالکون های آماده فیکس شده و به آزمایشگاه منتقل شدند. استخراج DNA با پروتکل CTAB– کلروفرم شرح داده شده توسط Chen و همکاران (۱۹۹۵) انجام شد. به منظور بارکدینگ بخش ۸۱۵ جفت بازی از ژن میتوکندریایی COI جهت بررسی سیستماتیک مولکولی نمونه‌ها در دستگاه ترموسایکلر (مارک LongGene، مدل A200) با استفاده از پرایمر یونیورسال LCO1490 HCO2198 تکثیر گردید (Folmer et al., 1994). واکنش‌های PCR در حجم ۱۲/۵ میکرولیتر شامل ۶/۲۵ میکرولیتر Trehalose، ۲ میکرولیتر آب مقطر، ۱/۲۵ میکرومول بافر 10x PCR، ۰/۶۲۵ میکرومول MgCl2(50 mM) ، ۰/۱۲۵ میکرومول از هر پرایمر (۱۰ میکرومول)، ۰/۰۶۲۵ میکرولیتر dNTPs (10 mM)، ۰/۰۶ میکرولیتر تک پلی مراز و ۲ میکرولیتر از نمونه DNA صورت پذیرفت (Carr et al., 2011). پروفایل گردش حرارتی شامل یک سیکل یک دقیقه ای ۹۴ درجه سانتیگراد، ۵ سیکل ۴۰ ثانیه ای ۹۴ درجه سانتیگراد، ۱ دقیقه ۷۲ درجه سانتیگراد، ۳۵ سیکل ۴۰ ثانیه ای ۹۴ درجه سانتیگراد، ۴۰ ثانیه ۵۱ درجه سانتیگراد، ۱ دقیقه ۷۲ درجه سانتیگراد و آخرین مرحله ۵ دقیقه ۷۲ درجه سانتیگراد بود.

کیفیت محصول PCR بر روی ژل الکتروفورز E-Gel با آگارز ۱/۵ درصد بررسی شد. توالی یابی دو طرفه توسط نرم افزار BigDye V1.3 با دستگاه DNA آنالیزور ABI 3730xl در شرکت Macrogen در کشور کره جنوبی انجام شد (www.macrogen.com). توالی ها با استفاده از نرم افزار ChromasPro v6.2 محصول شرکت Technelysium (www.technelysium.com) خطایابی و برش داده شده و با تکنیک ClastalW در نرم افزار MEGA v7.0 مرتب شدند (www.megasoftware.net). توالی های ژن COI به دست آمده با استفاده از سرویس BLAST پایگاه NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov) با ژنوم ارگانیسم‌های با همولوژی ۱۰۰٪ در این پایگاه مورد مقایسه قرار گرفتند. توالی-های به دست آمده در این تحقیق در بانک ژن با شماره های دسترسی PG101826 تا PG101876 ثبت موقت شده اند.

۲-۴ *آنالیز فیلوژنتیک*

از نرم افزار PAUP4 جهت ترسیم درخت بیشینه صرفه جویی یا Maximum Parsimony (MP) استفاده شد و در مورد تمامی جایگاه های حاوی اطلاعات پارسیمونی، شاخص ثبات (consistency index)، شاخص نگهداری (retention index) و شاخص مرکب (composite index) محاسبه شدند. جهت بررسی حدود اطمینان شاخه‌ها، از آزمون Bootstrap با هزار تکرار استفاده شد و درصد درخت های تکرار که تاکسون های مرتبط را در کلاسترهای مشابه قرار داده اند محاسبه گردید. طول شاخه ها در مقیاسی رسم شدند که هر واحد طول برابر فاصله تکاملی در درخت فیلوژنی باشد.

۲-۵ *انجام محاسبات*

از شاخص تشابه Bray-Curtis در نرم افزار Microsoft Excel 2016 جهت بررسی میزان شباهت ایستگاه‌های نمونه برداری بر

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from joc.inio.ac.ir at 9:44 IRST on Tuesday March 9th 2021

حسب ساختار گونه‌ای استفاده شد. واگرایی‌های ژن COI بر اساس مدل K2P برای نواحی بارکد شده جنس و گونه های بدست آمده با استفاده از آزمون رگرسیون معادله ی خط در نرم افزار EstimateS 9.0.1 محاسبه گردید. جهت مقایسه تعداد نمونه‌های جدید (موقت) و سابقا ثبت شده در بانک ژنی از آنالیز منحنی حجم (Rarefaction Curve) در نرم افزار Microsoft Excel 2016 استفاده شد. از آزمون شباهت Chao Sorensen در نرم افزار IBM SPSS 21 به منظور بررسی شباهت ساختار گونه‌ای یک به یک ایستگاه های مورد مطالعه استفاده شد.

۲-۶ آنالیز فیلوژنتیکی

از آنجا که هدف این تحقیق بررسی میزان شباهت و تفاوت ژنتیکی پرتاران متعلق به جنس *Perinereis* در مناطق مورد مطالعه بود و تغییرات ژنتیکی این ارگانیسم ها در طول سال هدف این تحقیق نبوده است، نتایج صرفا بر اساس موقعیت مکانی ارائه شدند. به طور کلی آنالیز روابط تکاملی بر روی ۵۰ توالی نوکلئوتیدی انجام شد که در طی ترسیم درخت های فیلوژنتیک تمامی جایگاه های حاوی جای خالی و فاقد داده حذف شدند و نهایتا ۵۶۹ موقعیت در داده نهایی مورد بررسی قرار گرفتند. فاصله های تکاملی با استفاده از روش پارسیمونی و مدل K2P محاسبه شده و هر واحد بیانگر تعداد تغییرات در هر جایگاه می‌باشد. از گونه‌ی *Sigambra magnuncus* از خانواده‌ی Pilargidae با شماره دسترسی GQ426640.1 از آب‌های اقیانوس اطلس، به عنوان برون گروه استفاده شد.درخت فیلوژنی رسم شده در نتیجه آنالیز روابط تکاملی بر اساس روش بیشینه صرفه جویی در شکل ۲ نمایش داده شده است.

۳. نتایج و بحث

از ۳۰۸ نمونه برداشت شده از ایستگاه های تعیین شده در بوشهر، دیلم، بندرعباس و دیر، ۲۷۳ کرم پرتار بودند که ۲۵۶ نمونه قابل شناسایی در حد جنس با استفاده از میکروسکوپ و لوپ بودند. از ۲۵۶ نمونه بررسی شده، ۲۱۲ نمونه عضو خانواده Nereididae بودند و نهایتا با بررسی کلیدهای مورفولوژیک،۷۳ نمونه متعلق به جنس *Perinereis* شناسایی گردید.

طی عملیات استخراج DNA و تکثیر ژن COI از ۷۳ نمونه به دست آمده، ۲۳ نمونه DNA با کیفیت نامطلوب به دست آمدند که از مجموعه داده حذف شدند و در نهایت ۵۰ توالی ژن COI به دست آمده و توالی یابی شد.

توالی‌های بدست آمده در مطالعه حاضر، با توالی‌های موجود نمونه‌های مشابه که برای ژن COI در بانک جهانی GenBank ثبت شده بود تطبیق و مقایسه شد. نتایج مقایسه توالی های به دست آمده نشان دهنده همولوژی نوکلئوتیدی ۱۰۰ درصد تعداد ۱۱ توالی با پرتاران Perinereis ثبت شده در بانک ژنی بوده است (جدول ۱). در خصوص ۳۹ توالی COI دیگر، هیچ سابقه قبلی مشابه ثبت شده در بانک ژنی یافت نشد و مقایسه نوکلئوتیدی، قرابت های ۹۲ تا ۹۹ درصد با داده های GenBank را نشان داد که تحت عنوان تاکسون های موقت (Provisional) معرفی شدند.

از نمونه‌های متعلق به جنس *Perinereis* sp. ۹ توالی، شامل ۱ توالی از منطقه بندرعباس (*Perinereis* sp.-2017-H)، ۴ توالی از منطقه بوشهر (*Perinereis* sp.-2017-A,D,E,G) و ۳ توالی از منطقه دیلم (*Perinereis* sp.-2017-B-C-F) و ۱ توالی از منطقه دیر (*Perinereis* sp.-2017-I) به دست آمد.

درخت فیلوژنی رسم شده در نتیجه آنالیز روابط تکاملی به روش بیشینه صرفه جویی، نشان داد که تاکسون های*Perinereis* sp.-2017-D-E-F با یکدیگر متطابق بودند و تشکیل یک کلاد را دادند و با هم رابطه خواهری دارند که با ارزش‌های بوت‌استرپ ۱۰۰ درصد حمایت شده‌اند. نمونه‌های *Perinereis* sp.-2017-E-F-D از دیلم و بوشهر در تمامی آنالیزهای فیلوژنتیک درون یک کلاد مجزا قرار گرفته‌اند که زیرشاخه کلاد *Perinereis* sp.-2017-C-A-B از دیلم و بوشهر بوده که توالی‌های A-B-C با بوت استرپ ۹۸ درصد حمایت می شوند.

هیچکدام از رکوردهای ژن بانک با *Perinereis* sp.-2017-E-F-D-A-C-B رابطه خواهری نداشتند. همچنین کلادی که شامل نمونه‌های Perinereis sp.-2017-G-H-I بود با رکوردهای ثبت شده از اقیانوس هند، سواحل Goa در غرب هندوستان با شماره دسترسی KX525494.1، KX525495.1 و KX525496.1 در یک کلاد قرار گرفتند و با هم رابطه خواهری دارندکه با بوت استرپ ۱۰۰ درصد پشتیبانی می‌شود.

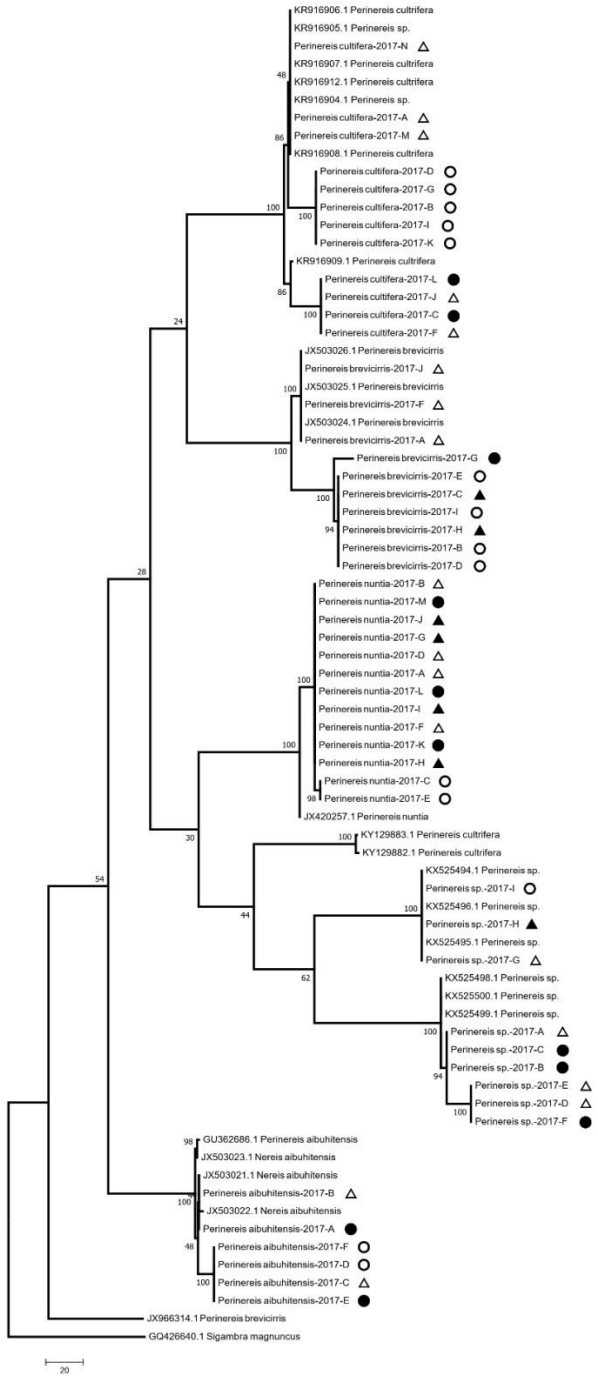
www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from joc.inio.ac.ir at 9:44 IRST on Tuesday March 9th 2021

جدول ۱: نتایج تطابق توالی های ژن COI به دست آمده در بانک ژنی NCBI

جنس	گونه	تعداد تاکسون با همولوژی ۱۰۰٪	تعداد تاکسون با همولوژی ۹۲ تا ۹۹٪	تعداد در هر سایت			
				بندرعباس	بوشهر	دیلم	دیر
Perinereis sp.		۳	۶	۱	۴	۳	۱
Perinereis	*aibuhitensis*	۲	۴	–	۲	۲	۲
Perinereis	*brevicirris*	۳	۷	۲	۳	۱	۴
Perinereis	*cultrifera*	۳	۹	–	۵	۲	۵
Perinereis	*nuntia*	–	۱۳	۴	۴	۳	۲



شکل ۲: روابط تکاملی جنس *Perinereis* با استفاده از روش بیشینه صرفه جویی (Maximum Parsimony). نشانه گذاری تاکسون ها بر اساس ایستگاه نمونه برداری: مثلث سفید علامت بوشهر، مثلث سیاه علامت بندرعباس، دایره سفید علامت دیر و دایره سیاه علامت دیلم.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from joc.inio.ac.ir at 9:44 IRST on Tuesday March 9th 2021

درخت های فیلوژنی رسم شده برای جنس *Perinereis* نشان داد که تاکسون‌های *Perinereis nuntia* -2017-C-D-E-F-G-H-I-J-K-L-M-B-A از مناطق بوشهر، بندرعباس، دیر ودیلم تشکیل یک کلاد را دادند و با هم رابطه خواهری دارند و با ارزش بوت استرپ ۱۰۰ درصد پشتیبانی می‌شوند. کلاد مذکور با توالی برگرفته شده از بانک ژنی با شماره دسترسی JX420257.1 از استرالیا کلاد مونوفیلتیک تشکیل دادند. تاکسون‌های *Perinereis nuntia* -2017-C-E از منطقه دیر در تمامی آنالیزهای فیلوژنتیک درون یک کلاد مجزا قرار گرفته اند و با بوت استرپ ۹۸ درصد حمایت می شوند.

توپولوژی درختان تکاملی نشان داد نمونه های برداشت شده از ایستگاه های نمونه برداری، قرابت ژنتیکی با یکدیگر داشتند. با این وجود هیچکدام از توالی های به دست آمده با رکورد ژن بانک گونه *P. nuntia* رابطه خواهری نداشته و در یک کلاد مشترک قرار نگرفتند. تمامی گونه‌های *Perinereis nuntia* منشأ مونوفیلتیک داشتند. این گونه دارای ۴ زیر گونه میباشد ولی از آنجا که رکوردهای ثبت شده زیرگونه ها در بانک ژنی یافت نشد نمیتوان نتایج به دست آمده در این تحقیق را به آنها نسبت داد.

از نمونه‌های متعلق به گونه‌ی *Perinereis cultrifera*، مجموعا ۱۲ توالی به این ترتیب که۵ توالی - *Perinereis cultrifera* 2017-M-N-A-F-Jاز منطقه بوشهر، ۲ توالی از منطقه ی دیلم *Perinereis cultrifera* -2017-C-L و ۵ توالی از منطقه ی دیر *Perinereis cultrifera* -2017-B-K-I-G-D به دست آمد.تاکسون‌های مرتبط با نمونه‌های برداشت شده از دیر (*Perinereis cultrifera* -2017- B-K-I-G-D) با یکدیگر متطابق بودند و تشکیل یک کلاد را دادند و با هم رابطه خواهری دارند که با ارزش بوت‌استرپ ب۱۰۰ درصد حمایت شده‌اند. همچنین تاکسون‌های مرتبط با نمونه های-2017- *Perinereis cultrifera* F-J-C-L با یکدیگر منطبق بودند و تشکیل یک کلاد را دادند که با ارزش‌های بوت‌استرپ ۱۰۰ درصد حمایت شده‌اند. آنالیز فیلوژنتیک نشان داد که تاکسون های- *Perinereis cultrifera* 2017-A-M-N به دلیل شباهت بیشتر با رکوردهای ثبت شده KR916908.1، KR916907.1، KR916906.1، KR916904.1، KR916905.1 و KR916912.1 در بانک ژنی برگرفته شده از سواحل جنوبی اروپای اطلس در یک کلاد قرار گرفتندوبا بوت استرپ ۷۴ درصد پشتیبانی شدند. شایان ذکر است که هیچ کدام از توالی های مورد مطالعه با تاکسون های بانک ژنی مرتبط با منطقه چین با شماره دسترسی‌های KY129883.1 و KY129882.1 رابطه خواهری و یا مونوفیلتیک نداشته و با توالی-های ژن بانک مرتبط با سواحل جنوبی اروپای اطلس قرابت بیشتری را نشان دادند. توپولوژی درختان تکاملی نشان داد نمونه-های برداشت شده از ایستگاه های نمونه برداری ۳ کلاد مجزا تشکیل دادند و در هر کلاد ارتباط خواهری با یکدیگر داشتند. تمامی توالی‌های مرتبط با *Perinereis cultrifera* منشأ مونوفیلتیک داشتند. این گونه دارای یک زیرگونه است ولی از آنجا که در بانک ژنی ثبت نشده است امکان مقایسه توالی های به دست آمده با زیرگونه این گونه وجود نداشت.

از نمونه‌های متعلق به گونه‌ی *Perinereis aibuhitensis* مجموعا ۶ توالی که۲ توالی شامل - *Perinereis aibuhitensis* 2017-A-E از منطقه دیلم، ۲ توالی - *Perinereis aibuhitensis* 2017-B-C از منطقه ی بوشهر و۲ توالی از منطقه ی دیر *Perinereis aibuhitensis* -2017-D-F به دست آمدند. تاکسون-های *Perinereis aibuhitensis* -2017-A و *Perinereis aibuhitensis* -2017-B هر کدام کلاد منفرد جداگانه نسبت به سایر تاکسون‌ها تشکیل دادند. تاکسون‌های *Perinereis aibuhitensis* -2017-D-C-E-F با یکدیگریک کلاد تشکیل داده و با بوت استرپ ۱۰۰ درصد پشتیبانی می شوند و همچنین با تاکسون ژن بانک همین گونه از منطقه کره جنوبی با شماره دسترسی JX503021.1 رابطه مونوفیلتیک داشتند.

از نمونه‌های متعلق به گونه‌ی *Perinereis brevicirris*، ۱۰ توالی به دست آمد که از این میان سه توالی *Perinereis brevicirris*-2017-A-F-J برداشت شده از منطقه بوشهر، یک توالی *Perinereis brevicirris*-2017 -G برداشت شده از منطقه دیلم، ۴ توالی *Perinereis brevicirris*-2017- D-E-B-I برداشت شده از منطقه دیر و ۲ توالی *Perinereis brevicirris*-2017-C-H برداشت شده از منطقه بندرعباس به دست آمدند. درخت فیلوژنی رسم شده نشان داد که نمونه های -*Perinereis brevicirris*-2017 D-E-B-I-C-H در یک کلاد مجزا قرار گرفتند و با هم رابطه خواهری دارند و این روابط با ارزش بوت‌استرپ بالا ۹۴ درصد حمایت شده‌اند. این توالی ها با هیچ‌یک از تاکسون های ژن بانک تشکیل کلاد مشترک ندادند. تاکسون-*Perinereis brevicirris* 2017-Gاز سایر تاکسون های برداشت شده جدا شده و تشکیل کلاد مونوفیلتیک داد. تاکسون‌های -*Perinereis brevicirris* 2017-A-F-J با تاکسون‌های مربوط به آب های کره جنوبی با

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from joc.inio.ac.ir at 9:44 IRST on Tuesday March 9th 2021

شماره دسترسی‌های JX503024.1، JX503025.1 و JX503026.1 رابطه خواهری نشان دادند که با ارزش بوت‌استرپ ۱۰۰ درصد حمایت می شوند.

۳-۱ تحلیل واگرایی ژن *COI*

بررسی میانگین فاصله نوکلئوتیدی بر اساس مدل دو پارامتری Kimura (K2P) نشان داد که فواصل نوکلئوتیدی درون جنسی ۱/۸ برابر فواصل درون گونه‌ای بوده است (۱/۹۶ نسبت به ۳/۵۲). در طی آنالیزهای فیلوژنی، تعداد تاکسون های به دست آمده در هر کلاستر بین ۲ تا ۱۴ عدد متغیر بود. تاکسون های مورد مطالعه در بیشتر موارد دو یا چند کلاستر انشقاق یافته داشتند که حداکثر واگرایی درون کلاستری آنها بین ۰ تا ۴/۴ درصد بوده است. ضمنا هیچ یک از گونه های به دست آمده با گونه دیگر کلاستر مشترک تشکیل ندادند.

بر اساس کلاستربندی تاکسون های مربوط به نمونه های هر ایستگاه، می توان مشاهده نمود که بیشترین شباهت زیستی بر اساس ترکیب گونه‌ای بین ایستگاه های بوشهر و دیر و کمترین تشابه زیستی میان ایستگاه های دیر و بندرعباس بوده است. همچنین میتوان مشاهده نمود که ایستگاه های دیلم و بندرعباس ساختار گونه‌ای متفاوت نسبت به سایر ایستگاه ها داشتند. لذا بر اساس میزان تشابهات زیستی مشاهده شده، میتوان مناطق نمونه برداری را به سه دسته بوشهر–دیر، دیلم و بندرعباس تقسیم بندی نمود.

از ۵۰ نمونه شناسایی شده در این تحقیق ۳۹ توالی فاقد رکورد قبلی در ژن بانک بوده و برای نخستین بار بارکدگذاری شدند.کلاسترهای بارکد شامل گونه های موقت در بیشتر موارد، نشان دهنده مرزهای گونه‌ای مشخص و شفاف بوده است. با وجود اینکه گونه های نام برده شده اغلب شامل بیش از یک گونه موقت بوده اند، کلاسترها به سادگی شناسایی شده و عمدتا از گونه های دیگر به وضوح فاصله داشتند. توالی های بارکدی در مورد بیشتر گونه های بدست آمده تفاوت داشته است به این ترتیب که بیشترین واگرایی بین گونه ای ۳/۵ درصد و مربوط به گونه *Perinereis cultrifera* بوده است که نشان می دهد توالی-های به دست آمده، بطور طبیعی کلاسترهایی فشرده با تغییرات اندک را تشکیل داده‌اند چرا که مقادیر واگرایی توالی ها زیاد نبوده است. مقادیر واگرایی توالی‌های بین گونه‌ای گزارش شده در این تحقیق با سایر مطالعات مشابه بر روی پرتاران تطابق دارد و در سایر تحقیقات نیز واگرایی بین گونه ای اندکی در سایر جنس های پرتاران گزارش شده است (برای مثال Glover et al., 2005؛ Bastrop & Blank, 2006؛ Rice et al., 2008؛ Chevaldonne et al., 2002؛ Jolly et al., 2006).

علاوه بر این، ۱/۸ برابر بودن میانگین واگرایی ژنتیک بین گونه ای نسبت به درون گونه ای و عدم مشاهده واگرایی های حد واسط نشان می دهد بارکد های COI قابلیت تمایز بالایی برای پرتاران دارند. در این تحقیق کلادهای موقت با واگرایی های اندک بین کلادی معرفی شدند. بعنوان مثال *Perinereis* sp.-2017-A-B-C با الگوی واگرایی اندک احتمالا بیانگر حضور نسل جوانی از مجموعه ای از گونه های اخیرا مجزا شده، تولد زیرگونه های جدید، حضور هیبریدهای موقت، یا واگرایی طبیعی درون برخی گونه ها بیشتر از سایر گونه ها در مناطق مورد مطالعه باشند. انشقاق های جدید همراه شده با الگوهای پراکنشی پیچیده در طی زمان، شناسایی مراحل اولیه گونه زایی را بسیار دشوار می کند.

تفاوت در زیستگاه ها در مورد برخی از تاکسون ها مشهود بود؛ برای مثال در منطقه بندرعباس *Perinereis nuntia* مشاهده گردید ولی *Perinereis cultrifera* وجود نداشت. نتایج مشابه در خصوص جنس‌های *Eteone* از خانواده Phyllodocidae و Ophelia از خانواده Opheliidae در تحقیقات Carr و همکاران (2011) به دست آمده است و در تحقیق آنها نیز در برخی مناطق جغرافیایی نزدیک به هم، اعضاء هر دو جنس همراه با هم مشاهده نشدند در حالی که در بیشتر ایستگاه ها با هم گزارش شده بودند. از دلایل بروز چنین تفاوت‌هایی در میان اعضاء متعلق به یک جنس یا گونه میتوان به خصوصیات متفاوت ژنتیکی در میان آنها اشاره کرد. به عنوان مثال Rice و همکاران (۲۰۰۸) در سواحل کالیفرنیا، فلوریدا و Maine امریکای شمالی نشان دادند که تبارهایی از گونه *Polydora cornuta* تولید مثل مجزا دارند که نشان از آغاز روند گونه زایی و یا تولد زیرگونه‌ها می‌تواند باشد.

همچنین تحقیقات دیگری در مورد گونه *Hediste japonica* نشان داده است که اعضای این گونه می توانند چرخه زیستی متفاوت نسبت به هم داشته باشند (Sato & Masuda, 1997). در تحقیقات Sato و Matsuda مشخص شد که از میان ۱۴ جایگاه ایزوزایم بررسی شده در اعضای گونه *H. japonica*،

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from joc.inio.ac.ir at 9:44 IRST on Tuesday March 9th 2021

برخی از نمونه‌ها در ۵ جایگاه کاملا تعویض آلل داشته‌اند و واگرایی مشخص ژنتیکی را نشان می‌دهند. در برخی تحقیقات دیگر مشخص گردید که حتی برخی اعضاء سیمپاتریک (در یک منطقه جغرافیایی مشترک) جنس *Dipolydora* تفاوت‌های اکولوژیک نشان می‌دهند (Manchenko & Radashevsky, 2002).

نتایج واگرایی نوکلئونیدی در ایستگاه های نمونه برداری نشان می دهند که تفاوت های ژنتیکی در میان پرتاران استان بوشهر با بندرعباس، در سطح گونه ای نبوده است و عمده این واگرایی ها در سطح زیرگونه ای می باشد؛ به این معنا که سطح واگرایی ژنتیکی در این مناطق آن چنان بالا نیست که منجر به اشتقاق گونه ای شده باشد. احتمال می رود علت این پدیده، نزدیکی نسبی ایستگاه های نمونه برداری و همچنین جریان آبی داخلی خلیج فارس از منطقه بندرعباس به سمت بوشهر باشد. از آنجا که لارو پرتاران قابلیت شنای آزاد داشته و ابزار اصلی حرکت این لاروها در حوضه های آبی جریانات آبی می باشند (Hernández-Guevara, 2005)، تشابه بالای گونه‌ای ایستگاه های استان بوشهر با یکدیگر و شباهت نسبی بندرعباس با ایستگاه های استان بوشهر، می تواند این احتمال را تقویت نماید که جریانات آبی در گردش میان این مناطق عاملی تأثیرگذار بر پراکنش گونه ای لارو نرئیدها در این مناطق بوده است.

این فرضیه با نتایج پژوهش Marko در زمینه نقش تأثیرگذار لاروها در پراکنش جمعیتی شکم پایان دریایی سازگار است که در تحقیق خود نشان داد تغییرات های اکولوژیکی می تواند با تأثیر بر پراکنش لاروها باعث محدود شدن یا گسترده تر شدن الگوهای پراکنشی شود (Marko, 2004).

در تحقیق صورت گرفته توسط Bush بر روی شناسایی و پراکنش پرتاران خانواده Cirratulidae در پاناما، بر تأثیر فاکتورهای اقلیمی همچون بارش و جریانات آبی در پراکنش لاروی این پرتاران تأکید شد و این نتایج با فرضیه تحقیق حاضر مبنی بر اثر چرخش جریان آبی خلیج فارس بر یکدست شدن تقریبی اعضاء جنس Perinereis به لحاظ ژنتیکی در مناطق مورد مطالعه تطابق دارد (Bush, 2006). هر چند نتایج تحقیق Bush بر اثر معنی دار فاکتورهای اکولوژیک همچون اسیدیته، دما و اکسیژن محلول نیز تأکید شده است که بررسی آن بر لارو پرتاران خلیج فارس نیازمند تحقیقات بیشتر می‌باشد.

۴. نتیجه‌گیری

- در مقایسه مناطق نمونه برداری، در ایستگاه های دیر، دیلم، بوشهر و بندرعباس به ترتیب بیشترین توالی‌های با همولوژی کمتر از ۱۰۰ درصد بدست آمدند که نشان دهنده نیاز به مطالعات بیشتر و ثبت توالی های پرتاران این مناطق در ژن بانک می باشد.
- آنالیزهای فیلوژنتیک نشان داد که تعداد تاکسون های به دست آمده از جنس Perinereis در هر کلاستر بین دو تا ۱۴ عدد متغیر بود و همچنین ماکزیمم تغییرات درون کلاستری با افزایش تعداد افراد در هر کلاستر افزایش یافت. این نتایج نشان می دهد که با بیشتر شدن تعداد نمونه های توالی یابی شده، دقت تشخیص میزان واگرایی ژنتیکی نیز بالا می‌رود و نیاز به تحقیقات گسترده تر در منطقه مورد مطالعه را آشکار می نماید.
- با بررسی درخت های فیلوژنی می توان دریافت بسیاری از گونه های پرتاران *Perinereis* مشاهده شده سواحل خلیج فارس، قرابت ژنتیکی بالایی با گونه های مشابه در آب های مناطق دیگر جهان همچون چین، کره جنوبی، استرالیا و اروپا دارند.
- وجود واگرایی های نوکلئوتیدی درون گونه ای همچنین مؤکد آن است که برخی پرتاران *Perinereis* در منطقه خلیج فارس که گمان می رفت از یک گونه واحد تشکیل شده باشند ممکن است در واقع شامل دو یا چند زیرگونه مجزا باشند.
- همچنین با بررسی میزان شباهت ژنتیکی در مناطق مورد مطالعه مشخص گردید که پرتاران *Perinereis* مستقر در سواحل استان بوشهر قرابت ژنی نسبتا بالایی داشته و با جنس *Perinereis* مستقر در بندرعباس تا حدودی متفاوت هستند ولی این تفاوت ها در حدی نیست که اشتقاق گونه ای را شاهد باشیم و واگرایی های ژنتیکی عمدتا در حد زیرگونه ای بوده اند.لذا می توان نتیجه گرفت به لحاظ ساختار گونه ای، پرتاران نرئیدیده در سواحل بوشهر، دیلم، دیر و بندر عباس قرابت ژنتیکی نسبتا زیادی با یکدیگر دارند. این همسانی نسبی جوامع پرتاران در مناطق مورد مطالعه، می تواند مؤکد این فرض باشد که جریان آبی خلیج فارس با کمک به پراکنش لارو پرتاران در سراسر

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from joc.inio.ac.ir at 9:44 IRST on Tuesday March 9th 2021

این حوضه آبی، موجب پدیدار شدن جمعیتی نسبتا یک دست از این ارگانیسم ها شده است.

منابع

دریا، م. سجادی، م. و سوری نژاد، ا. (۱۳۹۵). تعیین میزان هماوری، وزن، قطر تخمک و نسبت جنسی کرم پرتار *Perinereis nuntia* در آب‌های ساحلی خلیج فارس محدوده بندرعباس. توسعه آبزی پروری. شماره ۳، ۹۳-۱۰۴.

سلیمانی راد، آ. کامرانی، ا. کشاورز، م. بهره مند، م. و وزیری زاده، ا. (۱۳۹۲). مقیاسه تنوع و پراکنش پرتاران جاسک شرقی و غربی در منطقه حفاظت شده جاسک (دریای عمان). اقیانوس شناسی. شماره ۱۶، ۴۵-۵۳.

Ahmed Al-Omari, N. H., (2011). A Guide to Polychaetes (Annelida) in Qatar Marine Sediments. Doha, Qatar: Environmental Studies Center Qatar University .

Barroso, R., Klautau, M., Solé-Cava, A. M., & Paiva, P. C. (2009). Eurythoe complanata (Polychaeta: Amphinomidae), the ‘cosmopolitan’ fireworm, consists of at least three cryptic species. Marine Biology, 157(1), 69–80 .

Bastrop, R., & Blank, M. (2006). Multiple Invasions – A Polychaete Genus Enters the Baltic Sea. Biological Invasions, 8(5), 1195–1200 .

Beesley, P., Ross, G., & Glasby, C. (2000). A recent overview of Polychaetes, and related groups including myzostomes (Myzostomida), pogonophorans (Pogonophora), echiurans (Echiura) and sipunculans (Sipuncula). Polychaetes & Allies: The Southern Synthesis, 12 .

Bleidorn, C., Kruse, I., Albrecht, S., & Bartolomaeus, T. (2006). Mitochondrial sequence data expose the putative cosmopolitan polychaete Scoloplos armiger (Annelida, Orbiniidae) as a species complex. BMC Evolutionary Biology, 6-47.

Bonyadi-Naeini, A., Rastegar-Pouyani, N., Rastegar-Pouyani, E., Glasby, C. J., & Rahimian, H. (2017). Nereididae (Annelida: Phyllodocida) of the Persian Gulf and Gulf of Oman, including description of two new species and 11 new records. Zootaxa, 4244(1), 91 .

Bush, L. (2006). Identification and Distribution of the Polychaete Family Cirratulidae from the Las Perlas Archipelago, Panama (thesis). Marine Resource Development and Protection. School of Life Sciences, Edinburgh .

Carr, C. M., Hardy, S. M., Brown, T. M., Macdonald, T. A., & Hebert, P. D. N. (2011). A Tri-Oceanic Perspective: DNA Barcoding Reveals Geographic Structure and Cryptic Diversity in Canadian Polychaetes. PLoS ONE, 6-7.

Chen, C., Odorico, D., Tenlohuis, M., Veron, J., & Miller, D. (1995). Systematic Relationships within the Anthozoa (Cnidaria: Anthozoa) Using the 5′-end of the 28S rDNA. Molecular Phylogenetics and Evolution, 4(2), 175-183.

Chevaldonne, P., Jollivet, D., Desbruyeres, D., Lutz, R. A., & Vrijenhoek, R. C. (2002). Sister-species of eastern Pacific hydrothermal vent worms (Ampharetidae, Alvinellidae, Vestimentifera) provide new mitochondrial COI clock calibration. Cahiers De Biologie Marine, 43, 367–370 .

Day, J. H. (1967). A monograph on the Polychaeta of Southern Africa. London: British Museum (Natural History) .

Fauchald, K. (1977). The polychaete worms. Definitions and keys to the orders, families and genera (Science Series). Los Angeles, USA: Natural History Museum of Los Angeles County .

Fauchald, K., & Rouse, G. (1997). Polychaete systematics: Past and present. Zoologica Scripta, 26(2), 71–138 .

Floyd, R., Abebe, E., Papert, A., & Blaxter, M. (2002). Molecular barcodes for soil nematode identification. Molecular Ecology, 11(4), 839–850 .

Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., and

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from joc.inio.ac.ir at 9:44 IRST on Tuesday March 9th 2021

supports shared history and vicariant events. Molecular Ecology, 15(7), 1841–1855 .

Knowlton, N. (1993). Sibling Species in the Sea. Annual Review of Ecology and Systematics, 24(1), 189–216 .

Malakauskas, D. M., Snipes, R. B., Thompson, A. M., & Schloesser, D. W. (2016). Molecular evidence of undescribed Ceratonova sp. (Cnidaria: Myxosporea) in the freshwater polychaete, Manayunkia speciosa , from western Lake Erie. Journal of Invertebrate Pathology, 137, 49-53.

Manchenko, G. P., & Radashevsky, V. I. (2002). Genetic differences between two siblings sympatric Dipolydora species (Polychaeta: Spionidae) from the Sea of Japan, and a new species description. Journal of the Marine Biological Association of the UK, 82(2), 193-199 .

Marko, P. B. (2004). Whats larvae got to do with it? Disparate patterns of post-glacial population structure in two benthic marine gastropods with identical dispersal potential. Molecular Ecology, 13(3), 597–611 .

Neal, L., Taboada, S., & Woodall, L. C. (2018). Slope-shelf faunal link and unreported diversity off Nova Scotia: Evidence from polychaete data. Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers, 138, 72-84.

Nygren, A., & Pleijel, F. (2011). From one to ten in a single stroke – resolving the European Eumida sanguinea (Phyllodocidae, Annelida) species complex. Molecular Phylogenetics and Evolution, 58(1), 132–141 .

Olson, M. A., Zajac, R. N., & Russello, M. A. (2009). Estuarine-Scale Genetic Variation in the Polychaete Hobsonia florida (Ampharetidae; Annelida) in Long Island Sound and Relationships to Pleistocene Glaciations. The Biological Bulletin, 217(1), 86–94 .

Pleijel, F., Rouse, G., & Nygren, A. (2009). Five colour morphs and three new species of Gyptis (Hesionidae, Annelida) under a jetty in Edithburgh, South Australia.

Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Mol. Mar. Biol. Biotech. 3, 294–299

Glover, A. G., Goetze, E., Dahlgren, T. G., & Smith, C. R. (2005). Morphology, reproductive biology and genetic structure of the whale-fall and hydrothermal vent specialist, Bathykurila guaymasensis Pettibone, 1989 (Annelida: Polynoidae). Marine Ecology, 26(3-4), 223–234 .

Hartman, O. (1965). Catalogue of the Polychaetous Annelids of the world. Los Angeles, CA: The University of Southern California Press .

Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society - Biological Sciences, 270(1512), 313–321 .

Hebert, P. D. N., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H., & Hallwachs, W. (2004). Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly Astraptes fulgerator. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101(41), 14812–14817 .

Hernández-Guevara, N. A. (2005). Distribution and mobility of juvenile polychaeta in a sedimentary tidal environment = Verbreitung und Mobilität juveniler Polychaeten in sandigen Watten. Bremerhaven: Alfred-Wegener-Inst. für Polar- und Meeresforschung.

Hutchings P. A., & Fauchald, K. (2000). Class Polychaeta. Definition and general description. In: Beesley PL, Ross GJB, Glasby CJ, eds. Polychaetes and allies: The southern synthesis. CSIRO Publishing. pp 1–3.

Jiang, M. X., & Liu, M. H. (2008). Research progress of Nereididae. Mar. Sci., 32, 82-86.

Jolly, M. T., Viard, F., Gentil, F., Thiébaut, E., & Jollivet, D. (2006). Comparative phylogeography of two coastal polychaete tubeworms in the Northeast Atlantic

www.SID.ir

Archive of SID

Rouse, G. W., & Pleijel, F. (2008). Polychaetes. Oxford: Oxford University Press .

Sato, M., & Masuda, Y. (1997). Genetic differentiation in two sibling species of the brackish-water polychaete Hediste japonica complex (Nereididae). Marine Biology, 130(2), 163–170 .

Smith, M. A., Fisher, B. L., & Hebert, P. D. N. (2005). DNA barcoding for effective biodiversity assessment of a hyperdiverse arthropod group: the ants of Madagascar. Biological Sciences, 360(1462), 1825–1834 .

Sun, Y., Wong, E., Ahyong, S. T., Williamson, J. E., Hutchings, P. A., & Kupriyanova, E. K. (2018). Barcoding and multi-locus phylogeography of the globally distributed calcareous tubeworm genus Hydroides Gunnerus, 1768 (Annelida, Polychaeta, Serpulidae). Molecular Phylogenetics and Evolution, 127, 732-745.

Zoologica Scripta, 38(1), 89–99 .

Radulovici, A. E., Archambault, P., & Dufresne, F. (2010). DNA Barcodes for Marine Biodiversity: Moving Fast Forward? Diversity, 2(4), 450–472 .

Ratnasingham, S., & Hebert, P. D. (2007). BARCODING: Bold: The Barcode of Life Data System (http://www.barcodinglife.org). Molecular Ecology Notes, 7(3), 355-364 .

Read, G., Fauchald, K. (Ed.) (2019). World Polychaeta database. Nereididae Blainville, 1818. Accessed through: World Register of Marine Species at: http://www.marinespecies.org on 2019-06-02.

Rice, S. A., Karl, S., & Rice, K. A. (2008). The Polydora cornuta complex (Annelida: Polychaeta) contains populations that are reproductively isolated and genetically distinct. Invertebrate Biology, 127(1), 45–64.

Downloaded from joc.inio.ac.ir at 9:44 IRST on Tuesday March 9th 2021

www.SID.ir