مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی
دوره چهارم، شماره پانزدهم، تابستان ۱۳۹۳

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

بررسی فیلوژنتیکی گونه Peronia peronii (نرمتنان:شکم پایان، sea slug) در سواحل بین جزر و مدی چابهار بر اساس توالی ژنی SrDNA 18

گیلان عطاران فریمان* [۱]، یاسمن موسوی پور[۲]، آرش شکوری[۱]

۱ هیئت علمی دانشگاه علوم دریایی و دریانوردی چابهار ،گروه زیست شناسی ،دانشکده علوم دریایی ،دانشگاه علوم دریایی و دریانوردری چابهار ، چابهار ، ایران
۲کارشناسی ارشد ،گروه زیست شناسی ، دانشکده علوم دریایی ، دانشگاه علوم دریایی و دریانوردری چابهار ، چابهار ، ایران

چکیده

سابقه و هدف : بررسی های فیلوژنتیکی و شناساسیی مورفولوژی و مولکولی بر روی گونه های هر منطقه میتواند پایه ی مطالعات بعدی را بنیان گزاری کند . مطالعات فیلوژنتیکی زیادی بر اساس ژنوم میتوکندریایی در دیگر نقاط ساحلی دنیا بر روی این گروه از شکم پایان تابحال انجام گرفته ، اما اطلاعات کمی از ژنوم هسته ای این گروه ثبت شده است. بیشتر مطالعات انجام شده در ایران بر اساس بررسی های ریخت شناسی موجود انجام شده ولی گزارشی از بررسی های مولکولی گونه های ایرانی از سواحل جنوبی ثبت نشده است . در این پژوهش برای اولین بار گونه ای از sea slug های سواحل چابهار مورد بررسی فیلوژنتیکی قرار گرفت .

مواد و روش ها : نمونه برداری از سواحل صخره ای تیس در چابهار انجام شد و به آزمابشگاه انتقال داده شدند و پس از بررسی های ریخت شناسی گونه ، نمونه ها در فریزر ۸۰- درجه نگه داری شدند ، استخراج DNA با استفاده از روش CTAB صورت گرفت ، سپس واکنش زنجیره ای پلیمراز و توالی یابی و ترسیم درخت فیلوژنی انجام شدند.

یافته ها : توالی نوکلئوتیدهای بدست آمده در منطقه ژنی S rDNA ۱۸مورد آنالیزهای مولکولی قرار گرفتند . با آنالیزهای انجام شده و ترسیم درخت فیلوژنی مشخص شد که گونه ی ایرانی در کلاد Panpulmonata قرار گرفته است ، گونه ایرانی و دیگر گونه های این کلاد بیشترین واگرایی را نسبت به گونه های دوکلاد دیگر دارند .

نتایج : آنالیز فیلوژنتیکی MLنشان داد که گونه ی چابهار ۱۰۰ درصد شبیه با *Peronia cf. peronii* و در یک گروه خواهری قرار گرفته اند ، بررسی خصوصیات مورفولوژیکی هم این نتایج را تایید کرد .

کلمات کلیدی : *Peronia peronii* ، ۱۸S rDNA ، فیلوژنی ، سواحل چابهار ، شکم پایان

مقدمه

نرم تنان یکی از بزرگترین و متنوع ترین گروههای جانوری هستند و بعد از بندپایان بزرگترین گروه را در میان بی مهرگان به خود اختصاص داده اند . نرم تنان در همه جای زمین در محیط های دریایی از سواحل جزر و مدی تا عمیق ترین قسمت های اقیانوس ،آب های شیرین و در خشکی دیده میشوند .رده ی شکم پایان بزرگترین و متنوع ترین گروه از نرم تنان هستند ، بر اساس طبقه بندی که توسط Thiele Johannes در سال ۱۹۳۱ انجام گرفت شکم پایان در سه گروه Pulmonata Cu- vier, ۱۸۱۴ ، Opisthobranchia Milne-Edwards, ۱۸۴۸ و Prosobranchia Miln _ Edwards,۱۸۴۸ تقسیم بندی شدند ، شکم پایان یکی از گروههای تخصص یافته ی متازوآ میباشد و مطالعات زیادی روی آنها صورت گرفته است اما مطالعه فیلوژنی آنها از سال ۱۹۸۸ انجام شد (۹) . Euthyneura (Opistho-branchs چندین خصوصیت مشترک با ششداران pulmonates دارند که هردوی آنها در یک گروه بنام Euthyneura قرار گرفته اند) که شامل بیشترگونه های sea slug ها ، land snail ها ، land slug و برخی خانواده های شکم پایان دریازی که صدف دارند میباشند، تاکسون راسی شکم پایان محسوب میشود(۹).

آدرس نویسنده مسئول : گروه زیست شناسی ،دانشکده علوم دریایی ،دانشگاه علوم دریایی و دریانوردری چابهار ، چابهار ، ایران
Email :gilan.attaran@gmail.com
تاریخ دریافت مقاله: ۹۲/۲/۲۹
تاریخ پذیرش: ۹۳/۴/۲۰

Archive of SID
www.SID.ir

Pulmonata گروهی از شکم پایان دریازی هستند که با توانایی تنفس در معرض هوا شناخته شده اند ، بجای آبشش یک ریه تنفسی دارند ، این گروه خانواده های زیادی از شکم پایان خشکی زی ، آب شیرین و دریازی را به خود اختصاص داده اند (۱۱). نظریه ای وجود دارد بر این مبنا که Opisthobran-chia پارافایلتیک هستند که شاید بدلیل وجود Pulmonata باشد ،البته این نظریه هنوز به اثبات نرسیده است. Pulmon-ata ممکن است یک گروه منوفایلتیک با Opisthobranchia باشد، از طرفیOpisthobranchia یک گروه منوفایلتیک نیست و نمیتواند بعنوان یک تاکسون معتبر پذیرفته شود.آنها در حال حاضر در زیر رده ی Orthogastropoda قرار گرفته اند (۲۴). قطعات ژنی مورد استفاده در این پژوهش قطعه ژنی ۱۸S rRNA (۱۸S ribosomal RNA) میباشد . ۱۸S rRNA قسمتی از ژن RNA ریبوزومی است و جز ساختاری RNA ریبوزوم های یوکاریوتی سیتوپلاسمی است و بهمین ترتیب یکی از اجزای اساسی در تمام سلول های یوکاریوتی بشمار میرود. این قطعه ژنی هومولوگ ۱۶S rRNA در پروکاریوت ها و میتوکندری است. توالی ژنی ۱۸S rRNA بطور گسترده ای در تجزیه و تحلیل های مولکولی مورد استفاده قرار میگیرد. زیرواحد کوچک ۱۸S rRNA (SSU) از ژنهایی است که اغلب در مطالعات فیلوژنتیکی مورد استفاده قرار میگیرد و همچنین یک مارکر مهم در واکنش زنجیره ای پلی مراز) (PCR میباشد(۱۶) .تا بحال مطالعات زیادی بر روی توالی های ژنی این گروه از شکم پایان انجام شده است ، ولی مطالعاتی که بر روی این قطعه ژنی صورت گرفته است نسبت به قطعه ژنوم میتوکندریایی کمتر است که از ان جمله میتوان Göbbeler و klussmann-kolb در سال۲۰۰۹ (۶)و Shields در سال ۲۰۰۹ (۲۰) اشاره کرد. جنس *Peronii* در اغلب سواحل صخره ای جنوب شرقی ایران پراکنش دارد . در این تحقیق گونه ای از این جنس برای اولین بار در ایران مورد آنالیز های مولکولی قرار گرفت و توالی آن با گونه های مشابه موجود در بانک ژنی در منطقه ژنی ۱۸S rRNA مورد مقایسه قرار گرفت .

مواد و روش ها

نمونه برداری

پس از بررسی منطقه و تعیین ایستگاهها در بهمن ماه ۱۳۹۰ تعداد ۵_۴ نمونه این نرم تن زگیل دار از منطقه بین جزر و مدی تیس واقع در غرب چابهار (شکل شماره ۱) با موقعیت جغرافیایی ^{o} ۶۰ و ´ ۳۷ شرقی و ^{o} ۲۵ درجه و ´ ۲۲ شمالی جمع اوری گردید . نمونه ها بصورت دستی گرفته شدند و جهت عملیات آزمایشگاهی به آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار انتقال داده شدند ، و بلافاصله پاهای شکمی جداسازی شدند و در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگه داری شدند (۲۳).

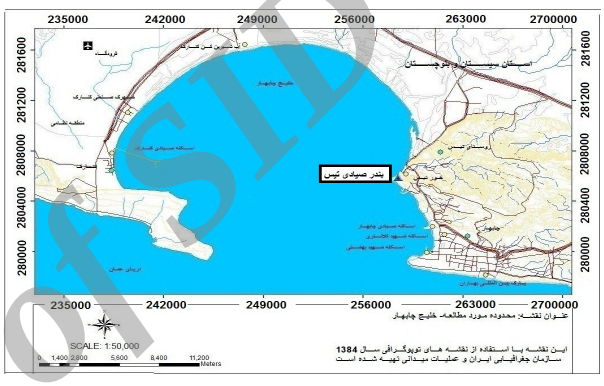
استخراج DNA ، واکنش زنجیره ای پلیمراز و توالی یابی

در این پژوهش به منظور استخراج DNA از تکه های کوچک جداشده از پاهای شکمی موجود و توسط بافر CTAB ٪۲ (CTAB ,۱.۴M NaCl , ۰.۱٪ β_mercaptooethanol ,۲۰mM EDTA and ۱۰۰mM TRIS-HCl pH۸) به همراه پروتئیناز K , β_ mercapthonal در یک میکروتیوب با هم ترکیب شدند ، پس از انکوباسیون و سانتریفیوژ، کلروفرم _ ایزوآمیل الکل (به نسبت ۲۴:۱) اضافه شد ، بسته به مقدار رسوب DNA ، آب دیونیزه اضافه شد و DNA استخراجی برای مطالعات بعدی در فریزر۲۰_ نگه داری شد (۲۳) . کیفیت DNA استخراج شده روی ژل آگارز ۱٪ با دستگاه الکتروفورز و کمیت آن هم با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر مدل RS۲۳۲C مورد سنجش قرار گرفت . بررسی باند ها ی DNAبا استفاده از دستگاه ژل داک مدلE_BOX_VX۲/۲M بررسی گردید ..در واکنش زنجیره ای پلیمراز بسط و توسعه قسمتی از ژن هسته ای ۱۸S rDNA که چیزی با استفاده از آغازگرهای های ‘Sa(۵’_AACCTGGTTGATCCTGCCAGT_۳’) ۱۸و ۱۸ Sb (‘GATCCTTCTGCAGGTTCACCTAC_۳_‘۵’) بود (۱۵) . هر واکنش زنجیره ای پلیمراز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر ependorf مدل ۵۳۳۱ انجام شد . در هر واکنش ۱۵ نانوگرم DNA استخراج شده در حجمی ۵۰ میکرولیتری بعنوان نمونه الگو استفاده گردید . در واکنش زنجیره ای پلیمراز ۵ میکرولیتر ۱۰ x , PCR Buffer ۶ میکرولیتر $Mgcl_2$ ، ۲.۵ میکرولیتر dNTP ، و Taq DNA polymerase مورد استفاده قرار گرفتند . در سیکل حرارتی داده شده به دستگاه PCR ، در ابتدا به مدت ۴ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت و بدنبال آن در یک سیکل ۳۸ تایی که شامل

Archive of SID

www.SID.ir

واسرشتگی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه ، اتصال اغازگرها در دمای ۵۶.۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه ،بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه ، و در اخر با دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه سیکل حرارتی پایان داده میشود . پس از اطمینان از صحت محصول PCR و تکثیر باندهای مورد نظر، به کمک الکتروفورز روی ژل آگارز ۱٪ ، نمونه ها برای تعیین توالی ژن ها به کشور کانادا ارسال گردید و نتایج بدست امده از تعیین توالی محصولات با استفاده از بسته های نرم افزاری مورد آنالیزهای فیلوژنتیکی قرار گرفت



تصویر شماره ۱: منطقه نمونه برداری، منطقه نمونبرداری در این مطالعه در شکل مشخص شده است .

آنالیزهای فیلوژنتیک

در ابتدا کروماتوگرام های حاصل از تعیین توالی نمونه ها ، با استفاده از نرم افزار BioEdit (۷) ویرایش شده سپس توالی های مورد اشاره با استفاده از نرم افزار ClustalX۷.۰ (۱۱) هم ردیف گردیدند. ماتریس داده های هم ردیف سازی شده برای هر دو قطعه مورد نظر DNA مورد نظر به کمک نرم افزار۵ MEGA (۱۴)به صورت جداگانه تجزیه و تحلیل میگردد . به منظور بررسی فیلوژنی گونه ها از آنالیز Maximum likelihood استفاده گردید . در این بررسی ۱۵ گونه از Pulmonata و Opisthobranchia که بیشترین شباهت را در توالی نوکلئوتیدها با گونه ی ایرانی داشتند برای آنالیزهای فیلوژنتیکی انتخاب شدند ، و گونه ی *Acteon tornatilis* از گروه opisthobranch بعنوان out group در نظر گرفته شد . هدف از قرار دادن out group در مطالعه فیلوژنتیکی مقایسه بهتر بین گونه های نزدیک به هم با گونه ای که از لحاظ ژنتیکی با گونه ی مورد مطالعه تفاوت زیادی دارد میباشد که صحت کار را بالا برده و مقایسه را راحت تر میکند . در حقیقت بکار بردن یک یا دو گونه به عنوان out group در ترسیم درخت، rooting را در درخت انجام می دهد .

جدول شماره ۱: گونه های استفاده شده در مطالعه حاضر و شماره ثبت آنها در بانک ژنی که در آنالیز مولکولی این پژوهش استفاده شده است.

نام گونه	شماره بانک ژنی
Peronia peronii	مطالعه حاضر
Peronia peronii	HQ659975
Peronia cf. peronii	HQ659976
Onchidium cf. tumidum	HQ659973
Onchidium verrucosum	AY427522
Phyllocaulis tuberculosus	HQ659987
Onchidella celtica	X70211
Marinula filholi	HQ659944
Aplysia parvula	DQ237959
Aplysia californica	AY039804
Sarasinula linguaeformis	HQ659989
Smeagol phillipensis	FJ917210
Phyllocaulis variegates	HQ659988
Vaginulus taunaisii	HQ659990
Parahedyle cryptophthalma	AY427518
Stylocheilus longicauda	DQ237963
(*Acteon* tornatilis(out group	GQ845183

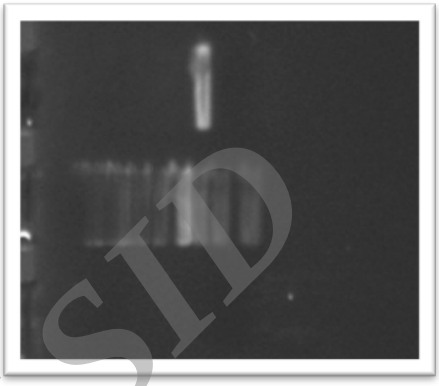
نتایج

با بررسی مورفولوژی گونه مورد نظر مشخص گردید که دارای بدنی نرم میباشد در حدود ۱۰۰ میلیمتر طول متوسط دارد و به رنگ سبز تیره مایل به قهوهای دیده میشوند، سطح پشتی بدن با زگیل هایی (tubercles) گرد و درشت سبز_خاکستری رنگ پوشیده شده است (شکل ۳_الف) ، گونه از نظر ریخت شناسی بیشترین شباهت را به گونه های موجود در جنس *Peronia* دارد .جنس *Peronia* در شاخه ی Heterobranchia ، در کلاد Panpulmonata و در خانواده ی Onchidiidae قرار گرفته است . در این پژوهش گونه ایرانی مورد آنالیز مولکولی قرار گرفت ، توالی یابی بصورت دو طرفه انجام شد و اندازه قطعه ژنی مورد مطالعه ۹۵۰ bp میباشد . و توالی ژنی بدست آمده در بانک ژنی ثبت گردید . نتایج آنالیزهای مولکولی و ترسیم درخت فیلوژنی به روش Maximum likelihood سه کلاد را

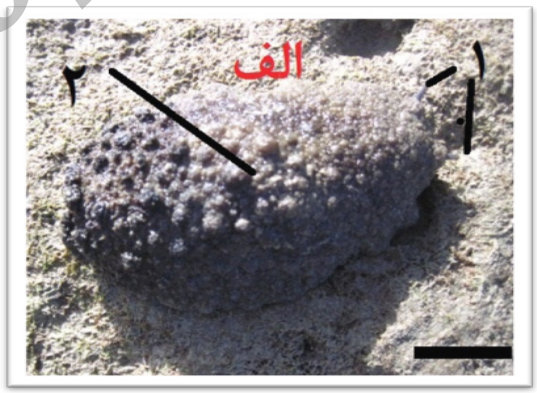
Archive of SID

www.SID.ir

نشان داد که گونه ی مورد مطالعه در کلاد Panpulmonata قرار گرفته است و با ۱۰۰ درصد boot strap حمایت میشود. (شکل شماره ۴) . کلاد های نشان داده شده در شکل شماره ۴ هر سه رابطه خویشاوندی نزدیکی با هم دارند و جز کلاد Euthyneura که از گروههای راسی شکم پایان میباشند هستند و همچنین کلاد Euthyneura جز کلاد اصلی Heterobranchia است که این گروه خود جز کلادهای اصلی شکم پایان میباشد .



شکل ۲: قطعه ژنی تکثیر یافته بروی ژل آگارز ۱ درصد متعلق به گونه ی *Peronia peronei* از ساحل تیس چابهار



تصویر شماره ۳:گونه ی *Peronia peronii* ازسواحل تیس در جنوب شرق ایران.شکل الف : سطح پشتی :۱_ تانتاکول ها . ۲_ زگیل های سبز خاکستری روی سطح بدن ، ب : سطح شکمی _ معیار سنجش ۱ سانتی متر میباشد .

بحث

مطاله حاضر روابط فیلوژنتیکی بین ۱۵ گونه از Opistho-branchia و Pulmonata که بیشترین شباهت را در توالی نوکلئوتیدها داشتند بر اساس توالی ژنومی ۱۸S rDNA را فراهم میکند . تا به امروز با تمام مطالعاتی که در زمینه تاریخ تکاملی Opisthobranchia صورت گرفته است ، اما هنوز هم روابط فیلوژنتیکی بین افراد این گروه بخوبی درک نشده است (۳،۲۲). همانطور که گفته شد تمامی گونه های استفاده شده در این پژوهش جز کلاد Heterobranchia میباشند این کلاد جز گروههای راسی شکم پایان میباشد و سه گروه از شکم پایان دریایی را در بر گرفته است ؛ که این سه گروه شامل Lower Heterobranchia ، Opisthobranchia و Pulmonata میباشد (۱) . خانواده هایی که در حال حاضر در کلاد Heterobranchia قرار گرفته اند در رده بندی های قبل تر در کلادهای دیگری از شکم پایان قرار داشته اند و همچنین برخی کلاد هایی که جز این گروه طبقه بندی شده بودند از این گروه جدا شده و در یک رده بندی جدید قرار گرفتند . برای مثال راسته ی Heterostro-pha که شامل snail sea ها میباشد جز Heterobranchia رده بندی شده میشدند ، اما در تقسیم بندی هایی که Bouchet & Rocroi در سال ۲۰۰۵ ارائه داد Heterostropha در این گروه قرار داده نشد . محققانی چون Gray در سال ۱۸۴۰ نظریه ای داشت مبنی بر اینکه Heterobranchia یک گروه مرزی بین Opisthobranchia و Pulmonata میباشد (۸) .

Jörger et al در سال ۲۰۱۰ دو کلاد اصلی Panpulmonata و Euopisthobranchia را در Heterobranchia معرفی کردند که هردو این کلاد درگروه Euthyneura قرار دارند (۱۱). Eu-thyneura یکی از تاکسون های راسی شکم پایان است شامل تاکسون هایی است که همگی آنها درپوش آبشوشی ندارند (۴) که دو گروه Opisthobranchia و Pulmonata را در بر گرفته است و در این صورت دو گروه نامبرده یک جد مشترک دارند و در گروه خواهری قرار گرفته اند(۲۱) . در مطالعات بعدی که انجام شد Pulmonata یک گروه پارافایلتیک با Opisthobran-chia معرفی شد (۴،۱۸،۱۹) .گونه مورد مطاله در کلاد Pan-

Archive of SID

www.SID.ir

pulmonata قرار گرفته است که همانطور که در تصویرشماره ۴ میتوان مشاهده کرد کلاد Panpulmonata با کلادهای دیگر در حالت منوفایلیتیک قرار گرفته است . گونه ی ایرانی با ۱۰۰ درصد boot strap در حالت منوفایلیتیک و با گونه *Pero-nia cf. peronii* در حالت خواهری قرار گرفته است . *Peronia* Fleming, ۱۸۲۲ جز slugs sea های دریازی میباشد که در گروه Pulmonata و خانواده ی Onchidiidae قرار دارد. با انجام آنالیزهای مولکولی مشخص شد که گونه ی ایرانی از نظر توالی ژنی مشابه با *Peronia cf. peronei* که در کلاد panpulmonata میباشد و یک کلاد منوفایلتیک است ،گونه ی ایرانی و دیگر گونه های که در این کلاد قرار دارند همگی جز خانواده On-chidiidae میباشند و از نظر ریخت شناسی بسیار بهم نزدیک میباشند . Onchidiidae خانواده کوچکی از Pulmonata های دریازی است که همه ی گونه های این خانواده (بجز ۵ گونه) صدف ندارند و جز slug sea ها میباشند . خانواده Onchidiidae جز بالا خانواده ی Onchidioidea رده بندی شده است . افراد بالغ این خانواده صدف ندارند در حالیکه در مرحله لاروی صدف دیده میشود ، با از دست دادن آبشش ها در این خانواده ، حفره جبه هم از بین رفته است ، با توجه به فقدان آبشش ها بهیچ وجه نمیتوان افراد این گروه را جز Opisthobranchia دانست (۲) . گونه های این کلاد در درخت فیلوژنی ترسیم شده بیشترین طول شاخه و بیشترین واگرایی نسبت به بقیه گونه های دو کلاد دیگر را از آن خود کرده اند. کلاد , Euopisthobranchiaیک کلاد منوفایلتیک است ، یعنی همه ی اعضای این کلاد یک نیای مشترک دارند . که گونه های این کلاد جز خانواده Aplysiidae میباشند که با ۸۹ درصد boot strap حمایت میشوند ، خانواده ی Aplysiidae در بالاخانواده ی Aplysioidea قرار گرفته است و تنها خانواده ی این گروه میباشد ، Aplysioidea تعداد زیادی از slug sea های بزرگ و شکم پایان دریازی را در بر گرفته است که جز کلاد Aplysiomorpha و در گروه Opisthobranchia قرار گرفته است . این خانواده با نام رایج sea hare شناخته شده است ، زیرا برخلاف slug sea ها بدنی بزرگ دارند ، کاملا در زیر آب زیست میکنند ، بدنی گرد دارند ، rhinophore های بزرگی بر روی سر خود دارند و شکل کلی بدن آنها شبیه به یک خرگوش است (۱۱) . بر اساس مطالعاتی که Klussmann-Kolb در سال ۲۰۰۴ انجام داد ، مشخص شد که Aplysiidae با داشتن دو کلاد مجزا یک کلاد منوفایلتیک است (۱۳). اولین مطالعات فیلوزنتیکی کلاد Aplysia توسط Fiorito et al در سال ۱۹۹۰ (۵)، Rinaldi و Ohir در سال ۱۹۹۸ انجام گرفت (۱۸). کلاد سه ، کلاد panpulmonata، یک کلاد منوفایلتیک است و با ۹۳ درصد boot strap حمایت میشود . در کلاد سه ، Acochlidiacea یک کلاد از Heterobranchia میباشد که از نظر ریخت شناسی موجودات بسیار کوچک و ریزی هستند که صدف و آبشش خود را از دست داده اند (۱۱) . کلاد یک و سه هردو گونه های کلاد Panpulmonata میباشند اما چون خانواده ها و زیر کلادهای متفاوتی داشته اند در دو کلاد جداگانه تقسیم بندش شده اند. با مطالعه حاضر و تمامی تحقیقات مشابه در کنار بررسی های ریخت شناسی موجودات میتوان کمک شایانی به پیشبرد طبقه بندی Heterobranchia کرد .

تشکر و قدردانی

کلیه مراحل آزمایشگاهی این پژوهش در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه علوم دریایی و دریانوردی چابهار انجام شده است که بدین وسیله از زحمات مسئولین این بخش و جناب آقای مهندس زاده عباس مسئول محترم آزمایشگاه و سر کار خانم بهروزی و جهانتیغ کارشناسان آزمایشگاه سپاسگزاری میشود .

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

(1) Bouchet P & Rocroi JP ,Frýda J , Hausdorf B , Ponder W, Valdes A , Warén A. Classification and nomenclator of gastropod families. Malacologia,۳۹۷ :(۲-۱)۴۷ ;۲۰۰۵ pp.
(2) Dayrat B. Review of the current knowledge of the systematics of Onchidiidae (Mollusca: Gastropoda: Pulmonata) with a checklist of nominal species. Zootaxa,26–1 :20 ;2009
(3) Dayrat B, Tillier A, Lecointre G , Tillier S. New clades of euthyneuran gastropods (Mollusca) from 28S rRNA sequences. Mol. Phylogenet. Evol,235–225 :19 ;2001 .
(4) Dayrat B , Tillier S. Evolutionary relationships of euthyneuran gastropods (Mollusca): a cladistic re-evaluation of morphological characters. Zool. J. Linn. Soc,470–403 :135 ;2002 .
(5) Fiorito G , Capuano C P. Bergamo. Analisi preliminare delle relazioni filogenetiche delle specie di Aplysia 1767 (Mollusca: Gastropoda, Opistobranchia). Lav. Sci. Ital. Malacol,261-270 :23 ; 1990 .
(6) Göbbeler K , Klussmann-Kolb A . Molecular phylogeny of the Euthyneura (Mollusca, Gastropoda) with special focus on Opisthobranchia as a framework for reconstruction of evolution of diet. Thalassas,121-154 :(2) 27 ; 2009
(7) Hall TA. BIOEDIT: A user-friendly biological sequence aligment editor and analysis for Windows 95/98/NT. Nucleic Symp Ser, 1999; 41: 95-98.
(8) Haszprunar G. The Heterobranchia a new concept of the phylogeny of the higher Gastropoda. Z. Zool. Syst. Evol. Forsch,37–15 :(1) 23 ;1985 .
(9) Haszprunar G, Huber G . On the central nervous system of Smeagolidae and Rhodopidae, two families questionably allied with the Gymnomorpha (Gastropoda: Euthyneura). Anim Sci & Zool, 1990 ;199_220:185
(10)Jeanmougin F, Thompson JD , Gouy M, Higgins DG, Gibsonn TJ. (1998). Multiple sequence alignment with Clustal X.Trends . Biochem. Sci.1998, 23:403–405
(11)Jörger K M , Stöger I, Kano , Fukuda H , Knebelsberger T , Schrödl M. On the origin of Acochlidia and other enigmatic euthyneuran gastropods, with implications for the systematics of Heterobranchia. BMC Evol. Biol,2010; 10: 323
(12)Klussmann-Kolb A, Dinapoli A, Kuhn K, Streit B , Albrecht C. From sea to land and beyond – New insights into the evolution of euthyneuran Gastropoda (Mollusca). BMC Evol. Biol, 2008; 8: 57.
(13)Klussmann Kolb A. Phylogeny of the Aplysiidae (Gastropoda, Opisthobranchia) with new aspects of the evolution of seahares. Zool Scr,462–439 :(5) 33 ;2004
(14)Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software for microcomputers. Comput. Appl. Biosci, 1994; 10 (2): 189–91
(15)Medlin LK , Elwood HJ , Stickel S, Sogin ML. The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16s-like rRNA-coding regions. Gene,491-499 :71;1988
(16) Meyer A ,Todt C ,Mikkelsen NT ,Lieb B .Fast evolving18 S rRNA sequences from Solenogastres) Mollusca (resist standard PCR amplification and give new insights into mollusk substitution rate heterogeneity. BMC Evol. Biol,;2010 .70 :10
(17)Ponder WF, Lindberg DR . Towards a phylogeny of gastropod molluscs: an analysis using morphological characters. Zool. J. Linn. Soc, 1997; 119, 83–265
(18)Rinaldi AC , Ohir R. Phylogeny of anaspid taxa as inferred from amino acid sequences of monomeric myoglobins. Israel J. Zool,3-8 :44 ;1998
(19)Salvini P L , Steiner G. Synapomorphies and plesiomorphies in higher classification of Mollusca.. J. Malacol. Soc. Lond., 1996; 29–51.
(20)Shields CH. Nudibranchs of the ross sea, antarctica: Phylogeny, diversity, and divergence. A Thesis Presented to the Graduate School of Clemson University, 2004; 15:1_15
(21)Spengel J. Die Geruchsorgane und das Nervensystem der Mollusken. Z Wiss Zool Abt A, 1881; 35, 333–383.
(22)Thollesson M. Phylogenetic analysis of Euthyneura (Gastropoda) by means of the 16S rRNA gene. Proc R Soc Lond, Series B,83–75 :266 ;1999 .
(23)Thollesson M. Increasing fidelity in parsimony analysis of dorid nudibranchs by differential weighting, or a tale of two genes. Mol. Phylogenet. Evo,172–161,(2),16 ;2000
(24)Vonnemann V, Schrödl M , Klussmann-Kolb A , Wägele H. Reconstruction of the phylogeny of the Opisthobranchia (Mollusca: Gastropoda) by means of ۱۸s and ۲۸s rRNA gene sequences . J. Molluscan Stud,125–113 :(2) 71 ;2005

Archive of SID

www.SID.ir