

## پایش مقایسه‌ای کلادهای غالب زوگرانته‌های همزیست با مرجان‌های آبسنگ‌ساز نواحی شرقی جزیره کیش (خلیج فارس)

مونا فردیزدانی<sup>۱</sup>، پرگل قوام مصطفوی<sup>۲</sup>، محمد حسن شاه حسینی<sup>۳،۴</sup>

۱. کارشناس ارشد جانوران دریا، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه بیولوژی دریا، تهران/ایران

۲. استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه بیولوژی، دریا تهران/ایران

۳. دانشیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر قدس، گروه میکروبیولوژی، تهران/ایران

۴. مؤسسه ایرانیان ژن فناوری (IGF)، تهران/ایران

### چکیده

**سابقه و هدف:** Symbiodinium جلبک تک سلولی دو تاژکی است که با تعدادی از بی‌مهرگان همزیستی دارد و تاکنون ۹ کلاد از آن با روش‌های مولکولی شناسایی شده است. کلادهای مختلف Symbiodinium خصوصیات فیزیولوژیکی متنوعی دارند که می‌توانند تأثیرات متفاوتی بر دوام و بقای میزبان آن‌ها در برابر شرایط مختلف محیطی و موقعیت‌های جغرافیایی داشته باشند. در این تحقیق، کلادهای زوگرانته همزیست با مرجان‌های آبسنگ‌ساز در شرق جزیره کیش با نمونه‌های مورد بررسی در سال ۲۰۰۷ مقایسه گردیدند.

**مواد و روش‌ها:** از ۵ گونه مرجان *Acropora downingi*, *Acropora arabiensis*, *Platygyra daedalea*, *Psammacora contigua*، از عمق ۲ تا ۵ متری نمونه‌برداری انجام گرفت. بعد از جدا کردن بافت نرم حاوی Symbiodinium مرجان‌ها توسط پمپ هوا، استخراج DNA به روش CTAB-Chloroform به منظور بررسی کلادها و زیرکلادهای Symbiodinium، با استفاده از ژن LSU (Large Subunit Ribosomal DNA) انجام شد. پس از انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، نمونه‌ها توالی‌یابی شدند.

**یافته‌ها:** نتایج تعیین ترادف ژنی نشان داد که هیچ تفاوتی بین کلادهای به‌دست آمده و کلادهای گزارش شده در سال ۲۰۰۷ وجود ندارد. هیچ‌یک از گونه‌های مرجانی بررسی شده تغییر و جابجایی در جوامع همزیست خود ایجاد نکرده‌اند.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به عمق کم و شرایط سخت در ناحیه شرقی جزیره کیش، حضور کلاد D ممکن است یک پاسخ سازشی یا اقلیمی شدن به شرایط محیطی غالب در منطقه باشد.

**واژه کلیدی:** جزیره کیش، Symbiodinium، مرجان‌های آبسنگ‌ساز، اقلیمی شدن، توالی‌یابی.

### مقدمه

آبسنگ‌های مرجانی از توده‌های کربنات کلسیم ( $\text{CaCO}_3$ ) که عمدتاً توسط مرجان‌های هرمتیپیک رسوب داده می‌شوند ساخته شده‌اند (۵) و با ایجاد بستری سخت یکی از متنوع‌ترین و پر تولیدترین اکوسیستم‌ها را در نواحی استوایی و نیمه استوایی تشکیل می‌دهند (۱۰، ۲۲). مرجان‌های هرمتیپیک رابطه درون همزیستی اجباری با داینوفلاژله تک سلولی

نویسنده مسئول: مونا فردیزدانی

پست الکترونیکی: [M.fardiyazdani@gmail.com](mailto:M.fardiyazdani@gmail.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۰۵/۱۰

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۲/۰۷/۳۰

## مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری در تاریخ ۱۳۹۱/۰۳/۲۴ در شرق جزیره کیش انجام گرفت. مختصات نقطه نمونه‌برداری  $34^{\circ} 34' N$  و  $54^{\circ} 09' E$  بود. نمونه‌برداری از عمق ۲ تا ۵ متر با غواصی و از ۵ گونه مرجان (۳ کلنی، ۳ تکرار) انجام شد. پس از نمونه‌برداری، مرجان‌ها در کیسه‌های پلاستیکی حاوی بافر 20% DMSO نمکی به آزمایشگاه منتقل شدند. بافر  $DNAB (NaCl 0.4 M, EDTA 50 mM)$  جهت جداسازی بافت نرم مرجان‌ها از اسکلت آنها به کار برده شد. استخراج DNA به روش CTAB-Chloroform صورت گرفت. ابتدا توده لزوج حاوی زوگزانتهل سانتریفیوژ شد و سپس از SDS (Sodium dodecyl sulfate) ۱۰٪ و بافر DNAB به ترتیب جهت حل کردن لیپیدها و پروتئین‌های غشای سلولی و خنثی کردن آنزیم تجزیه کننده DNA استفاده شد. پس از آن نمونه‌ها در دمای ۶۵ درجه سلسیوس به مدت ۱ ساعت و ۴۵ دقیقه قرار گرفتند. از آنزیم پروتئیناز K به منظور حذف سایر پروتئین‌ها بهره برده شد. پس از حرارت دیدن به مدت ۳ ساعت در دمای ۵۵ درجه سلسیوس، از CTAB (Cetyl trimethylammonium bromide) جهت جداسازی پروتئین و لیپیدهای محلول، استفاده شد. در نهایت از دو مرحله رسوب در اتانول جهت خالص سازی DNA استفاده شد (۱).

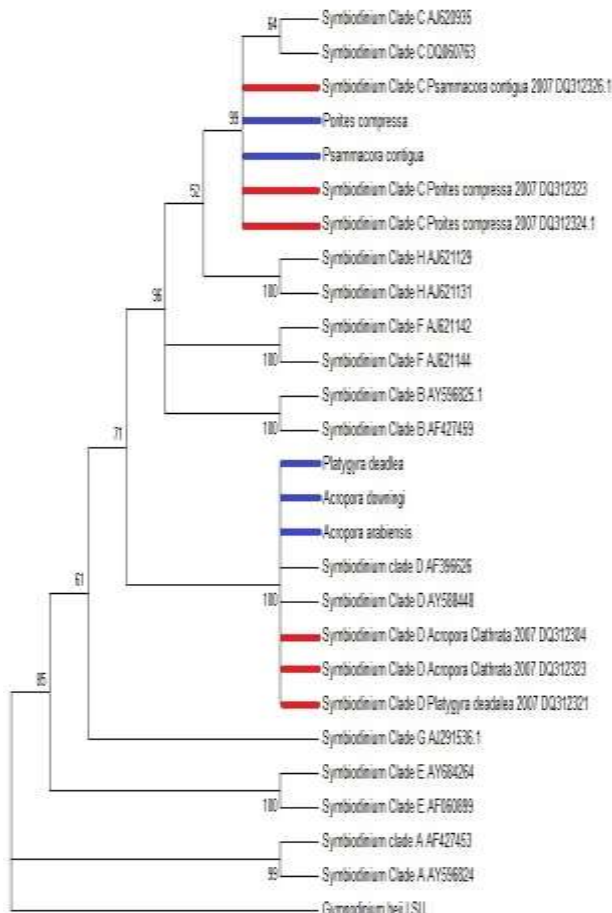
ژن هدف Large Subunit Ribosomal DNA با استفاده از پرایمرهای اختصاصی Symbiodinium با نامهای MOSF و MOSR با توالی نوکلئیدی 5'-ATATAAGTAAGCGGAGGAAAAG-3' و 3'-CTTTCGGGTCCTAACACACATG-3' تکثیر شد (۷). در تمام واکنش‌های زنجیره‌ای پلی مرز (PCR) از DNA استخراج شده با غلظت ۱ng، dNTP با غلظت ۰/۲ mM، پرایمر هر کدام با غلظت ۵ μM و Taq DNA Polymerase ۰/۳ U (BioFlux) در حجم کلی ۲۵ μl استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلی مرز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر و بر اساس پروفایل حرارتی ۵ دقیقه در دمای ۹۴°C جهت جدا شدن دو رشته DNA استخراج شده از یکدیگر، ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴°C، ۱ دقیقه در دمای ۶۰°C، ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲°C برای ۳۰ سیکل و ۷ دقیقه در دمای ۷۲°C جهت مرحله نهایی ساخت رشته مکمل صورت گرفت. کیفیت محصولات PCR با استفاده از الکتروفورز با اختلاف پتانسیل ۷ و شدت جریان ۴۰ mA در ژل آگاروز ۱/۵ درصد با

فتوسنتز کننده جنس Symbiodinium تشکیل می‌دهند (۱۰). Symbiodinium با انجام عمل فتوسنتز، تأمین مواد آلی را به عهده داشته (۹) و از طرف دیگر باعث رسوب کربنات کلسیم توسط مرجان‌ها و آهکی شدن آنها می‌شود (۲۳)، در عوض مواد زائد غیرآلی حاصل از تنفس میزبان را دریافت می‌کند (۱۷). این رابطه همزیستی تحت استرس‌های محیطی مثل افزایش غیر معمول دمای آب به همراه افزایش نور، از بین می‌رود و تأثیرات مهمی بر روی میزبان دارد (۱۱). در پی افزایش دما جلبک همزیست نمی‌تواند بدون آزاد کردن رادیکال‌های اکسیژن، نور را پردازش کند. این پدیده با افزایش سن نیز دیده می‌شود، مرجان به جهت جلوگیری از آسیب، همزیست خود را اخراج و یا در درون سلول خود تجزیه می‌کند (۱۶). بازتاب این خروج و غیرفعال شدن همزیست در بافت‌های مرجان به عنوان پدیده سفیدشدگی مرجان شناخته شده است زیرا با خروج همزیست، رنگ سفید اسکلت مرجان نمایان می‌شود (۱۶).

با توجه به عدم تطبیق شناسایی مورفولوژیک Symbiodinium با خصوصیات فیزیولوژیکی آن، برای شناسایی آنها از روش‌های مختلف مولکولی استفاده شده و تاکنون ۹ کلاد از آنها (A-I) گزارش شده است. برای اولین بار Rowan و Power سه کلاد را در سواحل شرقی اقیانوس اطلس شناسایی کردند (۱۸). پس از آن بررسی‌های مختلفی به ترتیب در اقیانوس‌های آرام و هند جهت شناسایی سایر همزیست‌ها صورت گرفت (۲، ۸، ۱۳، ۱۵، ۱۹، ۲۱، ۲۳، ۲۵، ۲۶).

در خلیج فارس برای اولین بار Baker و همکاران در سال ۲۰۰۴ کلادهای A، C و D را در سواحل عربستان شناسایی کرده‌اند (۲). هم‌چنین مصطفوی و همکاران در سال ۲۰۰۷ کلاد C90 و D را در ۸ گونه مرجان سخت در جزیره کیش و لارک شناسایی کرده‌اند (۷). در ۱۰ الی ۲۸ آگوست سال ۲۰۰۷ در جزیره کیش پدیده سفیدشدگی اتفاق افتاد و در طی دو هفته اول آن ۸۵ درصد کلنی‌های مرجانی به صورت کامل یا بخشی، دچار سفیدشدگی شدند. پس از شش ماه اسکلت مرجان توسط جلبک‌ها پوشانده شده بود (۱۲). با توجه به حضور کلاد D در گذشته در مرجان‌های جزیره کیش به دلیل شرایط سخت خلیج فارس و بروز پدیده سفیدشدگی، بررسی کلادها پس از سال ۲۰۰۷ به منظور شناسایی کلاد غالب کنونی و مقایسه تغییرات صورت گرفت.

رنگ‌آمیزی توسط اتیدیوم بروماید سنجیده شد. توالی‌یابی در انگلستان توسط شرگت Biosource Science به روش ختم زنجیره صورت گرفت. نتایج حاصل، با استفاده از نرم‌افزار MEGA 5 بررسی و شباهت آن با سایر توالی‌های موجود در بانک ژنی سنجیده شد.

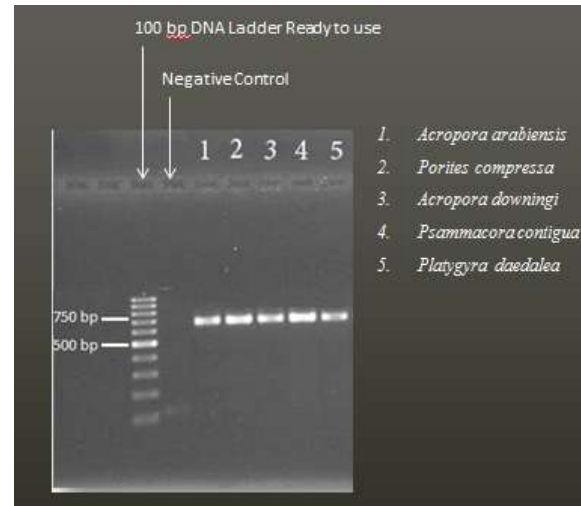


شکل ۲- درخت فیلوژنی ML

از ژنوتیپ‌های ریپوزومی LSU جلبک‌های همزیست مرجان-های جزیره کیش (خطوط آبی نشان‌دهنده نمونه‌ها و خطوط قرمز نشان‌دهنده نمونه‌های به‌دست آمده در سال ۲۰۰۵ می-باشد).

## بحث

خلیج فارس به علت قرارگرفتن در عرض‌های جغرافیایی نیمه‌گرمسیری، محدودیت‌هایی را برای جوامع مرجانی به‌وجود آورده است (۲). مطالعه‌ای که توسط Baker و همکاران در سال ۲۰۰۴ در سواحل عربستان انجام گرفت، مشخص ساخت ۶۳٪ از مرجان‌ها دارای همزیستی با کلاد D بودند (۲). مصطفوی و همکاران در سال ۲۰۰۷ کلاد D را از گونه‌های *Platygyra daedalea* و *Acropora clathrata* و کلاد C90 را از گونه‌های *Porites compressa* و *Psammacora contigua* در جزیره کیش و لارک شناسایی کرده‌اند. به دلیل عمق کم در شرق جزیره کیش، کلادهای *Symbiodinium* همزیست با مرجان‌ها، عمدتاً از نوع کلاد مقاوم‌تر هستند (۷).



شکل ۱- بررسی کیفیت محصولات PCR

## یافته‌ها

کیفیت و کمیت محصول PCR توسط ژل آگارز ۲ درصد صورت گرفت و طول محصول PCR با استفاده از DNA Ladder 100 bp اندازه‌گیری شد. طول قطعات rRNA ۲۸s تکثیر شده در ۵ گونه ۷۵۰ bp بود. تصویر بررسی کمیت و کیفیت محصولات PCR در شکل ۱ قابل مشاهده است. گونه-های مرجانی بدست آمده شامل *Porites compressa* Ellis and Klunzinger 1879، *Acropora arabiensis* Hodgson and Solander 1786، *Acropora downingi* Lamarck 1816، Carpenter 1995، *Psammacora contigua* Esper 1797 هستند. پس از بررسی شباهت نتایج توالی‌یابی با نمونه‌های ثبت شده در بانک ژنی، مشخص گردید که توالی‌های به‌دست آمده بیشترین شباهت را (>۹۵٪) با کلادهای C و D به‌دست آمده داشتند. زیر کلاد D1a در گونه‌های *Acropora*، *Acropora arabiensis*، *Acropora downingi* و زیر کلاد C90 در گونه‌های *Platygyra daedalea*، *Psammacora contigua*، *Porites compressa* مشاهده شد. درخت فیلوژنی Maximum Likelihood بر اساس مدل Tamura-Nei و با اعتبار ۱۰۰۰ بر پایه برون گروه *Gymnodinium beii* جهت بررسی و تحلیل قرابت توالی‌های به‌دست آمده در این تحقیق با سایر توالی‌ها رسم شد (شکل ۲).

۲۸ آگوست سال ۲۰۰۷ اتفاق افتاد تعداد زیادی از کلنی‌های مرجانی شرق جزیره کیش را از میان برد. در روزهای ابتدایی اکثر کلنی‌های خانواده Acropora سفید شدند در حالی که اعضای خانواده‌های Poritidea و Favidae سالم ماندند. پس از دو هفته تمام کلنی‌های خانواده Acroporidae به همراه کلنی‌های خانواده‌های مقاوم دچار سفیدشدگی شدند (۱۲). با توجه به نتایج حاصل و مقایسه آن با نتایج مصطفوی و همکاران که قبل از سال سفیدشدگی ۲۰۰۷ اتفاق افتاده بود، هیچ تغییر کلادی در گونه‌های مرجانی بررسی شده پس از سفیدشدگی و احیاء نسل صورت نگرفته است و تمامی گونه‌ها دقیقاً دارای جوامع Symbiodinium گذشته هستند. شایان ذکر است در زمان نمونه‌برداری، جمعیت مرجانی عمدتاً تک‌گونه‌ای بوده و تنوع گونه‌ای منطقه نیز بالا نبود که خود حاکی از شرایط نامناسب است. بر اساس تحلیل درخت فیلوژنی ML نیز کلادهای به‌دست‌آمده در این بررسی قرابت بیشتری به نمونه‌های سال ۲۰۰۵ در مقایسه با هم کلادهای خارج از خلیج-فارس خود دارند.

عدم تغییر کلاد توسط کلنی‌های جدید به عنوان میزبان می‌تواند نشان‌دهنده سازش (Adaptation) ایجاد شده و یا اقلیمی‌شدن (Acclimatization) مرجان‌های ساکن منطقه باشد. به نظر می‌رسد پدیده سفیدشدگی سال ۲۰۰۷ مانند سایر پدیده‌های سفیدشدگی دوره ای اکوسیستم‌های مرجانی بوده است اما نرخ مرگ و میر مرجان‌ها در آن در مقایسه با گذشته بیشتر بوده است.

## سپاسگزاری

از آقای دکتر امیر حسین قیطانچی که در نمونه‌برداری این طرح مرا یاری کردند و خانم سولماز پارسا بی‌نهایت سپاسگزارم. همچنین از مسئولان محترم آزمایشگاه دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات که امکان اجرای این پروژه را در اختیار اینجانب قرار داده‌اند، قدردانی می‌نمایم.

به طور کلی تحقیقاتی که از سال ۲۰۰۵ تا سال ۲۰۱۱ در جزایر شمالی خلیج فارس انجام گرفته نشان داده است که ۷۷/۴ درصد از کل گونه‌های مرجانی مطالعه شده دارای Symbiodinium با کلاد D هستند و کلاد C و A به ترتیب ۱۶/۸٪ و ۵/۸٪ از کل گونه‌های مرجانی مطالعه شده را شامل می‌شوند (۷ و ۲۱).

غالب بودن کلاد D در خلیج فارس می‌تواند نشانی از سازش این کلاد در برابر فاکتورهای نامساعد محیطی آب‌های خلیج-فارس باشد. یکی از مهم‌ترین ویژگی‌هایی که می‌توان مشخصه کلاد D دانست، مقاومت این کلاد در برابر درجه حرارت‌های بالاست. بر اساس آزمایشات انجام شده مشخص گردیده است که سیستم فتوسنتزی کلاد D مقاومت بالاتری را در برابر حرارت‌های زیاد نسبت به سایر کلادها نشان می‌دهد (۶). به-طور کلی، این اطلاعات این موضوع را تأیید می‌کند که کلاد D با گونه‌های متنوعی از مرجان هم‌زیستی می‌کند که شرایطی از قبیل چالش‌های دمایی تا آلودگی را تجربه می‌کنند (۲۳). و مرجان‌هایی که کلاد D در آنها غالب است رشد کندتری نسبت به آن‌هایی دارند که با کلاد C هم‌زیستی دارند (۱۴).

کلاد D یک کلاد فرصت‌طلب است و در مرجان‌هایی که در معرض استرس‌های محیطی با اثرات منفی بر روی سلامت مرجان‌ها هستند غالب می‌شود (۲۳). هیچ اطلاعاتی در مورد تحمل دمایی زیر کلادهای D وجود ندارد در حالی که بعضی از زیر کلادهای کلاد C شواهدی از تحمل گرمایی بیشتری را از دیگر کلادها نشان داده‌اند (۱۱، ۲۰، ۲۴). در مرجان‌هایی که در اثر شرایط استرس، سفیدشدگی و یا از دست‌دادن هم-زیست از بافت‌ها، زنده می‌مانند، فرصتی برای میزبان به‌وجود می‌آید تا در طول مدت ترمیم، نوع هم‌زیست داخلی خود را اصلاح کند و باعث سازگاری بهتر با استرس‌های محیطی می‌شود (۴) و این خود یک نوعی از مکانیسم بقاء برای مرجان‌هایی که با گرم شدن اقیانوس‌ها و تغییر آب و هوا روبرو می‌شوند به‌شمار می‌رود (۳). پدیده سفیدشدگی که در ۱۰ الی

## منابع

1. Baker AC. The symbiosis ecology of reef-building corals, 1999.
2. Baker AC, Starger CJ, McClanahan TR, Glynn PW. Coral reefs: corals' adaptive response to climate change. *Nature*, 2004;430(7001):741.-
3. Berkelmans R, Van Oppen MJH. The role of zooxanthellae in the thermal tolerance of corals: a 'nugget of hope' for coral reefs in an era of climate change. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2006;273(1599):2305-12.
4. Buddemeier RW, Fautin DG. Coral bleaching as an adaptive mechanism. *Bioscience*, 1993;43(5):320-6.
5. Castro P, Huber ME. *Marine Biology*, New York, U.S.: McGraw-Hill; 2008. 459 p.

6. Coles S, Brown BE. Coral bleaching—capacity for acclimatization and adaptation. *Advances in marine biology*, 2003;46:183-223.
  7. Ghavam Mostafavi P, Fatemi S, Shahhosseiny M, Hoegh-Guldberg O, Loh W. Predominance of clade D *Symbiodinium* in shallow-water reef-building corals off Kish and Larak Islands (Persian Gulf, Iran). *Marine Biology*, 2007;153(1):25-34.
  8. Glynn PW, Mate JL, Baker AC, Calderon MO. Coral bleaching and mortality in panama and ecuador during the 1997/1998 El Nino/Southern Oscillation Event: spatial/temporal patterns and comparisons with the 1982/1983 event. *Bulletin of Marine Science*, 2001;69(1):79-109.
  9. Hoegh-Guldberg O. Climate change, coral bleaching and the future of the world's coral reefs. *Marine and freshwater research*, 1999;50(8):839-66.
  10. Hutchings P, Kingsford M, Hoegh-Guldberg O. *The Great Barrier Reef: biology, environment and management*, Netherlands: Springer; 2008. 377 p.
  11. Jones AM, Berkelmans R, Oppen MJH, Mieog JC, Sinclair W. A community change in the algal endosymbionts of a scleractinian coral following a natural bleaching event: field evidence of acclimatization. *Proceedings of The Royal Society*, 2008.
  12. Kabiri K, Pradhan B, Samimi-Namin K, Moradi M. Detecting coral bleaching, using QuickBird multi-temporal data: A feasibility study at Kish Island, the Persian Gulf. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 2012.
  13. LaJeunesse TC, Loh WK, 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. *Limnology and Oceanography*, 2003;48(5):2046-54.
  14. Little AF, Van Oppen MJH, Willis BL. Flexibility in algal endosymbioses shapes growth in reef corals. *Science*. 2004;304(5676):1492-4.
  15. Loh W, Carter D, Hoegh-Guldberg O, editors. *Diversity of zooxanthellae from scleractinian corals of One Tree Island (the Great Barrier Reef)*. Proceedings of the Australian Coral Reef Society 75th Anniversary Conference, Heron Island University of Queensland, Brisbane, Australia; 1998.
  16. Marshall P, Schuttenberg H. *A Reef Manager's Guide to Coral Bleaching*, Townsville, Australia: Great Barrier Reef Marine Park Authority; 2006. 163 p.
  17. Muscatine L. Glycerol excretion by symbiotic algae from corals and *Tridacna* and its control by the host. *Science*, 1967;156(3774):516-9.
  18. Rowan R, Powers DA. Molecular genetic identification of symbiotic dinoflagellates (zooxanthellae). *Marine ecology progress series* Oldendorf, 1991;71(1):65-73.
  19. Rowan R, Knowlton N, Baker A, Jara J. Landscape ecology of algal symbionts creates variation in episodes of coral bleaching. *Nature*, 1997;388(6639):265-9.
  20. Sampayo E, Ridgway T, Bongaerts P, Hoegh-Guldberg O. Bleaching susceptibility and mortality of corals are determined by fine-scale differences in symbiont type. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008;105(30):10444-9.
  21. Shahhosseiny MH, Mostafavi PG, Fatemi SMR, Karimi E. Clade identification of symbiotic zooxanthellae of dominant scleractinian coral species of intertidal pools in Hengam Island. *African Journal of Biotechnology*, 2011;10(9):1502-6.
  22. Spalding MD, Grenfell AM. New estimates of global and regional coral reef areas. *Coral Reefs*, 1997;16(4):225-30.
  23. Stat M, Gates RD. Clade D *Symbiodinium* in Scleractinian Corals: A “Nugget” of Hope, a Selfish Opportunist, an Ominous Sign, or All of the Above? *Journal of Marine Biology*, 2010;2011:9.
  24. Tchernov D, Gorbunov MY, De Vargas C, Narayan Yadav S, Milligan AJ, Häggblom M, et al. Membrane lipids of symbiotic algae are diagnostic of sensitivity to thermal bleaching in corals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004;101(37):13531-5.
  25. Visram S, Wiedenmann J, Douglas A. Molecular diversity of symbiotic algae of the genus *Symbiodinium* (Zooxanthellae) in cnidarians of the Mediterranean Sea. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 2006;86(6):1281.
- Wilson S, Fatemi SMR, Shokri MR, Claereboudt M. STATUS OF CORAL REEFS OF THE .26 PERSIAN/ARABIAN GULF AND ARABIAN SEA REGION. Australian Institute of Marine Science, 2002