

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

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 دریانوردی چابهار، چابهار، ایران
^۲ کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه علوم دریایی و دریانوردی چابهار، چابهار، ایران

چکیده

سابقه و هدف: بررسی های فیلوژنتیکی و شناسایی مورفولوژی و مولکولی بر روی گونه های هر منطقه میتواند پایه ی مطالعات بعدی را بنیان گذاری 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 آزمایشگاه 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 پلیمرز و توالی یابی و ترسیم درخت فیلوژنی انجام شدند.

یافته ها: توالی نوکلئوتیدهای بدست آمده در منطقه ژنی 18 S rDNA مورد آنالیزهای مولکولی قرار گرفتند. با آنالیزهای انجام شده و ترسیم درخت فیلوژنی مشخص شد که گونه ی ایرانی در کلاسد Panpulmonata قرار گرفته است، گونه ایرانی و دیگر گونه های این کلاسد بیشترین واگرایی را نسبت به گونه های دوکلاسد دیگر دارند.

نتایج: آنالیز فیلوژنتیکی ML نشان 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*، 18S 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- و Opisthobranchia Milne-Edwards, ۱۸۴۸، vier, ۱۸۱۴ و Prosobranchia Miln _ Edwards, ۱۸۴۸، تقسیم بندی شدند، شکم پایان یکی از گروههای تخصص یافته ی متازوا میباشد و مطالعات زیادی روی آنها صورت گرفته است اما مطالعه فیلوژنی آنها از سال ۱۹۸۸ انجام شد (۹). Opistho-) Euthyneura branches 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 میباشدند، تاکسون راسی شکم پایان محسوب میشود(۹).

آدرس نویسنده مسئول: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم دریایی

دانشگاه علوم دریایی و دریانوردی چابهار، چابهار، ایران

Email: gilan.attaran@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۹۳/۲/۲۹

تاریخ پذیرش: ۹۳/۴/۲۰

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 پارافایلیتیک هستند که شاید بدلیل وجود Pulmonata باشد، البته این نظریه هنوز به اثبات نرسیده است. Pulmon- ata ممکن است یک گروه منوفایلیتیک با Opisthobranchia باشد، از طرفی Opisthobranchia یک گروه منوفایلیتیک 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 آن جمله میتوان Göbbeler و klussmann-kolb در سال ۲۰۰۹ (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 ۴-۵ نمونه این نرم تن زگیل دار از منطقه بین جزر و مدی تیس واقع در غرب چابهار (شکل شماره ۱) با موقعیت جغرافیایی ۶۰° و ۳۷° شرقی و 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 پلیمرز و توالی یابی

در این پژوهش به منظور استخراج DNA از تکه های کوچک جداشده از پاهای شکمی موجود و توسط بافر CTAB ۲٪، ۲۰mM β _mercaptoethanol، ۰.۱٪، ۱.۴M NaCl، CTAB)، ۱۰۰mM TRIS-HCl pH۸ (EDTA and ۲۰mM β _K mercapthonal در یک میکروتیوب با هم ترکیب شدند، پس از انکوباسیون و سانتریفیوژ، کلروفرم - ایزوآمیل الکل (به نسبت ۱:۲۴) اضافه شد، بسته به مقدار رسوب DNA، آب دیونیزه اضافه شد و DNA استخراجی برای مطالعات بعدی در فریزر ۲۰- 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 DNA با استفاده از دستگاه ژل داک مدل E_BOX_VX۲/۲M بررسی گردید. در واکنش زنجیره ای پلیمرز بسط و توسعه قسمتی از ژن هسته ای ۱۸S rDNA که چیزی با استفاده از آغازگرهای های ۳'_AACCTGGTTGATCCTGCCAGT (Sa۵') و ۱۸'_GATCCTTCTGCAGGTTACCTAC_۳ (Sb ۵') بود (۱۵). هر واکنش زنجیره ای پلیمرز 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 پلیمرز ۵ میکرولیتر ۱۰x، 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 بدنال آن در یک سیکل ۳۸ تایی که شامل

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.

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

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 زگیل‌هایی (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 کلاسد Panpulmonata و در خانواده ی Onchidiidae قرار گرفته است . در این پژوهش گونه ایرانی مورد آنالیز مولکولی قرار گرفت ، توالی بای بی 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 کلاسد را

واسرشتگی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه ، اتصال آغازگرها 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 آخر 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 آمده از تعیین توالی محصولات با استفاده از بسته های نرم افزاری مورد آنالیزهای فیلوژنتیکی قرار گرفت



تصویر شماره ۱: منطقه نمونه برداری، منطقه نموبرداری 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 ClustalXY.۰ (۱۱) هم ردیف گردیدند. ماتریس داده های هم ردیف سازی شده برای هر دو قطعه مورد نظر DNA مورد نظر به کمک نرم افزار ۵ 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

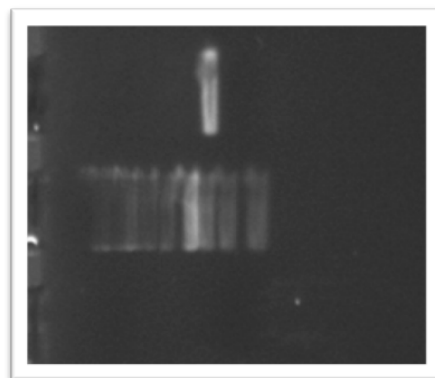
۲_ زگیل های سبز خاکستری روی سطح بدن ، ب : سطح شکمی _ معیار سنجش ۱ سانتی متر میباشد .

بحث

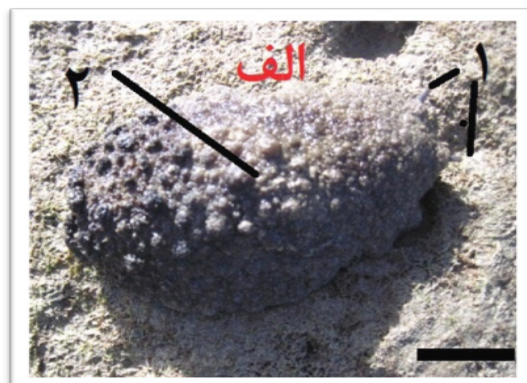
مطالعه حاضر روابط فیلوژنتیکی بین ۱۵ گونه از Opistho-branchia و Pulmonata که بیشترین شباهت را در توالی نوکلئوتیدها داشتند بر اساس توالی ژنومی ۱۸S rDNA را فراهم میکند . تا به امروز با تمام مطالعاتی که در زمینه تاریخ تکاملی Opisthobranchia صورت گرفته است ، اما هنوز هم روابط فیلوژنتیکی بین افراد این گروه بخوبی درک نشده است (۳،۲۲) . همانطور که گفته شد تمامی گونه های استفاده شده در این پژوهش جز کلاسد Heterobranchia میباشد این کلاسد 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 کلاسد Heterobranchia قرار گرفته اند در رده بندی های قبل تر در کلادهای دیگری از شکم پایان قرار داشته اند و همچنین برخی کلادهایی 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 Heterostropha 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 Pulmonata و Opisthobranchia میباشد (۸) .

Jörger et al در سال ۲۰۱۰ دو کلاسد اصلی Panpulmonata و Euopisthobranchia را در Heterobranchia معرفی کردند که هردو این کلاسد در گروه Euthyneura قرار دارند (۱۱) . Euthyneura یکی از تاکسون های راسی شکم پایان است شامل تاکسون هایی است که همگی آنها درپوش آبشویی 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 پارافیلیتیک با Opisthobranchia chia معرفی شد (۴،۱۸،۱۹) . گونه مورد مطالعه در کلاسد Pan-

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

pulmonata قرار گرفته است که همانطور که در تصویر شماره ۴ میتوان مشاهده کرد کلاکد Panpulmonata با کلاکدهای دیگر در حالت منوفایلیتیک قرار گرفته است. گونه ی ایرانی با ۱۰۰ درصد boot strap در حالت منوفایلیتیک و با گونه Pero-*Peronia nia cf. peronii* در حالت خواهری قرار گرفته است. 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 کلاکد panpulmonata میباشد و یک کلاکد منوفایلیتیک است، گونه ی ایرانی و دیگر گونه های که در این کلاکد قرار دارند همگی جز خانواده On-chidiidae میباشدند و از نظر ریخت شناسی بسیار بهم نزدیک میباشدند. 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 میباشدند. 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 کلاکد در درخت فیلوژنی ترسیم شده بیشترین طول شاخه و بیشترین واگرایی نسبت به بقیه گونه های دو کلاکد دیگر را از آن خود کرده اند. کلاکد Euopisthobranchia یک کلاکد منوفایلیتیک است، یعنی همه ی اعضای این کلاکد یک نیای مشترک دارند. که گونه های این کلاکد جز خانواده Aplysiidae میباشدند 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 کلاکد 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، کاملاً 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 کلاکد مجزا یک کلاکد منوفایلیتیک است (۱۳). اولین مطالعات فیلوژنتیکی کلاکد Aplysia توسط Fiorito et al در سال ۱۹۹۰ (۵)، Rinaldi و Ohir در سال ۱۹۹۸ انجام گرفت (۱۸). کلاکد سه، کلاکد panpulmonata، یک کلاکد منوفایلیتیک است و با ۹۳ درصد boot strap حمایت میشود. در کلاکد سه، Acochliidae یک کلاکد 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). کلاکد یک و سه هردو گونه های کلاکد Panpulmonata میباشدند اما چون خانواده ها و زیر کلاکدهای متفاوتی داشته اند در دو کلاکد 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.

- (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, Lecomte 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, Opisthobranchia). *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 alignment 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, Gibson TJ. (1998). Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends . Biochem. Sci.* 1998, 23:403-405
- (11) Jörger K M, Stöger I, Kano, Fukuda H, Kneibelsberger 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 evolving 18 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) Thollessen M. Phylogenetic analysis of Euthyneura (Gastropoda) by means of the 16S rRNA gene. *Proc R Soc Lond, Series B*, 83-75 : 266 ; 1999 .
- (23) Thollessen 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 18s and 16s rRNA gene sequences . *J. Molluscan Stud.*, 125-113 : (2) 71 ; 2005