

## فیلوژنی مولکولی Vetigastropoda براساس ژن‌های میتوکندریایی COI و ۱۶S rRNA

- **منا ایزدیان\***: گروه تنوع زیستی و ایمنی زیستی، پژوهشکده محیط‌زیست و توسعه پایدار، سازمان حفاظت محیط‌زیست
- **حسین ذوالقرنین**: گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر
- **سیدمحمدباقر نبوی**: گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر
- **آریا اشجع اردلان**: گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، صندوق پستی: ۱۸۱-۱۹۷۳۵
- **سیامک یوسفی سیاه‌کلودی**: گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی ورامین، ایران

تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۹۶

### چکیده

در این پژوهش روابط فیلوژنی بین گونه‌های کلاد Vetigastropoda در آب‌های ساحلی خلیج فارس مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور از ژن‌های میتوکندریایی COI و ۱۶S rRNA استفاده شد. نمونه‌برداری در سال‌های ۱۳۹۲ و ۱۳۹۳ در سواحل صخره‌ای شمال خلیج فارس انجام گرفت و نمونه‌ها مورد شناسایی مورفولوژیک قرار گرفتند. سپس مراحل استخراج DNA، تکثیر قطعه ژنی زیر واحد I سیتوکروم اکسیداز (COI) و ۱۶S rRNA و توالی‌یابی انجام شد. در مجموع تعداد ۹ توالی COI و ۵ توالی ۱۶S rRNA متعلق به ۵ گونه از این کلاد به دست آمد که این توالی‌ها برای اولین بار از منطقه شمالی خلیج فارس گزارش شده‌است. آنالیزهای فیلوژنی با استفاده از نرم‌افزارهای PAUP، MEGA6، BEAST و با رسم درخت‌های فیلوژنی Maximum Likelihood، Maximum Parsimony و Bayesian صورت گرفت. نتایج نشان داد کلاد Vetigastropoda که از نظر رده‌بندی سنتی خانواده‌های Trochidae، Chilodontidae، Turbinidae و Fissurellidae از این مطالعه را، شامل می‌شود، مونوفیلیک نمی‌باشد. به این ترتیب که گونه‌های متعلق به خانواده‌های Trochidae و Chilodontidae در یک کلاد مجزا از گونه‌های متعلق به دو خانواده Turbinidae و Fissurellidae قرار گرفتند. این مطلب نشان دهنده رابطه غیرخواه‌ری میان این دو گروه بوده که بیانگر تفاوت بین دیدگاه رده‌بندی سنتی و رده‌بندی مولکولی است.

**کلمات کلیدی:** Vetigastropoda، COI، ۱۶S rRNA، فیلوژنی، سواحل صخره‌ای، خلیج فارس



## مقدمه

استفاده نمود. بیش از ۷۰ گونه Vetigastropod متعلق به ۱۳ خانواده و ۲۵ زیرخانواده، یک کلاد عظیم تشکیل دادند که در مقابل آن‌ها دو کلاد برون گونه Neomphalina و Cocculinoidea قرار داشتند. خانواده Seguenziidae که از نظر فیلوژنتیکی بسیار بحث برانگیز است، به عنوان یک کلاد مشتق شده از Vetigastropoda ظاهر شد و به همراه Adeumophalus، Ventsia و Xyloskenea از Trochidها، یک کلاد حمایت شده را تشکیل دادند. Layton و همکاران (۲۰۱۴) با جمع-آوری ۲۴۷۱ نرم تن دریایی کانادا و با استفاده از DNA بارکدینگ، مطالعاتی بر روی الگوی‌های مختلف ژنتیکی ۲۲۷ گونه انجام دادند. آن‌ها نشان دادند که استفاده از توالی COI ابزاری مفید، برای شناسایی نرم تنان کانادا و نیز برای آشکار کردن چشم‌اندازی بر موقعیت‌های احتمالی گونه‌های مختلف است. واگرایی عمیق درون گونه‌ای در برخی گونه‌ها، جدایی جغرافیایی را بین اجداد آن‌ها در سواحل اقیانوس‌های اطلس، منجمد شمالی و آرام نشان داد که می‌تواند به علت عصر یخبندان در پلیستوسن در بخشی از جمعیت آن‌ها رخ داده باشد. در این مطالعه سعی شد تا حد امکان از توالی‌یابی ژن 16S rRNA جهت حصول اطمینان بیشتر بهره برده شود. این مطالعه هم‌چنین رابطه بین محتوی GC و واگرایی توالی را بین گونه‌های متجانس مشخص کرد.

## مواد و روش‌ها

**نمونه‌برداری:** طی سال‌های ۹۲ و ۹۳ نمونه‌برداری از بسترهای صخره‌ای سواحل شمالی خلیج فارس در زمان حداکثر جزر انجام گرفت. مشخصات ایستگاه‌های نمونه‌برداری در جدول ۱ آورده شده است. نمونه‌ها در اتانول ۹۸ درصد فیکس شد و به آزمایشگاه انتقال یافتند. موقعیت ایستگاه‌های نمونه‌برداری در شکل ۱ نشان داده شده است.

**شناسایی مورفولوژیک:** جهت شناسایی مورفولوژیک نمونه‌ها از کلیدهای شناسایی شامل: Sea Shells of Eastern Arabia (Bosch و همکاران، ۱۹۹۵)، Sea Shore of Kuwait Persian Gulf (Jones، ۱۹۸۶)، Encyclopedia of Marine Gastropods (Robin، ۲۰۰۸) و اطلس نرم تنان خلیج فارس (حسین‌زاده‌صحافی و همکاران، ۱۳۷۹) استفاده شد.

**مطالعات مولکولی:** پس از شناسایی مورفولوژیک نمونه‌ها، استخراج DNA از دو نمونه از هر گونه شناسایی شده، انجام شد. استخراج DNA با استفاده از پودر Chelex و پروتئیناز K صورت گرفت. تکثیر قطعه ژنی COI و 16S rRNA پس از ارزیابی کمی و کیفی DNA استخراج شده به وسیله الکتروفورز و اسپکتروفوتومتر، انجام گرفت. پرایمر مورد استفاده در تکثیر قطعه ژنی COI، پرایمر جهانی Folmer (۱۹۹۴) و پرایمر مورد استفاده جهت تکثیر ژن 16S rRNA پرایمر Palumbi (۱۹۹۱) بود که مشخصات آن‌ها در جدول ۲ آمده است.

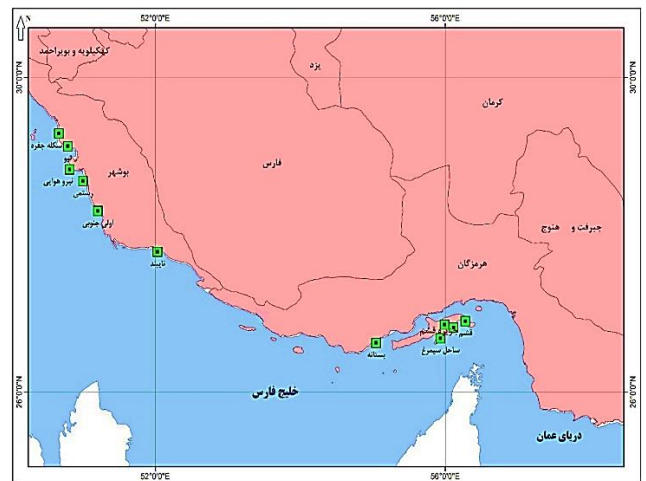
تعیین روابط بین گونه‌ای از زمان لینه با مقایسه ویژگی‌های مورفولوژیک صورت می‌گرفته است. اگرچه تاکسونومی هم‌چنان بر پایه ویژگی‌های مورفولوژیک بنا شده است، اما اطلاعات روبه‌گسترش مولکولی مانند توالی‌یابی نوکلئوتیدی به آشکار کردن روابط فیلوژنی می‌پردازد. در بین زیست‌شناسان استفاده از داده‌های مولکولی جهت ترسیم درخت‌های فیلوژنی اهمیت قابل توجهی پیدا کرده است و مقایسه نشانگرهای مولکولی در بین جانداران گوناگون می‌تواند رابطه فیلوژنی (اجدادی) آن‌ها را آشکار کند (Lemey و همکاران، ۲۰۰۹). از آنجایی که چنین داده‌هایی (در مقایسه با داده‌هایی مانند داده‌های ریخت‌شناسی) کم‌تر تحت تأثیر نتایج انتخاب قرار می‌گیرند، بهتر می‌توانند روابط فیلوژنتیکی واقعی را بازتاب دهند (Maddison، ۱۹۹۷). در بین ۱۳ ژن کدکننده پروتئین در ژنوم میتوکندریایی، زیرواحد یک ژن سیتوکروم اکسیداز محبوبیت ویژه‌ای برای برآورد روابط میان تاکسون‌های نزدیک به هم یافته است. با وجود کاربرد وسیع COI در تعیین قرابت در سطوح پایین تاکسونومیک، تا حدی برای تعیین روابط عمیق‌تر فیلوژنتیک نیز از آن بهره برده شده است. علاوه بر اثبات مفید بودن استفاده از این ژن در مطالعه نرم تنان گوناگون، دلایلی بر قابلیت توالی COI در دریافت واگرایی‌های عمیق‌تر نیز مشاهده شده است (Hebert و Elpidio، ۲۰۰۳). با وجود این تقریباً در تمامی مطالعات فیلوژنی همواره از توالی‌یابی و بررسی ژن دیگری در کنار COI استفاده می‌شود تا نتایج حاصل محکم‌تر و قابل استناد باشد. در بسیاری از این مطالعات این ژن جانبی (Mitochondrial 16S ribosomal RNA) mt16S rRNA می‌باشد (Castro و Quintero-Galvis، ۲۰۱۳؛ Strong و Bouchet، ۲۰۱۳؛ Frey و Vermeij، ۲۰۰۸؛ Donald و همکاران، ۲۰۰۵؛ Collin، ۲۰۰۳؛ Medina و همکاران، ۱۹۹۹). Donald و همکاران (۲۰۰۵) بر روی کلادوزن برخی از گونه‌های خانواده Trochidae در نتیجه حوادث جغرافیایی در جنوب اقیانوس آرام مطالعاتی انجام دادند. آن‌ها در این مطالعه از دو قطعه ژنی میتوکندریایی COI و 16S و یک ژن هسته‌ای actin برای تخمین فیلوژنی برخی از اعضای جنس‌های Diloma، Melagraphia و Austrocochlea استفاده کردند. مطالعات فیلوژنی آن‌ها نشان داد که با وجود حوادث جغرافیایی غیرمحمتمل در این منطقه، در طول تاریخ تکامل این گروه در چندین موقعیت انتشار بالغین توسط جریان‌ات اقیانوسی رخ داده که منتج به پراکنش وسیع امروزی آن‌ها گشته است. Kano (۲۰۰۸) فیلوژنی Vetigastropod را با استفاده از روش BI و ML بررسی نمود. او در این مطالعه با تکیه بر نمونه-برداری وسیع تاکسونومیک، از آنالیزهای مجزا و ترکیبی یک ژن میتوکندریایی COI و دو ژن هسته‌ای هیستون H3 و 18S rRNA

جدول ۱: نام و مشخصات ایستگاه‌های نمونه‌برداری

ردیف	نام ایستگاه	شهر	استان	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی
۱	نیروهوایی	بوشهر	بوشهر	۸۰°۵۰'۶۶"	۹۳°۲۸'۵۵"
۲	اسکله جفره	بوشهر	بوشهر	۸۲°۵۰'۴۴"	۹۷°۲۸'۳۷"
۳	تیو	بوشهر	بوشهر	۸۲°۵۰'۵۸"	۹۸°۲۸'۱۳"
۴	بندر رستمی	تنگستان	بوشهر	۵۱°۰۰'۸۱"	۵۶°۲۸'۶۶"
۵	اولی جنوبی	دیر	بوشهر	۹۰°۵۱'۱۴"	۸۳°۲۷'۳۳"
۶	نایبند	عسلویه	بوشهر	۶۷°۵۳'۴۱"	۴۲°۲۷'۰۲"
۷	بستانه	بندر لنگه	هرمزگان	۹۹°۵۲'۳۸"	۱۲°۲۷'۴۱"
۸	ساحل سیمرغ	قشم	هرمزگان	۱۶°۵۶'۳۷"	۵۴°۲۶'۱۳"
۹	قشم	قشم	هرمزگان	۲۶°۵۶'۹۸"	۹۳°۲۶'۴۶"

جهت تهیه محلول PCR، از یک میکرولیتر (۱۰ نانوگرم) DNA استخراجی، یک میکرولیتر از هر یک از پرایمرها (۱۰ پیکومول)، ۰/۵ میکرولیتر dNTP (۱۰ میلی مولار)، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq پلیمرز (۵۰/μ)، ۲/۵ میکرولیتر بافر (۱۰X) PCR و یک میکرولیتر MgCl<sub>2</sub> (۵۰ میلی مولار) استفاده شد که در نهایت حجم آن با آب مقطر به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد (McPherson و Møller، ۲۰۰۶). برنامه تکثیر قطعات ژنی در جدول ۳ آمده است. در مواردی که نمونه‌ها از کیفیت مناسبی برخوردار نبودند، از روش و مواد دیگری در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز استفاده شد. به‌طور مثال از BSA، که در تکثیر ژن‌های نرم‌تنان کاربرد دارد، برای رفع عمل محدودکننده‌ها استفاده شد. محصول PCR مورد خالص‌سازی قرار گرفت و جهت توالی‌یابی ارسال شد.

**ثبت توالی‌ها در پایگاه داده‌ها:** به این منظور ابتدا توالی‌ها در سایت NCBI، BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) شد و با توجه به میزان فاصله ژنتیکی از توالی‌های نزدیک به آن‌ها و همچنین رسم درخت در این سایت، اقدام به ثبت نمونه‌ها گردید. در ابتدا قالب خواندن (Fram) توالی‌های به‌دست آمده، توسط نرم‌افزار CLC Sequence Viewer v6.5.4 (Knudsen و همکاران، ۲۰۱۲) (www.clcbio.com) تعیین شد. سپس از طریق سایت DDBJ توالی‌ها در پایگاه داده NCBI ثبت گردید. در مجموع ۹ توالی COI و ۵ توالی ۱۶S خوانا و قابل تحلیل به‌دست آمد که این توالی‌ها برای نخستین بار از منطقه خلیج فارس گزارش شده است. مراحل ثبت توالی‌های COI در بانک ژن جهانی به پایان رسیده که شماره دسترسی (Accession number) آن‌ها در سایت www.ncbi.nih.gov در جدول ۴ قابل مشاهده است.



شکل ۱: موقعیت ایستگاه‌های نمونه‌برداری

جدول ۲: نام و توالی پرایمرهای مورد استفاده

منابع	Nucleotide Sequence (5' to 3')	Primer Name (F/R)
(Folmer, ۱۹۹۴)	TGTAAAACGACGGCCAGTGGTCAACAATCATAAAGATATTGG CAGGAAACAGCTATGACTAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	LCO1490_t1 HCO2198_t1
(Palumbi, ۱۹۹۱)	CGCCTGTTTAACAAAAACAT CCGGTCTGAACTCAGATCACGT	۱۶Sar ۱۶Sbr

جدول ۳: برنامه دمایی زنجیره‌ای واکنش‌های پلیمرز به‌کار رفته در تکثیر قطعات ژنی

مراحل	درجه حرارت °C	زمان	تعداد چرخه (سیکل)
واسرشته‌سازی اولیه	۹۴	۲ دقیقه	۱
واسرشته‌سازی (Denaturation)	۹۴	۳۰ ثانیه	
اتصال (Annealing)	۴۵	۳۰ ثانیه	۴۰
بسط (Extention)	۷۲	۱ دقیقه	
بسط نهایی	۷۲	۴ دقیقه	۱



جدول ۴: شماره دسترسی توالی‌های ثبت شده در NCBI

ردیف	ژن	اسم ثبت شده	Accession Number
۱	COI	<i>Diodora sp. SMBN</i>	AB976640.1
۲	COI	<i>Monodonta sp. ME</i>	AB976638.1
۳	COI	<i>Osilinus kotschy</i>	LC029914.1
۴	COI	<i>Lunella coronata</i>	LC154936
۵	COI	<i>Priotrochus kotschy</i>	LC154939
۶	COI	<i>Trochus sp. M114</i>	LC167490
۷	COI	<i>Lunella coronata</i>	LC167493
۸	COI	<i>Priotrochus kotschy</i>	LC167811
۹	COI	<i>Euchelus asper</i>	LC167814

## رسم درخت فیلوژنی: کلیه توالی‌ها در فرمت FASTA، جهت

استفاده در نرم‌افزار MEGA6 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Tamura و همکاران، ۲۰۱۱) و در فرمت Nexus، جهت استفاده در نرم‌افزارهای BEAST (Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees) (Drummond و همکاران، ۲۰۱۲) و PAUP (Swofford، ۲۰۰۳) مرتب شدند. جهت هم‌ردیف کردن (Alignment) توالی‌ها از نرم‌افزارهای Clustal W (Thompson و همکاران، ۱۹۹۴) و AliView (Larsson، ۲۰۱۴) استفاده شد. پس از هم‌ردیفی توسط نرم‌افزار توالی‌ها به‌صورت چشمی مجدداً هم‌ردیف شدند. به‌علت کم بودن تعداد indelها در قطعه ژنی COI ردیف کردن می‌تواند توسط چشم نیز انجام شود (Haase و Zielske، ۲۰۱۵). آنالیز فیلوژنی با استفاده از روش‌های بیشینه صرفه‌جویی (Maximum Parsimony)، بیشینه احتمال (Maximum Likelihood) و Bayesian انجام شد. پیش از انجام آنالیزهای MP، ML و BI، با استفاده از برنامه MrModeltest v2.3 (Nylander، ۲۰۰۴) و براساس معیار اطلاعاتی (Akaike Information Criterion) AICc و مدل‌های مناسب برای داده‌های مورد نظر، انتخاب شدند (Nylander، ۲۰۰۴). طبق این آزمون مدل GTR+I+G (Rodriguez و همکاران، ۱۹۹۰) برای داده‌های این پژوهش انتخاب شد. آنالیز MP برای داده‌ها به‌همراه توالی‌های مرجع با استفاده از نرم‌افزار PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony) (Swofford، ۲۰۰۳) انجام گرفت. این نرم‌افزار که نرم‌افزاری تخصصی برای رسم درخت‌های MP است، پرکاربردترین بسته نرم‌افزاری برای رسم درخت‌های تکاملی می‌باشد (Swofford، ۲۰۰۳). برای انجام آنالیزها از الگوریتم مبادله شاخه به شاخه روش دونیمه‌سازی درخت و اتصال مجدد (TBR=Tree-Bisection-Reconnection) و روش جستجوی اکتشافی (heuristic search) استفاده شد که به‌صورت تصادفی ۱۰۰ توالی اضافی را نیز بررسی می‌کند. کلادهای MP با ۱۰۰۰ تکرار

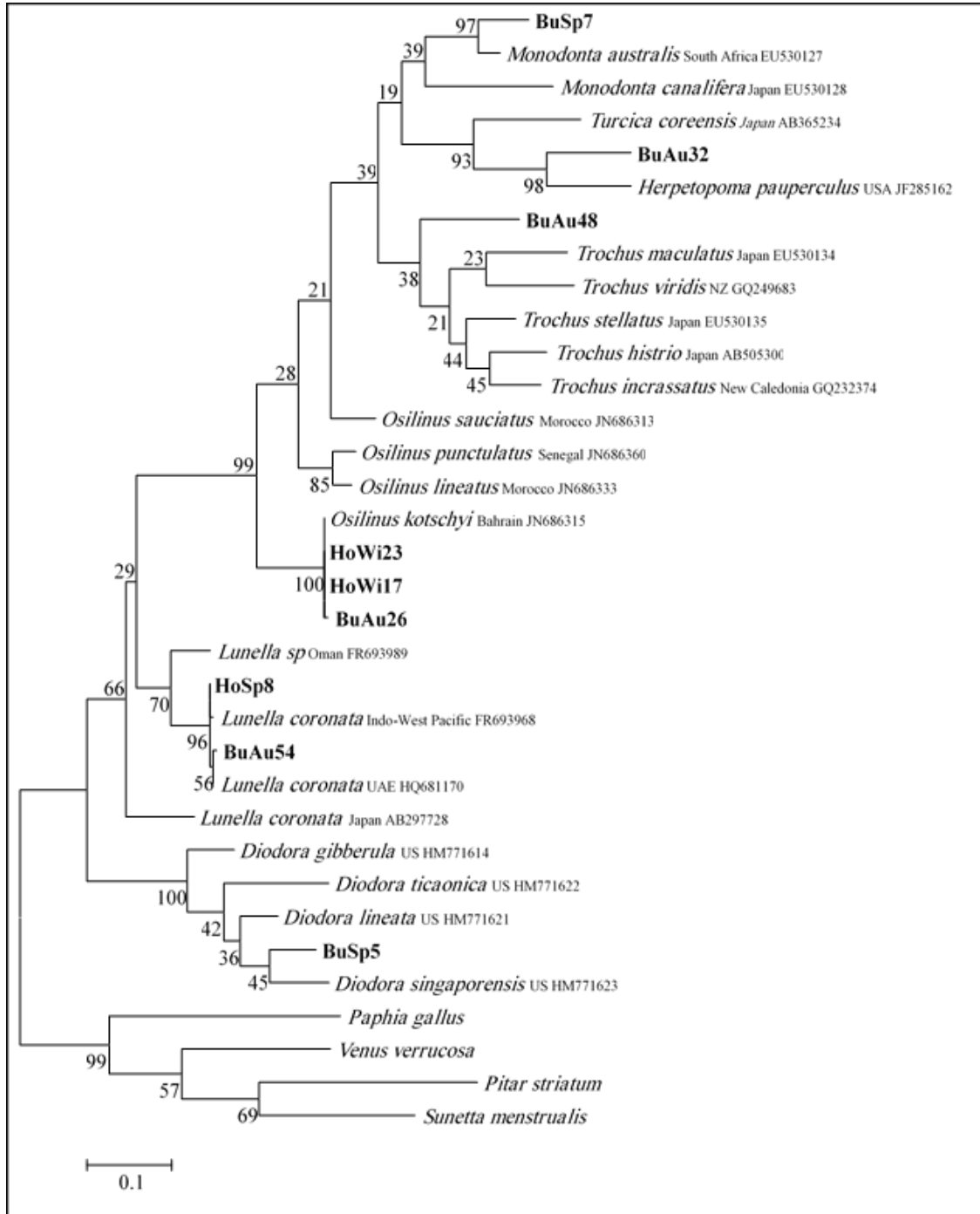
بوت استرپ بررسی شدند. آنالیز ML برای توالی‌های به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار MEGA6 (Tamura و همکاران، ۲۰۱۱) و تکرار بوت استرپ ۱۰۰۰ انجام شد. به این معنی که ۱۰۰۰ مرتبه درخت فیلوژنی رسم و حدود اطمینان کلادها بررسی می‌گردد. از نرم‌افزار BEAST v1.8.2 (Drummond و همکاران، ۲۰۱۲) برای تخمین زمان جدیدترین نیای مشترک (Time to the Most Recent Common Ancestor=TMRC) برای گره‌های مورد نظر در درخت‌های فیلوژنی استفاده شد. این نرم‌افزار هم‌چنین آنالیز Bayesian MCMC را انجام می‌دهد و قادر است رسم درخت و تعیین زمان واگرایی را به‌طور هم‌زمان انجام دهد که مزیت این نرم‌افزار نسبت به نرم‌افزار MrBayes (Huelsenbeck و Ronquist، ۲۰۰۳) می‌باشد (Sotelo و همکاران، ۲۰۰۹). جهت تنظیم ساعت مولکولی، پس از بررسی منابع موجود، از نرخ جایگزینی (Substitutional Rates) ۰/۳۵ تا ۱/۲ درصد در میلیون سال در این آنالیزها استفاده شد (Donald و همکاران، ۲۰۰۵). آنالیز برای ۳۰ میلیون نسل اجرا و در هر ۱۰۰۰ مرحله نمونه‌گیری انجام شد.

## نتیجه

پس از شناسایی مورفولوژیک، مشخص شد که نمونه‌ها متعلق به پنج گونه *Lunella*، *Euchelus asper*، *Trochus sp.2*، *Trochus sp.1*، *coronata* و *Diodora funiculata* هستند. نمونه‌های HoSp8 و BuAu54 به‌عنوان گونه *Lunella coronata*، نمونه‌های HoWi17 و HoWi23 و BuAu26 به‌عنوان جنس *Trochus sp.1*، نمونه‌های BuSp7 و BuAu32 به‌عنوان گونه *Euchelus asper*، نمونه BuAu48 به‌عنوان جنس *Trochus sp.2* و نمونه BuSp5 به‌عنوان جنس *Diodora funiculata* شناسایی شدند. از نمونه‌های متعلق به این کلاد ۹ توالی COI به‌دست آمد. درخت فیلوژنی رسم شده از این توالی‌ها نشان داد که نمونه BuSp7 بیش‌ترین شباهت را با گونه *Monodonta australis* دارد (ارزش بوت‌استرپ ۹۷=ML، ۱۰۰=MP و احتمال پسین ۱)، ولی کاملاً با آن منطبق نیست. نمونه BuAu32 نیز بیش‌ترین شباهت را با گونه *Herpetopoma pauperculus* داشت، اما اختلاف زیادی بین آن‌ها مشاهده شد (ارزش بوت‌استرپ ۹۸=ML، ۱۰۰=MP و احتمال پسین ۱). نمونه BuAu48 درحالی‌که بیش‌ترین شباهت را با گونه‌های مختلف از جنس *Trochus* نشان داد، با هیچ‌یک از آن‌ها گروه مونوفیلیتیک تشکیل نداد. نمونه BuAu26 که متعلق به استان بوشهر بود با دو نمونه دیگر که از استان هرمزگان جمع‌آوری شده بود، مقدار جزئی اختلاف نشان داد (ارزش بوت‌استرپ ۱۰۰=ML، ۱۰۰=MP و احتمال پسین ۱). در عین حال مقداری تفاوت بین این دو نمونه که از استان‌های بوشهر و هرمزگان جمع‌آوری شده بودند، مشاهده شد.

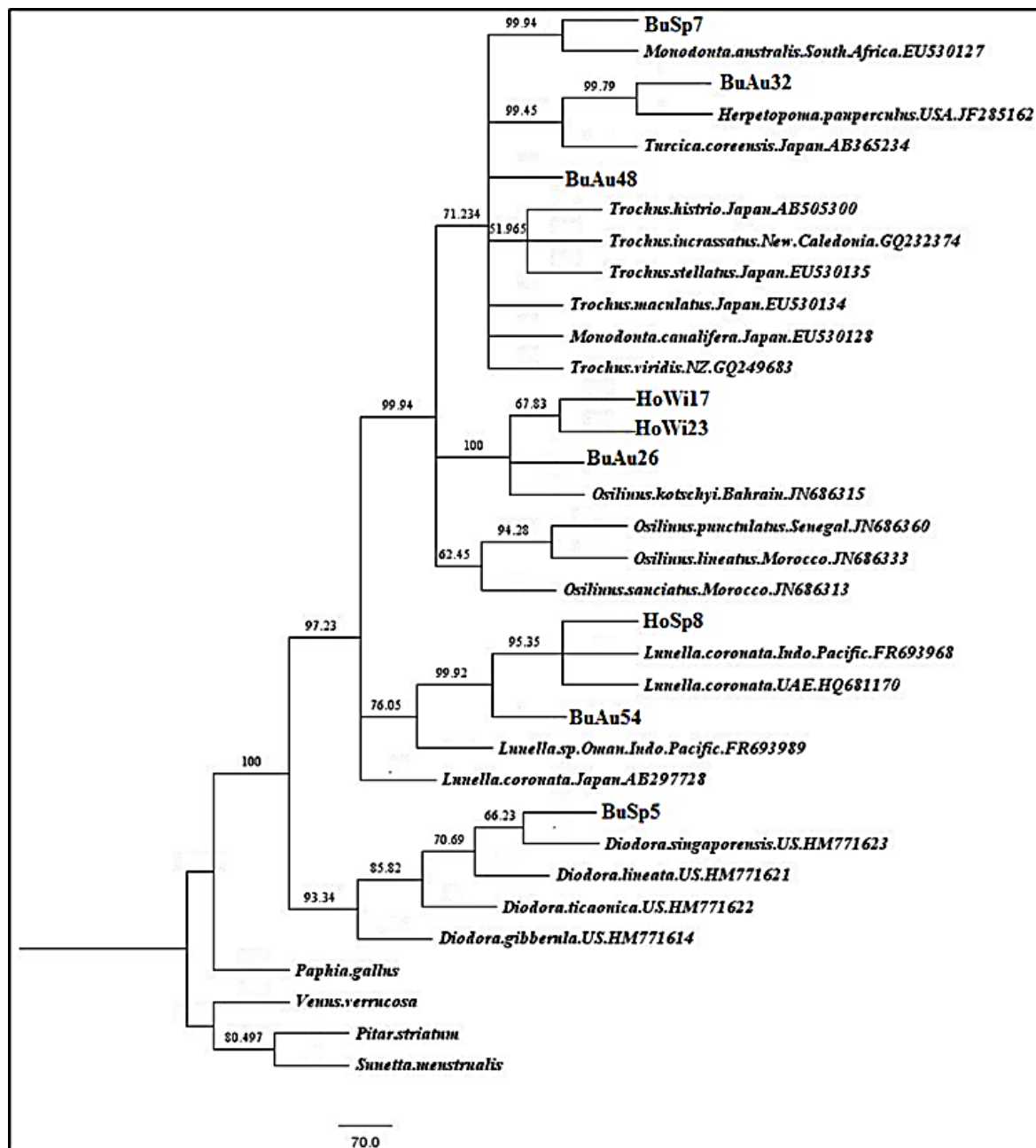
درخت‌های رسم شده برای این کلاد در شکل‌های ۲، ۳ و ۴ نمایش داده شده است.

نمونه BuSp5 با گونه‌های مختلف جنس *Diodora* یک کلاد مجزا تشکیل داد (ارزش بوت استرپ = ۱۰۰، ML = ۹۴، MP = ۹۴ و احتمال پسین (۱) و بیش‌ترین شباهت را با گونه *Diodora singaporensis* نشان داد.



شکل ۲: درخت ML رسم شده با توالی قطعه ژنی COI برای کلاد Vetigastropod



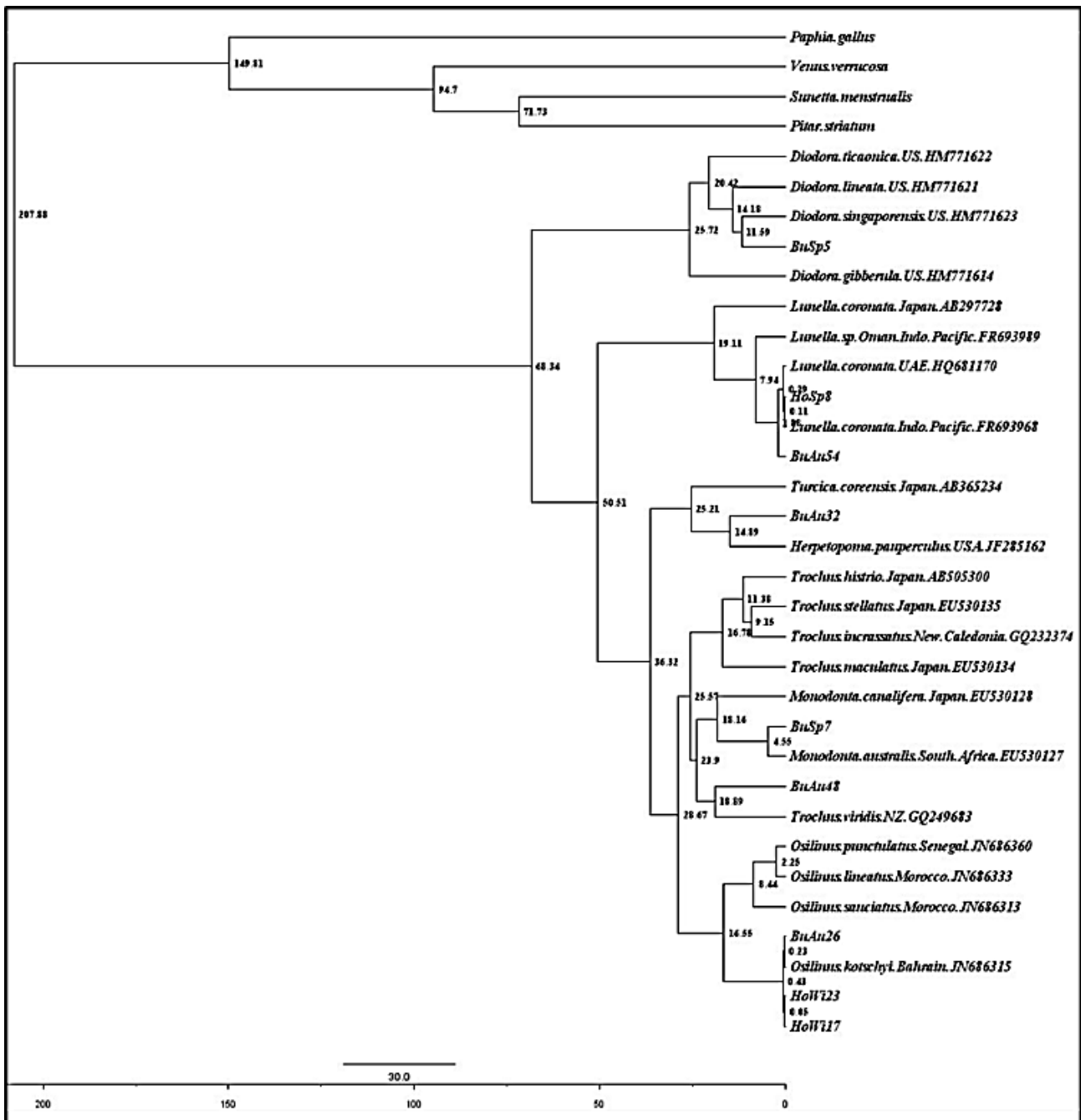


شکل ۳: درخت MP رسم شده با توالی قطعه ژنی COI برای کلاسد Vetigastropod

است. زمان واگرایی کلاسد *Diodora* به ۲۵/۷۲ میلیون سال پیش بازمی‌گردد و ۱۹/۱۱ میلیون سال پیش زمان اشتقاق در کلاسد *Lunella* است. به‌همین ترتیب زمان برآورد شده برای ریشه درخت ۲۰۷ میلیون سال پیش می‌باشد (شکل ۴).

با استفاده از نرم‌افزار BEAST قدمت نزدیک‌ترین نیای مشترک گونه‌های مورد بررسی در کلاسد Vetigastropoda، ۶۸/۳۴۲۸ میلیون سال پیش تخمین زده شد. زمان انشعاب دو خانواده Chilodontidae و Trochidae، ۳۶/۳۲ میلیون سال پیش برآورد شد و نیای مشترک خانواده Trochidae در حدود ۲۸/۶۷ میلیون سال پیش می‌زیسته



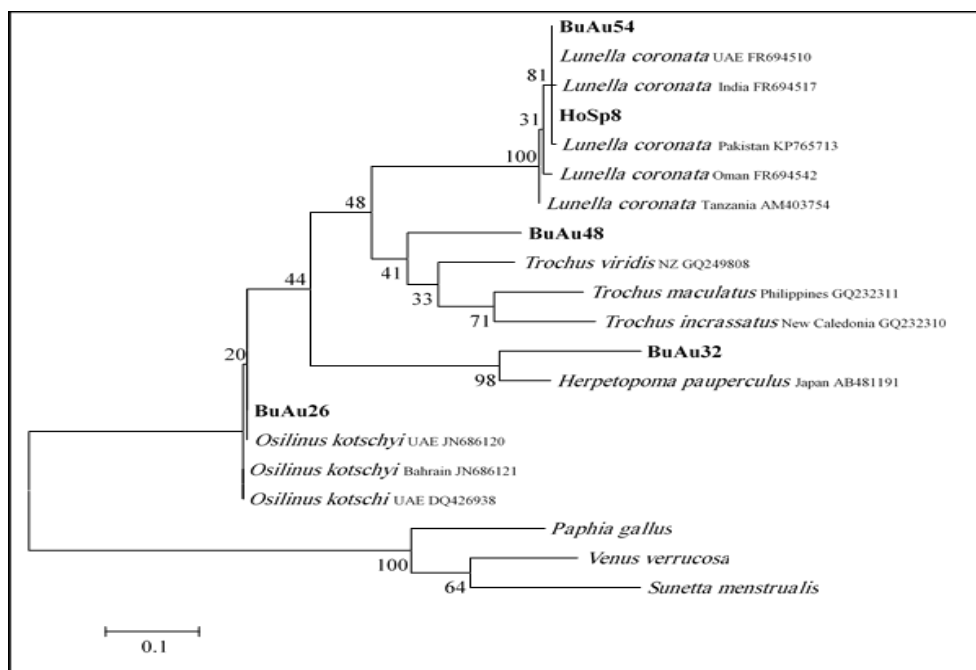


شکل ۴: درخت BI رسم شده با توالی قطعه ژنی COI برای کلاس Vetigastropod

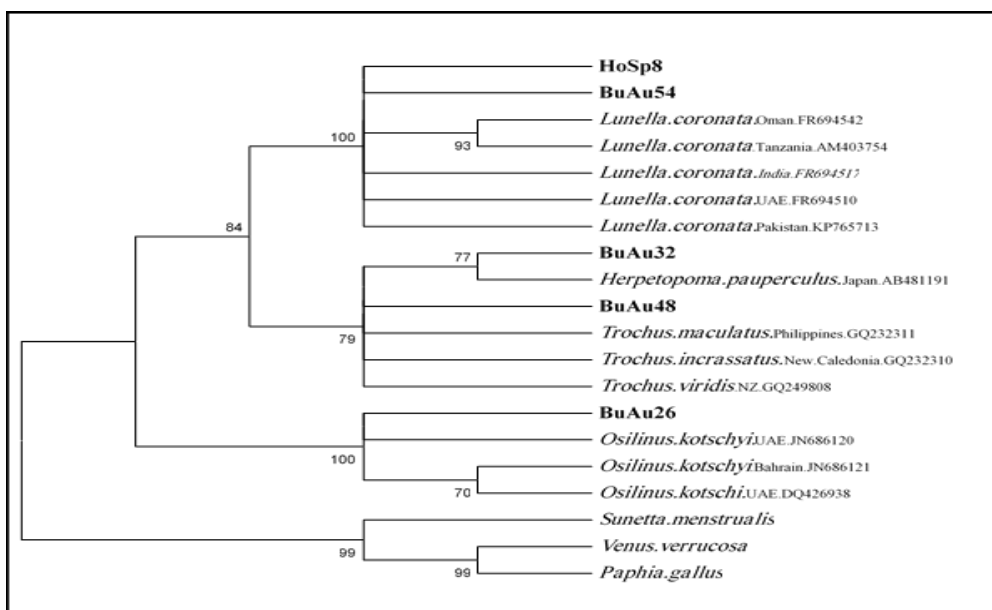
تفاوت زیادی با همه آن‌ها نشان داد. توالی rRNA ۱۶S نمونه BuAu26 نیز همانند توالی COI تطابق زیادی با چند توالی از گونه *Osilinus kotchyi* نشان داد. نمونه‌های HoSp8 و BuAu54 در بررسی توالی rRNA ۱۶S همانند توالی COI کاملاً با گونه *Lunella coronata* مطابق بودند. درخت‌های رسم شده برای این کلاس در شکل‌های ۵ و ۶ نمایش داده شده است.

از این کلاس ۵ توالی rRNA ۱۶S به دست آمد. نتایج حاصل از بررسی ژن rRNA ۱۶S نمونه BuAu32 را با گونه *Herpetopoma pauperculus* دارای نیای مشترک نشان داد (ارزش بوت استرپ  $ML=98$ ،  $MP=100$ ). برای ژن rRNA ۱۶S نیز هیچ توالی از گونه *Euchelus asper* در بانک وجود نداشت. در بررسی ژن rRNA ۱۶S نیز مانند COI نمونه BuAu48 با گونه‌های مختلف *Trochus* در یک کلاس قرار گرفت، ولی





شکل ۵: درخت ML رسم شده با توالی قطعه ژنی rRNA ۱۶S برای کلاس Vetigastropod



شکل ۶: درخت MP رسم شده با توالی قطعه ژنی rRNA ۱۶S برای کلاس Vetigastropod

## بحث

به این ترتیب که نمونه‌های HoWi17، HoWi23 و BuAu26 که در مطالعات مورفولوژیک تنها تا حد جنس، *Trochus*، شناسایی شدند، در بررسی مولکولی تا حد گونه مورد شناسایی قرار گرفتند، به طوری که با داشتن تطابق کامل با توالی گونه *Osilinus kotchyi* از بحرین به عنوان این گونه معرفی می‌شوند. این تطابق با ارزش بوت استرپ و

در بررسی مولکولی نمونه‌های متعلق به کلاس Vetigastropod، به علت تنوع بالای گونه‌ها و هم‌چنین شباهت ظاهری بسیار زیاد آن‌ها، در برخی موارد تفاوت‌هایی با مطالعات مورفولوژیک دیده شد که نشان دهنده راهگشایی این روش‌ها در مورد گونه‌هایی با شباهت بالا می‌باشد.



احتمال پسین بالا حمایت می‌شود (شکل‌های ۲، ۳ و ۴). تفاوت اندک در نمونه متعلق به استان بوشهر با دو نمونه استان هرمزگان به علت فاصله جغرافیایی طبیعی می‌نماید. اختلاف در اسامی عنوان شده در مطالعات مورفولوژیک و مولکولی به علت شباهت بسیار زیاد اعضاء این خانواده و هم‌چنین تغییر اسامی می‌باشد. در این مورد کمک شایانی که بررسی‌های مولکولی به شناسایی گونه‌ها می‌کنند کاملاً آشکار است و به علت تطابق زیاد نمونه‌ها با گونه *Osilinus kotchyi*، از دو کشور بحرین و امارات متحده عربی، حمایت بسیار بالای بوت‌استرپ و احتمال پسین و یکسان بودن نتایج هر دو نشانگر COI و S ۱۶rRNA در هر سه نوع درخت رسم شده، جای شبهه‌ای باقی نمی‌ماند. در مورد دو نمونه BuAu54 و HoSp8 مطالعات مورفولوژیک و مولکولی، نتایج یکسان داشت و این نمونه‌ها با توالی‌های گونه *Lunella coronata* از کشور امارات و منطقه اقیانوسی هند و آرام مطابقت داشت. تفاوت اندک بین این دو نمونه به علت تفاوت در محل‌های نمونه‌برداری که متعلق به دو استان متفاوت بودند، می‌باشد. در این مورد توالی‌های استخراج شده از بانک ژن برای نشانگر ۱۶S rRNA موارد دیگری را نیز آشکار ساخت. به این ترتیب که برای این نشانگر و این گونه، توالی‌هایی از کشورهای هند، پاکستان، عمان و تانزانیا در بانک ژن وجود داشت که از آن‌ها برای مقایسه و بررسی خاستگاه این گونه استفاده شد. نتایج نشان داد که گونه *L. coronata* از ایران به همراه توالی‌های این گونه از کشورهای امارات متحده عربی، پاکستان و هند، با مقداری تفاوت از توالی‌های این گونه از کشورهای عمان و تانزانیا، در یک کلاد قرار گرفتند و نشان داده شد که منشاء این گونه در ایران از جمعیت این گونه در سواحل شرقی اقیانوس هند یعنی کشورهای هند و پاکستان می‌باشد. این نتایج با ارزش بوت‌استرپ و احتمال پسین بالا حمایت می‌شود (شکل‌های ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶).

از سوی دیگر، بررسی‌های مولکولی در مورد نمونه‌های BuSp7 و BuAu32، که مطالعات مورفولوژیک بیان می‌کرد که هر دو آن‌ها متعلق به گونه *Euchelus asper* می‌باشند، تفاوتی میان آن‌ها نشان داد. از آن جایی که هیچ توالی حتی از جنس *Euchelus* برای هیچ‌یک از دو نشانگر مورد استفاده در این مطالعه، در بانک ژن وجود نداشت، از گونه‌های نزدیک دیگر برای مقایسه و رسم درخت استفاده شد که هیچ‌یک از آن‌ها با این دو نمونه منطبق نبود. علاوه بر این موقعیت این دو نمونه بر روی درخت فیلوژنی تفاوت فاحشی بین آن‌ها، که از نظر مورفولوژیک شباهت بسیاری داشتند، نشان داد. به طوری که نمونه BuSp7 با گونه‌های مختلف جنس *Monodonta* متعلق به خانواده Trochidae در یک کلاد مجزا از نمونه BuAu32 قرار گرفت. از آن جایی که نمونه BuSp7 با هیچ‌یک از گونه‌های این جنس تطابق کافی نداشت، تنها می‌توان این احتمال را متصور شد که این موقعیت می‌تواند نشان

دهنده تعلق این نمونه به جنس *Monodonta* باشد. از سوی دیگر نمونه BuAu32 با اعضای خانواده Chilodontidae در یک کلاد قرار گرفت که نشان‌دهنده تفاوت فاحش بیان این دو نمونه به ظاهر مشابه می‌باشد (شکل‌های ۲، ۳ و ۴). مطالعات مورفولوژیک، نمونه BuAu48 را با توجه به این که تنها یک نمونه کوچک از این مورد در کل مراحل نمونه‌برداری یافت شد، تنها تا حد جنس *Trochus* شناسایی کرده بود. با وجود آن که مطالعات مولکولی نیز نتوانست شناسایی آن را روشن‌تر سازد، در عین حال شباهت آن را با اعضاء این جنس تأیید کرد و احتمال پدید آمدن گونه‌ای جدید از این جنس را نیز مطرح ساخت. هیچ توالی از گونه *Diodora funiculata* که بررسی مورفولوژیک، نمونه BuSp5 را متعلق به آن دانسته بود، در بانک ژن وجود نداشت و نتیجتاً درخت فیلوژنی رسم شده تنها توانست قرار گرفتن این نمونه با گونه‌های مختلف این جنس در یک کلاد مجزا را تأیید نماید (شکل‌های ۲، ۳ و ۴). به علت تنوع و در عین حال شباهت زیاد اعضاء این کلاد، انجام مطالعات بیش‌تر برای شناسایی دقیق‌تر آن‌ها ضروری به نظر می‌رسد. مطالعات گذشته اثبات کرده است که نمی‌توان تنها با اکتفا به یک قطعه ژنی، محدوده گونه‌ها را کاملاً مشخص کرد و دو قطعه ژنی میتوکندریایی COI و ۱۶S rRNA در کنار یکدیگر نشانگرهای قابلی جهت تفکیک گونه‌ای شکم‌پایان هستند (Quintero-Galvis و Castro، ۲۰۱۳؛ Strong و Bouchet، ۲۰۱۳؛ Frey و Vermeij، ۲۰۰۸؛ Donald و همکاران، ۲۰۰۵؛ Collin، ۲۰۰۳؛ Medina و همکاران، ۱۹۹۹). در مطالعه حاضر نیز هر دو قطعه میتوکندریایی در شناسایی شکم‌پایان تا سطح گونه کارآمد عمل کردند و در پاره‌ای موارد که ابهاماتی باقی ماند به علت کافی نبودن اطلاعات و توالی‌های مناسب در بانک ژن، جهت مقایسه و بررسی بیش‌تر بود. در این پژوهش سه نوع درخت MI، MP و BI برای همه نمونه‌ها رسم شد و آنالیزهای مولکولی در همه موارد نتایج یکسانی نشان داد. هم‌چنین در مورد تمامی گونه‌ها نتایج مشابهی از بررسی نشانگرهای COI و ۱۶S rRNA حاصل شد و تفاوتی در توپولوژی درخت‌های فیلوژنی رسم شده و نیز نتایجی که از تفسیر آن‌ها استنباط شد، مشاهده نشد. بالا بودن شاخص‌های حمایتی گره‌های پایه در آنالیزهای انجام شده، اثباتی بر آن است که قطعه ژنی COI، نشانگری مطلوب برای ارزیابی و حل فرضیه‌های تکاملی می‌باشد (Frey و Vermeij، ۲۰۰۸؛ Remigio و Hebert، ۲۰۰۳). آنالیزهای حاصل از نرم‌افزار BEAST نشان داد که نیای مشترک کلاد Vetigastropoda در اوایل دوره زمین شناسی پالئوسن (Paleocen) می‌زیسته است. در گزارش‌های پیشین نیز این کلاد به عنوان کلاد حاوی گونه‌های اجدادی مطرح شده است (Remigio و Hebert، ۲۰۰۳). در مطالعه حاضر نیز با استفاده از آنالیز Bayesian عمر تقریبی این کلاد در حدود ۶۸ میلیون سال پیش



- cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. Vol. 3, pp: 294-299.
۸. Frey, M. and Vermeij, G.J., 2008. Molecular phylogenies and historical biogeography of a circumtropical group of gastropods: implications for regional diversity patterns in the marine tropics. *Mol. Phyl. Evol.* Vol. 48, pp: 1067-1086.
  ۹. Geiger, D.L. and Thacker, C.R., 2005. Molecular phylogeny of Vetigastropoda reveals non-monophyletic Scissurellidae, Trochoidea, and Fissurelloidea. *Moll Res.* Vol. 25, pp: 47-55.
  ۱۰. Haase, M. and Zieske, S., 2015. Molecular phylogeny and a modified approach of character-based barcoding refining the taxonomy of New Caledonian freshwater gastropods. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. Vol. 89, pp: 171-181.
  ۱۱. Jones, D.A., 1986. A field guide to the sea shores of Kuwait and the Persian Gulf. University of Kuwait Blandford Press, Poole, Kuwait. 192 p.
  ۱۲. Kano, Y., 2008. Vetigastropod phylogeny and a new concept of Seguenzioidea: independent evolution of copulatory organs in the deep-sea habitats. *Zoologica Scripta*. Vol. 37, pp: 1-21.
  ۱۳. Knudsen, B.; Knudsen, T.; Flensburg, M.; Sandmann, H.; Heltzen, M.; Andersen, A.; Dickenson, M.; Bardram, J.; Steffensen, P.J.; Mønsted, S.; Lauritzen, T.; Forsberg, R.; Thanbichler, A.; Bendtsen, J.D.; Görlitz, L.; Rasmussen, J.; Tordrup, D.; Værum, M.; Ravn, M.N.; Hachenberg, C.; Fisker, E.; Dekker, P.; de Meza, J.; Hein, A.M.K.; Sinding, J.B.; Quorning, J.; Hvam, K.; Mikkelsen, S.; Liboriussen, P.; Grydholm, J.; Handberg, H.; Bundgaard, M.; Joecker, A.; Simonsen, M.; Nielsen, P.R.L.; Joecker, A.; Fleischer, P.; Jakobsen, J.; Juul, S.; Appelt, U.; Fejes, A. and Christensen, A.S., 2012. CLC sequence viewer, 6.7.1. CLCbio.
  ۱۴. Larsson, A., 2014. AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets, *Bioinformatics*. Vol. 30, No. 22, pp: 3276-3278.
  ۱۵. Layton, K.; Martel, A.L. and Hebert, P.D.N., 2014. Patterns of DNA Barcode Variation in Canadian Marine Molluscs. *PLoS One*. Vol. 9, No. 4, pp: 1-9.
  ۱۶. Lemey, P.; Salemi, M. and Vandamme, A.M., 2009. The Phylogenetic Handbook a Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing. Cambridge University Press. Second Edition. 750 p.
  ۱۷. Maddison, W.P., 1997. Gene Trees in Species Trees. *Systematic Biology*. Vol. 46, No. 3, pp: 523-536.
  ۱۸. McPherson, M.J. and Møller, S.G., 2006. PCR. Second Edition. Taylor & Francis Group. Second edition. 292 p.
  ۱۹. Medina, M.; Weil, E. and Szmant, A.M., 1999. Examination of the *Montastraea annularis* species complex using ITS and COI sequences. *Mar Biotechnol*. Vol. 1, pp: 89-97.
  ۲۰. Nylander, J.A.A., 2004. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, Sweden.
  ۲۱. Palumbi, S.R.; Martin, A.; Romano, S.; McMillan, W.O.; Stice, L. and Grabowski, G., 1991. The Simple Fool's Guide to PCR, Version 2.0. Privately published, Univ. Hawaii.
  ۲۲. Quintero-Galvis, J. and Castro, L.R., 2013. Molecular phylogeny of the Neritidae (Gastropoda: Neritimorpha) based on the mitochondrial genes cytochrome oxidase I and 16S rRNA. *Acta Biol. Colomb.* Vol. 18, pp: 307-318.
  ۲۳. Remigio, E.A. and Hebert, P.D.N., 2003. Testing the utility of partial COI sequences for phylogenetic estimates of gastropod relationships. *Mol. Phylogent. Evol.* Vol. 29, pp: 641-647.
  ۲۴. Robin, A., 2008. Encyclopedia of Marine Gastropods, Ed. IKAN Unterwasser Archive, ConchBooks. 480 p.
  ۲۵. Rodríguez, F.; Oliver, J.F.; Marín, A. and Medina, J.R., 1990. The general stochastic model of nucleotide substitution. *J Theor Biol.* Vol. 142, pp: 485-501.
  ۲۶. Ronquist, F. and Huelsenbeck, J.P., 2003. MRBAYES3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*. Vol. 19, pp: 1572-1574.
  ۲۷. Sotelo, G.; Morán, P. and Posada, D., 2009. Molecular phylogeny and biogeographic history of the European Maja spider crabs (Decapoda, Majidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. Doi:10.1016/j.ympev. 2009.05.009.
  ۲۸. Strong, E.E. and Bouchet, P., 2013. Cryptic yet colorful: anatomy and relationships of a new genus of Cerithiidae (Caenogastropoda, Cerithioidea) from coral reef drop-offs. *Invertebrate Biology*. Vol. 132, No. 4, pp: 326-351.
  ۲۹. Swofford, D.L., 2003. PAUP. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
  ۳۰. Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M. and Kumar, S., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*. Vol. 28, pp: 2731-2739.
  ۳۱. Thompson, J.D.; Higgins, D.G. and Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* Vol. 22, pp: 4673-4680.
- به دست آمد که از قدیمی ترین کلادهای شکم‌پایان خلیج فارس محسوب می‌شود. اما در درختی که برای تمامی نمونه‌های مختلف شکم‌پایان خلیج فارس با روش BI رسم شد، نتایج دیگری نیز حاصل شد که بسیار شایان توجه می‌باشد. در این درخت مشخص شد که کلاد Vetigastropoda که از نظر رده‌بندی سنتی خانواده‌های Trochidae، Chilodontidae و Turbinidae و Fissurellidae از این مطالعه را شامل می‌شود، مونوفیلتیک نمی‌باشد. به این ترتیب که گونه‌های متعلق به خانواده‌های Trochidae و Chilodontidae در یک کلاد مجزا از گونه‌های متعلق به دو خانواده Turbinidae و Fissurellidae قرار گرفتند. این مطلب نشان‌دهنده رابطه غیرخواه‌ری میان این دو گروه بوده که نشان دهنده تفاوت بین دیدگاه رده‌بندی سنتی و رده‌بندی مولکولی است. Geiger و Thacker (۲۰۰۵) نیز که بر روی فیلوژنی مولکولی کلاد Vetigastropoda مطالعاتی انجام دادند، بیان داشتند که خانواده‌های Trochidae و Fissurellidae مونوفیلتیک نیستند که با نتایج مطالعه حاضر یکسان است. نکته دیگر در مورد این دو کلاد آن است که خانواده‌های Trochidae و Fissurellidae که در رده‌بندی سنتی متعلق به کلاد Vetigastropoda هستند با اعضاء کلاد Cycloneritimorpha نزدیک‌تر بوده و با آن‌ها دارای نیای مشترک می‌باشند. در این پژوهش دو نوع درخت ML، MP و BI برای نمونه‌ها رسم شد و آنالیزهای مولکولی نتایج یکسانی نشان داد. هم‌چنین در مورد تمامی گونه‌ها نتایج مشابهی از بررسی نشانگرهای COI و ۱۶S rRNA حاصل شد و تفاوتی در توپولوژی درخت‌های فیلوژنی رسم شده و نیز نتایجی که از تفسیر آن‌ها استنباط شد، مشاهده نشد. بالا بودن شاخص‌های حمایتی گره‌های پایه در آنالیزهای انجام شده، اثباتی بر آن است که قطعه ژنی COI، نشانگری مطلوب برای ارزیابی و حل فرضیه‌های تکاملی می‌باشد (Frey و Vermeij، ۲۰۰۸؛ Remigio و Hebert، ۲۰۰۳).

## منابع

۱. حسین‌زاده‌صحافی، ه.؛ دقوئی، ب. و رامشی، ح.، ۱۳۷۹. اطلس نرم‌تنان خلیج فارس. موسسه
۲. Bosch, D.; Dance, S.P.; Moolenbeek, R. and Oliver, P.G., 1995. Seashells of Eastern Arabia Motivate Publishing. pp: 24-186.
۳. Collin, R., 2003. Phylogenetic relationships among calyptraeid gastropods and their implications for the biogeography of speciation. *Systematic Biology*. Vol. 52, No. 5, pp: 618-640.
۴. Donald, K.M.; Kennedy, M. and Spencer, G.S., 2005. Cladogenesis as the result of long-distance rafting events in South Pacific Topshells (Gastropoda, Trochidae). *Evolution*. Vol. 59, No. 8, pp: 1701-1711.
۵. Drummond, A.J.; Suchard, M.A.; Xie, D. and Rambaut, A., 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*. Vol. 29, pp: 1969-1973.
۶. Elpidio, A.R. and Hebert, P.D.N., 2003. Testing the utility of partial COI sequences for phylogenetic estimates of gastropod relationships. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. Vol. 29, pp: 641-647.
۷. Folmer, O.; Black, M.; Hoeh, W.; Lutz, R. and Vrijenhoek, R., 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial