شناسایی مولکولی اویستر جنس *Saccostrea* در سواحل شمالی خلیج فارس با استفاده از ژن COI میتوکندری

- **علی فخری**: گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران
- **سیدمحمدباقر نبوی***: گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران
- **سیدجواد حسینی**: گروه شیلات و بیولوژی دریا، پژوهشکده خلیج فارس، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران
- **حسین ذوالقرنین**: گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران
- **بیتا ارچنگی**: گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۹۸

چکیده

اویسترهای صخره‌ای به‌طور وسیعی در سراسر دنیا گسترده شده‌اند، با وجود این تاکنون شناسایی و طبقه‌بندی آن‌ها به‌دلیل تغییرپذیری زیاد ریخت‌شناسی پوسته که متکی به ریخت‌شناسی موجودات است، مشکل می‌باشد و در اکثر موارد با خطا همراه است. برخلاف رده‌بندی که متکی به ریخت‌شناسی موجودات می‌باشد، روش‌های مولکولی می‌تواند به شناسایی و طبقه‌بندی گونه‌هایی که از نظر ریختی دارای ساختارهای مشابه می‌باشند کمک کند. در این تحقیق تعداد ۱۵ نمونه اویستر صخره‌ای غالب، از مناطق جزر و مدی شمال خلیج فارس به‌منظور شناسایی مولکولی جمع‌آوری شدند. شناسایی براساس ریخت‌شناسی تا حد جنس (*Saccostrea*) تعیین گردید. استخراج DNA از بافت ماهیچه با استفاده از روش CTAB انجام گرفت. توالی نوکلئوتیدهای زیر واحد ۱ ژن سیتوکروم اکسیداز (COI) بررسی شد. توالی‌های نمونه‌های مورد مطالعه با توالی ۱۶ گونه دیگر موجود در بانک ژن از طریق ترسیم درخت فیلوژنی مقایسه شد. بررسی فیلوژنی از طریق آنالیز Neibour joining نشان داد نمونه‌های بررسی شده، گونه خواهری *S. mordax* ماداگاسکار در اقیانوس هند است و با *S. mordax* دیگر مناطق در دو کلاد جدا قرار گرفته‌اند. با توجه به نتایج این پژوهش، می‌توان گفت براساس توالی‌یابی ژن COI، گونه مذکور احتمالاً *Saccostrea mordax* می‌باشد که در این صورت برای اولین بار در این منطقه گزارش شده است.

کلمات کلیدی: فیلوژنی مولکولی، اویستر صخره‌ای، خلیج فارس، سیتوکروم اکسیداز (COI)

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: nabavishiba@yahoo.com

(DOI): 10.22034/aej.2020.120937

مقدمه

اویسترها در سراسر جهان به‌عنوان گونه شیلاتی و اقتصادی حایز اهمیت هستند. آن‌ها از نظر اکولوژیکی نیز مهم می‌باشند و نقش حیاتی در فرایندهای اکولوژیکی سواحل بازی می‌کنند. اکوسیستم‌هایی که با کاهش جمعیت اویسترها مواجه شده‌اند ممکن است اثرات منفی مانند کاهش کیفیت آب و کاهش تنوع زیستی را تجربه کنند (Dumbauld و همکاران، ۲۰۱۱؛ Quayle، ۱۹۸۸). آن‌ها به این دلیل که بستر متراکم و وسیعی را تشکیل می‌دهند، زیستگاه گسترده‌ای برای انواع موجودات به‌وجود می‌آورند. هم‌چنین در کاهش پدیده غنی‌شدگی نقش دارند (Kemp و همکاران، ۲۰۰۵). علاوه بر این اویسترها به‌دلیل توانایی‌شان در تجمع آلاینده‌های مختلف از محیط‌های دریایی، به عنوان پایشگرهای زیستی مطالعه می‌شوند (سرمدیان، ۱۳۹۳؛ میرزا، ۱۳۹۴؛ میرزا، ۱۳۹۲). اویسترهای واقعی (True oysters) (خانواده Ostreidae) شامل حدود ۷۵ گونه هستند که در امتداد سواحل سراسر دنیا به استثنای قطب جنوب و برخی جزایر اقیانوسی گسترش یافته‌اند (Humber، ۲۰۱۰). ۱۵ گونه از این خانواده در اقیانوس هند و منطقه هند و آرام شناسایی شده است (Huber، ۲۰۱۰؛ WoRMS http://www.marinespecies.org). اویسترها در آب‌های خلیج فارس نیز حضور دارند. رضایی‌مارنانی و همکاران (۱۳۷۴) گونه *Saccostrea cucullata* را غالب‌ترین و با ارزش‌ترین گونه اویستر خوراکی بسترهای صخره‌ای سواحل و جزایر استان هرمزگان معرفی کرده و بیان کردند این گونه از پراکنش وسیعی در سطح آب‌های ساحلی خلیج فارس برخوردار می‌باشد. یوسفی‌سیاه‌کلرودی و همکاران (۱۳۸۴) به بررسی مولکولی جمعیت‌های آن در سواحل شمالی خلیج‌فارس و دریای‌عمان با استفاده از روش RAPD پرداختند. در استان خوزستان نیز گونه‌ای با نام *Crassostrea gigas* گزارش شد که بعد با مطالعات مولکولی نام آن به *Crassostrea* sp. تغییر یافت (سرمدیان، ۱۳۹۳). بسیاری از رده‌بندی‌های اویسترها تاکنون براساس ویژگی‌های پوسته بوده، اما به‌دلیل حساسیت آن‌ها به عوامل زیست محیطی و هم‌چنین طبیعت تغییرپذیر پوسته، شناسایی مورفولوژیکی اویسترهای صخره‌ای مشکل می‌باشد. اثر محیط بر مرفولوژی پوسته اویستر می‌تواند متفاوت باشد (Seilacher و همکاران، ۱۹۸۵) و این امر منجر به بسیاری اشتباهات و سردرگمی‌ها در رده‌بندی اویسترها می‌شود (Wang و Guo، ۲۰۰۸). این مشکل در جنس *Saccostrea* به‌دلیل تغییرپذیری زیاد پوسته، حادتر بوده و طبقه‌بندی آن‌ها بسیار گیج‌کننده است (Lam و Morton، ۲۰۰۶). این سردرگمی تاکسونومی، مانعی جهت تحقیقات بیش‌تر در زمینه‌های دیگر از جمله حفاظت از اویسترها می‌باشد. برخلاف رده‌بندی مورفولوژیکی سنتی، روش‌های مولکولی می‌تواند به شناسایی گونه‌هایی که ویژگی‌های ریخت‌شناسی‌شان از بین رفته یا گمراه کننده هستند کمک کند (Schindel و Miller، ۲۰۰۵). این امر برای شناسایی گونه‌ها در گروه‌هایی (Taxa) با سطوح بالای انعطاف پذیری ریختی (Phenotypic plasticity) مانند اویسترها با ارزش می‌باشد. در واقع می‌توان گفت ابزارهای مولکولی در سال‌های اخیر به حل و فصل برخی سوالات در زمینه شناسایی و روابط رده‌بندی اویسترها کمک شایانی کرده است. به‌عنوان مثال بررسی و شناسایی گونه‌های اویستر با استفاده از آلوزایم توسط Banks و همکاران (۱۹۹۴) انجام پذیرفت، آنالیز فیلوژنی با استفاده از توالی DNA میتوکندریایی از جمعیت‌های *Saccostrea* در استرالیا، حداقل سه گونه مجزا را تشخیص داد (Lam و Morton، ۲۰۰۶). روش DNA بارکدینگ نیز جهت شناسایی و رده‌بندی گونه‌های اویستر توسط محققان دیگر نیز استفاده شده است (Liu و همکاران، ۲۰۱۱؛ Wang و Guo، ۲۰۰۸؛ Lam و Morton، ۲۰۰۶). شناسایی اویسترها از جنبه مدیریت و حفاظت از ذخایر و صنعت آبزی‌پروری حائز اهمیت می‌باشد. بنابراین براساس موارد ذکر شده این تحقیق با هدف شناسایی و تعیین جایگاه فیلوژنی مولکولی گونه غالب اویستر صخره‌ای در سواحل شمالی خلیج فارس با استفاده از ژن میتوکندریایی COI که ژنی متداول در شناسایی مولکولی جانوران است، انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

منطقه مورد مطالعه: تحقیق حاضر در منطقه شمال خلیج فارس صورت گرفت که با توجه به موقعیت سواحل به‌ترتیب از سواحل استان خوزستان تا جزیره قشم ایستگاه‌هایی برای نمونه‌برداری انتخاب گردید. مشخصات و موقعیت ایستگاه‌های نمونه‌برداری در جدول ۱ و شکل ۱ آورده شده است.

نمونه‌برداری و استخراج DNA: پس از مشخص کردن ایستگاه‌ها در زمان جزر کامل از منطقه بین جزر و مدی، نمونه‌ها توسط قلم و چکش از بستر سخت جداشده و در اتانول ۹۶ درصد تثبیت شد (Lavery و همکاران، ۲۰۰۴). نمونه‌ها جهت شناسایی ریخت‌شناسی و بررسی‌های مولکولی به آزمایشگاه پژوهشکده خلیج فارس منتقل شدند. شناسایی ریخت‌شناسی نمونه‌ها با استفاده از کلیدهای شناسایی شامل: Seashells of eastern Arabia (Bosch و همکاران، ۱۹۹۵) و اطلس نرم‌تنان خلیج فارس (حسین‌زاده‌صحافی و همکاران، ۱۳۷۹) انجام شد. استخراج DNA به‌روش بهینه شده CTAB (Porebski، ۱۹۹۷) از بافت ماهیچه‌ای صدف انجام شد. بدین‌منظور حدود ۵۰ میلی‌گرم از بافت ماهیچه صدف پس از آن‌که کاملاً خشک گردید به میکروتیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شد. سپس برای هضم بافت موردنظر بر روی آن ۶۳۰ میکرولیتر از بافر CTAB از پیش گرم شده (۶۵°C)، ۷۰ میکرولیتر SDS (سدیم دو دسیل سولفات) ۱۰ درصد افزوده شد و با قیچی استریل، بافت به قطعات کوچک خرد و سپس ۱۰ میکرولیتر پروتئیناز K ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اضافه گردید.

(DOI): 10.22034/aej.2020.120937

شکل ۱: موقعیت ایستگاه‌های نمونه‌برداری در شمال خلیج فارس

جدول ۱: نام و موقعیت جغرافیایی ایستگاه‌های نمونه‌برداری

ردیف	نام ایستگاه	شهر	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی
۱	اسکله ۱۴	بندرامام خمینی	۳۰° ۲۸' ۵۸"	۴۹° ۰۴' ۲۳"
۲	اسکله بحرکان	هندیجان	۳۰° ۰۶' ۳۵"	۴۹° ۴۶' ۱۸"
۳	اسکله مسافربری	خارک	۲۹° ۱۴' ۴۹/۷۳"	۵۰° ۱۹' ۴۶/۳۱"
۴	نفتکش	بوشهر	۲۹° ۴۸' ۵۰"	۵۰ °۱۷ '۵۱"
۵	حرای ملگنزه	بردخون	۲۷° ۵۰' ۵۲/۶۹"	۵۱° ۳۴' ۵۶/۹۳"
۶	اولی جنوبی	دیر	۲۷ ° ۸۳' ۳۳"	۵۱° ۹۰' ۱۴"
۷	نایبند	عسلویه	۲۷ °۲۴' ۰۲"	۵۲° ۶۷' ۴۱"
۸	اسکله صیادی	بستانه	۲۶° ۵۲' ۹۵"	۵۴° ۶۴' ۸۷"
۹	پارک زیتون	جزیره قشم	۲۵° ۵۵' ۲۸"	۵۶° ۱۶' ۰۴"

پس از هضم بافت به‌مدت یک شب، به هر میکروتیوپ مقدار ۲۴۰ میکرولیتر NaCl ۵ مولار افزوده شد و نمونه‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. سپس مقدار ۲۵۰ میکرولیتر کلروفرم به هر میکروتیوپ افزوده شد و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. به‌آرامی فاز بالایی جداو به تیوپ جدیدی انتقال داده شد. مقدار ۷۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول از پیش سردشده(۲۰°C-) به نمونه‌ها اضافه شد، میکروتیوب‌ها به‌وسیله دست به‌آرامی چندین مرتبه سر و ته شدند و در دور ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. DNA به‌صورت ته نشین سفید رنگی در میکروتیوپ شکل می‌گرفت. ایزوپروپانول دور ریخته شده و نمونه را با ۵۰۰ میکرولیتر الکل ۷۰ درجه شستشو داده به مدت ۵ دقیقه در دور ۸۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد و فاز رویی خالی شد. جهت خشک شدن و تبخیر الکل از ته نشست DNA، نمونه‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه در هوای اتاق قرار داده شدند. پس از خشک شدن برای محلول نمودن DNA، ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل افزوده شد. جهت تعیین کمیت DNA استخراج شده از دستگاه اسپکتروفتومتر و به‌منظور بررسی کیفیت DNA از الکتروفورز نمونه‌ها بر روی ژل آگارز استفاده شد. پس از آن واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام شد. در این مرحله، ناحیه‌ای از DNA میتوکندریایی به‌نام COI با استفاده از آغازگر طراحی‌شده توسط Folmer (۱۹۹۴) برای COI انتخاب و تکثیر شد. LCOI490- ۵' GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG3' و HCO2198- ۵' TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA3' جهت اطمینان از تکثیر قطعات مورد نظر، محصولات PCR با استفاده از ژل آگارز، الکترفورز شد. نواحی تکثیر شده جهت تعیین توالی به شرکت سینا کلون ارسال شد. برای انجام این تحقیق از واکنش PCR استاندارد با حجم ۲۵ میکرولیتر برای هر نمونه استفاده شد (Lavery و همکاران، ۲۰۰۴؛ Saiki و همکاران، ۱۹۸۸). برای هر نمونه، ۲/۵ میکرولیتر PCR Buffer 10X، ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ 50Mm، ۱ میکرولیتر dNTPs 10Mm، ۱ میکرولیتر از هریک از پرایمرها (با غلظت ۱۰ پیکومول)، ۰/۴ میکرولیتر Taq DNA polymeras، ۶ میکرولیتر از DNA که در نهایت حجم آن با ddH_2O به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. چرخه‌های واکنش PCR نیز طبق برنامه جدول ۲ انجام شد. جهت اطمینان از تکثیر قطعات مورد نظر, محصولات PCR با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد الکترفورز شدند. سپس نمونه‌ها جهت تعیین توالی به شرکت تکاپو زیست فرستاده شد.

تجزیه‌و تحلیل داده‌ها: ابتدا صحت توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار ChromasPro براساس کروماتوگرام هر توالی مورد بررسی، بازسازی و ذخیره‌قرار گرفت. جهت تعیین اختلاف میان توالی نمونه‌های توالی‌یابی شده از نرم‌افزار Clustal W (Thompson و همکاران، ۱۹۹۴) استفاده شد. توالی COI تعدادی از گونه‌های جنس *Saccostrea* (*S. mordax*، *S. cucullata* و *S. glomerata*) از بانک جهانی ژن استخراج شد (جدول ۳). مقایسه توالی‌های به‌دست آمده از گونه خلیج فارس با توالی‌های ثبت‌شده در بانک جهانی ژن انجام شد. درخت فیلوژنتیکی براساس روش Neibour joining با استفاده از نرم‌افزار MEGA ۷ (Kumar ، ۲۰۱۶) رسم شد. دو گونه از خانواده Gryphaeidae به‌عنوان برون گروه در نظر گرفته شد.

جدول۲: برنامه حرارتی برای انجام واکنش PCR

مراحل	درجه حرارت (سانتی‌گراد)	زمان (دقیقه)	تعداد چرخه (سیکل)
واسرشت‌سازی (Denaturation) اولیه	۹۴	۳	۱
واسرشت‌سازی	۹۴	۰/۵	
اتصال (Annealing)	۴۵	۰/۵	۴۰
بسط (Extention)	۷۲	۱	
بسط نهایی	۷۲	۵	۱

(DOI): 10.22034/aej.2020.120937

جدول ۳: گونه‌های مورد استفاده در آنالیز ژن CO1 به‌همراه شماره دسترسی

نام علمی	شماره دسترسی
Saccostrea mordax	NC013998
Saccostrea mordax	KP769562
Saccostrea mordax	HQ661025
Saccostrea mordax	*HQ661028*
Saccostrea mordax	*JQ027296*
Saccostrea mordax	*AB748841*
Saccostrea mordax	*EU816072*
Saccostrea cucullata	*LC110533*
Saccostrea cucullata	KU947218
Saccostrea cucullata	LC110526
Saccostrea cucullata	LC110615
Saccostrea cucullata	LC110579
Saccostrea glomerata	EU007483
Saccostrea palmula	KT317602
Neopycnodonte cochlear	AB076939
Hyotissa hyotis	GQ166583

نتایج

جهت شناسایی مرفولوژی، ابتدا گونه اویستر از سایرین جدا شده و براساس خصوصیات مورفولوژی طبق منابع گفته شده تا حد جنس به‌عنوان *Saccostrea* شناسایی شد. سپس نمونه‌های این گونه مورد بررسی مولکولی قرار گرفت. در مجموع ۱۵ توالی COI از گونه مورد نظر در ایستگاه‌های مختلف به‌دست آمد که در بانک ژنی ثبت شد (جدول ۴). این توالی‌ها با توالی این ژن از گونه‌های جنس *Saccostrea* (*S. mordax*، *S. cucullata* و *S. glomerata*) که از بانک جهانی ژن استخراج شد باهم مقایسه شدند. هم‌چنین از دو گونه متعلق به خانواده Gryphaeidae عنوان برون گروه استفاده شد. درخت فیلوژنی (شکل ۲) با ۱۰۰۰ تکرار توسط نرم‌افزار MEGA۷ رسم شد. از این توالی‌ها و توالی‌های ثبت شده پیشین با روش Neibour joining و مدل K2P نشان داد گونه مورد نظر در یک کلاد با گونه *S. mordax* قرار گرفته و با ۱۰۰ درصد حمایت Bootstrap، از کلاد دیگر (دیگر گونه‌های جنس *Saccostrea*) جدا است. هم‌چنین گونه خلیج فارس با ۹۷ درصد حمایت Bootstrap، گونه خواهری *S. mordax* موجود در ماداگاسکار است ولی با *S. mordax* های آب‌های چین در کلاد جدا قرار گرفته است. حداقل و حداکثر فاصله ژنتیکی محاسبه شده نمونه‌های این تحقیق در آب‌های خلیج فارس به‌ترتیب ۰/۲ ٪ و ۱/۴٪ می‌باشد که اختلاف قال توجهی نداشت (جدول ۵). هم‌چنین با مقایسه این نمونه‌ها با سایر نقاط، بیش‌ترین فاصله ژنتیکی با گونه *S. cucullata* به‌مقدار ۲۴/۴٪ و کم‌ترین فاصله ژنتیکی با گونه *S. mordax* به‌میزان ۳/۵٪ محاسبه شد (جدول ۶).

جدول ۴: نمونه‌های این تحقیق به‌همراه شماره دسترسی ثبت شده در بانک ژنی

نام علمی	شماره دسترسی
Saccostrea mordax	BBN51019
Saccostrea mordax	BBN51020
Saccostrea mordax	BBN51021
Saccostrea mordax	BBN51022
Saccostrea mordax	BBN51023
Saccostrea mordax	BBN51024
Saccostrea mordax	BBN51025
Saccostrea mordax	BBN51026
Saccostrea mordax	BBN51027
Saccostrea mordax	BBN51028
Saccostrea mordax	BBN51029
Saccostrea mordax	BBN51030
Saccostrea mordax	BBN51031

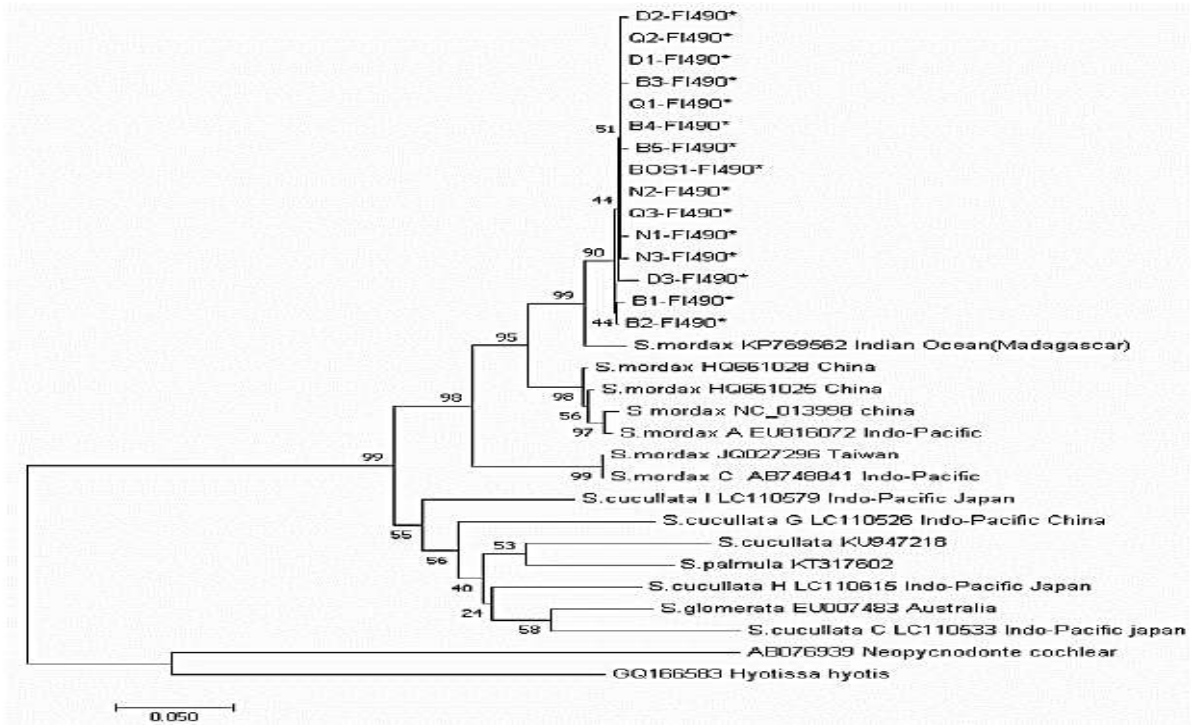
جدول ۵: میزان فاصله ژنتیکی محاسبه شده براساس مقیاس K2P ژن COI نمونه‌های این تحقیق در آب‌های خلیج فارس

	Species	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴
۱	B1-FI490														
۲	B2-FI490	۰٫۰۰۵													
۳	B4-FI490	۰٫۰۰۴	۰٫۰۰۵												
۴	B5-FI490	۰٫۰۰۷	۰٫۰۰۹	۰٫۰۰۴											
۵	B3-FI490	۰٫۰۰۷	۰٫۰۰۹	۰٫۰۰۴	۰٫۰۰۷										
۶	D1-FI490	۰٫۰۰۵	۰٫۰۰۷	۰٫۰۰۲	۰٫۰۰۵	۰٫۰۰۵									
۷	D2-FI490	۰٫۰۰۵	۰٫۰۰۷	۰٫۰۰۲	۰٫۰۰۵	۰٫۰۰۵	۰٫۰۰۴								
۸	D3-FI490	۰٫۰۱۳	۰٫۰۱۴	۰٫۰۰۹	۰٫۰۰۹	۰٫۰۱۳	۰٫۰۱۱	۰٫۰۱۱							
۹	N1-FI490	۰٫۰۰۵	۰٫۰۰۷	۰٫۰۰۲	۰٫۰۰۵	۰٫۰۰۵	۰٫۰۰۴	۰٫۰۰۴	۰٫۰۱۱						
۱۰	N2-FI490	۰٫۰۰۴	۰٫۰۰۵	۰٫۰۰۰	۰٫۰۰۴	۰٫۰۰۴	۰٫۰۰۲	۰٫۰۰۲	۰٫۰۰۹	۰٫۰۰۲					
۱۱	N3-FI490	۰٫۰۰۵	۰٫۰۰۷	۰٫۰۰۲	۰٫۰۰۵	۰٫۰۰۵	۰٫۰۰۴	۰٫۰۰۴	۰٫۰۱۱	۰٫۰۰۴	۰٫۰۰۲				
۱۲	BOS-FI490	۰٫۰۰۵	۰٫۰۰۷	۰٫۰۰۲	۰٫۰۰۵	۰٫۰۰۵	۰٫۰۰۴	۰٫۰۰۴	۰٫۰۱۱	۰٫۰۰۴	۰٫۰۰۲	۰٫۰۰۴			
۱۳	Q1-FI490	۰٫۰۰۵	۰٫۰۰۷	۰٫۰۰۲	۰٫۰۰۵	۰٫۰۰۵	۰٫۰۰۴	۰٫۰۰۴	۰٫۰۱۱	۰٫۰۰۴	۰٫۰۰۲	۰٫۰۰۴	۰٫۰۰۴		
۱۴	Q2-FI490	۰٫۰۰۵	۰٫۰۰۷	۰٫۰۰۲	۰٫۰۰۵	۰٫۰۰۵	۰٫۰۰۴	۰٫۰۰۴	۰٫۰۱۱	۰٫۰۰۴	۰٫۰۰۲	۰٫۰۰۴	۰٫۰۰۴	۰٫۰۰۴	
۱۵	Q3-FI490	۰٫۰۰۵	۰٫۰۰۷	۰٫۰۰۲	۰٫۰۰۵	۰٫۰۰۵	۰٫۰۰۴	۰٫۰۰۴	۰٫۰۱۱	۰٫۰۰۴	۰٫۰۰۲	۰٫۰۰۴	۰٫۰۰۴	۰٫۰۰۰	۰٫۰۰۴

(DOI): 10.22034/aej.2020.120937

جدول ۶: میزان فاصله ژنتیکی محاسبه شده بین گونه‌ای جنس *Saccostrea* براساس مقیاس K2P ژن COI

	Species	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵	۱۶
۱	Persian_Gulf																
۲	*Saccostrea mordax* NC013998	۰.۰۸۰															
۳	*Saccostrea mordax* KP769562	۰.۰۳۵	۰.۰۹۴														
۴	*Saccostrea mordax* HQ661025	۰.۰۶۹	۰.۰۱۶	۰.۰۷۵													
۵	*Saccostrea mordax* HQ661028	۰.۰۶۶	۰.۰۱۹	۰.۰۷۲	۰.۰۰۳												
۶	*Saccostrea mordax* JQ027296	۰.۱۲۲	۰.۱۰۵	۰.۱۲۱	۰.۱۰۶	۰.۱۰۲											
۷	*Saccostrea mordax* EU816072	۰.۰۷۶	۰.۰۱۰	۰.۰۸۶	۰.۰۱۳	۰.۰۱۶	۰.۱۰۹										
۸	*Saccostrea mordax* AB748841	۰.۱۲۲	۰.۱۰۵	۰.۱۲۱	۰.۱۰۶	۰.۱۰۲	۰.۰۰۰	۰.۱۰۹									
۹	*Saccostrea glomerata* EU007483	۰.۲۱۰	۰.۱۸۲	۰.۱۹۶	۰.۱۷۴	۰.۱۷۸	۰.۱۹۲	۰.۱۸۲	۰.۱۹۲								
۱۰	*Saccostrea cucullata* KU947218	۰.۲۴۴	۰.۲۱۸	۰.۲۱۹	۰.۲۱۴	۰.۲۱۰	۰.۲۰۱	۰.۲۱۸	۰.۲۰۱	۰.۲۰۴							
۱۱	*Saccostrea cucullata* LC110533	۰.۲۶۲	۰.۲۱۸	۰.۲۴۲	۰.۲۱۴	۰.۲۱۸	۰.۲۱۹	۰.۲۰۹	۰.۲۱۹	۰.۱۲۵	۰.۱۷۰						
۱۲	*Saccostrea cucullata* LC110526	۰.۲۰۶	۰.۲۱۴	۰.۲۰۹	۰.۲۰۵	۰.۲۰۹	۰.۲۳۶	۰.۲۱۴	۰.۲۳۶	۰.۱۸۵	۰.۱۸۷	۰.۱۵۵					
۱۳	*Saccostrea cucullata* LC110615	۰.۲۰۳	۰.۱۷۹	۰.۲۰۶	۰.۱۸۴	۰.۱۸۸	۰.۱۸۸	۰.۱۸۸	۰.۱۸۸	۰.۱۳۸	۰.۱۵۸	۰.۱۶۲	۰.۱۶۸				
۱۴	*Saccostrea cucullata* LC110579	۰.۱۸۳	۰.۱۳۷	۰.۱۵۹	۰.۱۳۴	۰.۱۳۸	۰.۱۶۶	۰.۱۳۷	۰.۱۶۶	۰.۱۶۷	۰.۱۶۸	۰.۲۰۶	۰.۱۶۸	۰.۱۸۸			
۱۵	*Saccostrea palmula* KT317602	۰.۲۲۸	۰.۱۷۸	۰.۲۲۳	۰.۱۷۴	۰.۱۷۸	۰.۱۹۶	۰.۱۷۸	۰.۱۹۶	۰.۱۵۰	۰.۱۴۲	۰.۱۷۶	۰.۱۸۹	۰.۱۶۳	۰.۱۴۶		
۱۶	*Neopycnodonte cochlear* AB076939	۰.۵۵۸	۰.۵۴۳	۰.۵۳۷	۰.۵۵۰	۰.۵۴۴	۰.۵۵۷	۰.۵۵۷	۰.۵۵۷	۰.۵۷۰	۰.۵۴۴	۰.۶۱۳	۰.۵۵۷	۰.۵۹۲	۰.۵۵۸	۰.۵۶۴	
۱۷	*Hyotissa_hyotis* GQ166583	۰.۴۹۴	۰.۵۲۷	۰.۵۰۲	۰.۵۴۲	۰.۵۳۵	۰.۴۷۵	۰.۵۳۴	۰.۴۷۵	۰.۵۴۰	۰.۵۱۳	۰.۴۸۱	۰.۴۸۶	۰.۵۱۲	۰.۴۹۵	۰.۵۱۳	۰.۴۲۸



شکل ۲: درخت فیلوژنی رسم شده براساس توالی قسمتی از ژن COI با استفاده از آنالیز NJ . گونه‌های خانواده Gryphaeidae به‌عنوان گروه بیرونی درنظر گرفته شد.

(کلاد مربوط به گونه خلیج فارس با علامت * مشخص شده است)

بحث

طبقه‌بندی اویسترها براساس ویژگی‌های پوسته به‌دلیل تغییرپذیر بودن پوسته، مشکل است (Seilacher و همکاران، ۱۹۸۵) و این امر منجر به اشتباهاتی در طبقه‌بندی آن‌ها می‌شود (Wang و Guo، ۲۰۰۸). این مشکل در جنس *Saccostrea* به‌دلیل تغییرپذیری زیاد پوسته، حادتر بوده و طبقه‌بندی آن‌ها بسیار گیج کننده است (Lam و Morton، ۲۰۰۶). اویسترهای صخره‌ای یکی از زیست‌مندان خلیج فارس است که وضعیت تاکسونومی آن‌ها به‌خوبی شناخته نشده است و شناسایی آن‌ها در این مناطق منحصراً براساس مورفولوژی پوسته بوده است. بر این اساس بیش‌تر منابع گونه غالب اویستر سواحل خلیج فارس را *Saccostrea cucullata* نام‌گذاری می‌کنند. هم‌چنین Bosch و همکاران (۱۹۹۵) حسین‌زاده‌صحافی و همکاران (۱۳۷۹) از *Saccostrea cucullata* به‌عنوان تنها گونه جنس *Saccostrea* در خلیج‌فارس نام‌برده‌اند. بررسی‌ها نشان داده با وجود استفاده گسترده از نام *Saccostrea cucullata* برای اویسترهای اقیانوس‌هند و آرام، در مورد صحت نام‌گذاری آن شک و تردید وجود دارد (Dinamani، ۱۹۷۶). Lam و Morton (۲۰۰۶) هم نشان دادند شباهت‌های بین گونه‌ای و تفاوت‌های درون گونه‌ای در

(DOI): 10.22034/aej.2020.120937

ویژگی‌های پوسته از دلایل غیرقابل اعتماد بودن طبقه‌بندی مورفولوژی در جنس *Saccostrea* می‌باشد. بنابراین می‌توان گفت بررسی‌های مولکولی و روابط فیلوژنی در موجوداتی که شناسایی آن‌ها براساس مورفولوژی دشوار است، مفید است (Wahleberg و همکاران، ۲۰۰۵). مطالعات Liu و همکاران (۲۰۱۱) نشان داد ژن COI جهت تفکیک گونه‌ای گونه‌های اویستر مناسب‌تر است و این ژن گونه‌های نزدیک به‌هم را بهتر از هم تفکیک می‌کند. در این مطالعه برای شناسایی گونه غالب *Saccostrea* در سواحل شمالی خلیج‌فارس از توالی‌یابی ژن COI استفاده شد که نتایج نشان داد گونه مذکور، گونه خواهری *S.mordax* ماداگاسکار در اقیانوس هند است و با *S. mordax* دیگر مناطق در دو کلاد جدا قرار گرفته‌اند. هم‌چنین این گروه با ۱۰۰ درصد بوت استرپ با دیگر جنس‌های *Saccostrea* به‌طور مجزا قرار گرفته‌اند. Lam و Morton (۲۰۰۶) نیز با استفاده از آنالیز توالی‌یابی ژن ۱۶S *Saccostrea* هند- آرام، نشان داد در آن منطقه دو ابر گونه (superspecies) *S. cucullata* و *S. mordax* وجود دارد که در کلاد جداگانه قرار دارند. گونه‌های *S. glomerata*, *S. kegaki* و *S. cucullata* در یک کلاد و *S. mordax* -A, B در کلاد دیگری قرار دارند که با نتایج این تحقیق هم‌خوانی دارد. از طرفی در گونه‌های اویستر جنس *Saccostrea*، بیش‌ترین فاصله ژنتیکی درون گونه‌ای در میان *S. mordax* و به‌میزان ۲/۲٪ مشاهده شد. هم‌چنین K2P بین گونه‌های جنس *Saccostrea* مقدار ۲۱/۴-۱۴/۸٪ می‌باشد (Guo و همکاران، ۲۰۱۸). در تحقیق صورت گرفته توسط Liu و همکاران (۲۰۱۱) بر روی اویسترهای خانواده اوستروییده، فاصله K2P درون گونه‌ای و بین گونه‌ای با استفاده از ژن CO1 به‌ترتیب مقدار ۱/۴-۰ و ۳۲/۲-۲/۶ به‌دست آمد. مشاهدات شخصی نشان داد که *S. mordax* تنها در سواحل صخره‌ای کاملاً دریایی و در معرض امواج وجود دارند درصورتی‌که گونه‌های دیگر همین جنس در سواحل کم‌تر در معرض امواج یا سواحل پوشیده ساکن بودند که با نتایج Lam و Morton (۲۰۰۶) یکسان است. ایشان نیز گزارش کردند *S. mordax* تنها در سواحل صخره‌ای کاملاً دریایی و در معرض امواج وجود دارد و دیگر *Saccostrea* طیف گسترده‌ای از زیستگاه‌ها از مانگروهای مناطق لب‌شور تا سواحل دریایی کم‌تر در معرض امواج، قرار دارند. به‌طور کلی نتایج این تحقیق نشان می‌دهد توالی‌یابی ژن COI ابزار مناسبی برای تعیین گونه‌های جنس *Saccostrea* می‌باشد.

منابع

۱. **حسین‌زاده‌صحافی، ه.؛ رامشی، ح. و دقوقی، ب.، ۱۳۹۶.** موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور. ۲۴۸ صفحه.

۲. **رضایی، ح.، ۱۳۷۴.** بررسی پراکنش نرم‌تنان در آب‌های کم‌عمق پیرامون برخی از جزایر ایرانی خلیج‌فارس. گزارش نهایی موسسه تحقیقات شیلات ایران. ۱۶۲ صفحه.

۳. سرمدیان، س.، ۱۳۹۳. بررسی بیان ژن متالوتیونین به‌عنوان بیومارکر مواجهه با کادمیوم در صدف Crassostrea sp.. رساله دکترای تخصصی. دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر. ۱۱۰ صفحه.

۴. **میرزا، ر.؛ عضدی، م.؛ توسل‌پور، ا. و وزیری‌زاده، ا.، ۱۳۹۴.** ارزیابی نرخ فیلتراسیون دو کفه‌ای *Barbatia hellblingii* و *Saccostrea cucullata* در امکان‌سنجی جهت پایشگر زیستی سواحل خلیج‌فارس. علوم و فنون دریایی ایران. دوره ۱۴، شماره ۱، صفحات ۱۱ تا ۲۰.

۵. **میرزا، ر.؛ فخری، ع.؛ فقیری، ا. و عظیمی، ع.، ۱۳۹۲.** بررسی نسبت نیکل و وانادیوم ناشی از آلودگی‌های نفتی در رسوبات و صدف صخره‌ای (*Saccostrea cucullata*) در سواحل استان بوشهر، خلیج فارس. نشریه اقیانوس‌شناسی. دوره ۴، شماره ۴، صفحات ۳۵ تا ۴۳.

۶. **یوسفی‌سیاه‌کلرودی، س.؛ وثوقی، غ. و رضایی، س.، ۱۳۸۴.** بررسی مولکولی جمعیت صدف‌های خوراکی *Saccostrea cucullata* در سواحل شمالی خلیج فارس و دریای عمان. پژوهش و سازندگی در امور دام و آبزیان. دوره ۱۷، شماره ۱، صفحات ۲ تا ۷.

۷. **Banks, M.A.; McGoldrick, D.J.; Borgeson, W. and Hedgecock, D., 1994.** Gametic incompatibility and genetic divergence of Pacific and Kumamoto oysters, *Crassostrea gigas* and *C. sikamea*. Marine Biology. Vol. 121, No. 1, pp: 127-135.

۸. **Bosch, D.T.; Dance, S.P.; Moolenbeek, R.G. and Oliver, P.G., 1995.** Seashells of eastern Arabia. Dubai Motivate publishing 1873544629781873544648.

۹. **Dumbauld, B.R.; Kauffman, B.E.; Trimble, A.C. and Ruesink, J.L., 2011.** The Willapa Bay oyster reserves in Washington State: fishery collapse, creating a sustainable replacement and the potential for habitat conservation and restoration. J of Shellfish Research. Vol. 30, No. 1, pp: 71-83.

۱۰. **Folmer, O.; Black, M.; Hoeh, W.; Lutz, R. and Vrijenhoek, R., 1994.** DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Molecular Marine Biology and Biotechnology. Vol. 3, pp: 294-299.

۱۱. **Guo, X.; Li, C.; Wang, H., and Xu, Z., 2018.** Diversity and Evolution of Living Oysters. Journal of Shellfish Research. Vol. 37, No. 4, pp: 755-771.

۱۲. **Huber, M., 2010.** Compendium of bivalves. A Full-color Guide to 3,300 of the World's Marine Bivalves. A Status on Bivalvia after 250 Years of Research. ConchBooks, Hackenheim, Germany. 901 p.

۱۳. **Kemp, W.M.; Boynton, W.R.; Adolf, J.E.; Boesch, D.F.; Boicourt, W.C.; Brush, G.; Cornwell, J.C.; Fisher, T.R.; Glibert, P.M.; Hagy, J.D. and Harding, L.W., 2005.** Eutrophication of Chesapeake Bay: historical trends and ecological interactions. Marine Ecology Progress Series. Vol. 303, pp: 1-29.

۱۴. **Kumar, S.; Stecher, G. and Tamura, K., 2016.** MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Molecular biology & evolution. pp: 1870-1874.

۱۵. **Lam, K. and Morton, B., 2006.** Morphological and mitochondrial-DNA analysis of the Indo-West Pacific rock oysters. J of Molluscan Studies. Vol. 72, No. 3, pp: 235-245.

۱۶. **Lavery, S.; Chan, T.Y.; Tam, Y.K. and Chu, K.H., 2004.** Phylogenetic relationships and evolutionary history of the shrimp genus *Penaeus* sl derived from mitochondrial DNA. Molecular phylogenetics & evolution. Vol. 31, No. 1, pp: 39-49.

۱۷. **Liu, J.U.N.; Li, Q.I.; Kong, L.; Yu, H. and Zheng, X., 2011.** Identifying the true oysters with mitochondrial phylogeny and distance-based DNA barcoding. Molecular ecology resources. Vol. 11, No. 5, pp: 820-830.

۱۸. **Porebski, S.; Bailey, L.G.; and Baum, B.R., 1997.** Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. Plant molecular biology reporter. Vol. 15, No. 1, pp: 8-15.

۱۹. **Quayle, D.B., 1988.** Pacifi c oyster culture in British Columbia. Canadian Bulletin of Fisheries and Aquatic Science. pp: 218-241.

۲۰. **Seilacher, A.; Matyja, B.A. and Wierzbowski, A., 1985.** Oyster beds: morphologic response to changing substrate conditions. In sedimentary & evolutionary cycles. pp: 421-435.

۲۱. **Schindel, D.E. and Miller, S.E., 2005.** DNA barcoding a useful tool for taxonomists. Nature. Vol. 435, No. 7038, pp: 17-27.

۲۲. **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 research. Vol. 22, No. 22, pp: 4673-4680.

۲۳. **Wahlberg, N.; Braby, M. F.; Brower, A. Z.; Jong, R.; Lee, M.; Nylin, S., 2005.** Synergistic effects of combining morphological and molecular data in resolving the phylogeny of butterflies and skippers. Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Science. pp: 1577-1586.

۲۴. **Wang, H. and Guo, X., 2008.** Identification of Crassostrea ariakensis and related oysters by multiplex species-specific PCR. J of Shellfish Research. Vol. 27, No. 3, pp: 481-487.

(DOI): 10.22034/aej.2020.120937

Scientific Research Journal of Animal Environment Vol. 12, No. 3, Autumn 2020

Molecular phylogeny of Rock oyster (*Saccostrea*) in the Northern part of Persian Gulf

- **Ali fakhri:** Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Oceanography, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran
- **Seyed Mohammad Bagher Nabavi*:** Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Oceanography, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran
- **Seyed Javad Hosseini:** Department of Fisheries and Marine Biology, Biotechnology group of Persian Gulf Institute, Persian Gulf University, Bushehr, Iran
- **Hossein zolgharnein:** Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Oceanography, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran
- **Bita Archangi:** Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Oceanography, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran

Received: July 2019 Accepted: October 2019

Key words: Molecular phylogeny, Rock oyster, Persian Gulf, COI

Abstract

Although rock oysters are widespread throughout the world, they are still difficult to identify and classify due to their high levels of plasticity. Unlike morphological classification, molecular methods can help identify and classify species whose morphological characteristics are misleading. In this study, 15 dominant rock oyster specimens were collected from intertidal areas of northern part of Persian Gulf to investigate the gene sequence. DNA was extracted from muscle tissue using CTAB (Hexade cyl trime thyl ammonium bromide) method. Sequences of unit 1 nucleotides of cytochrome oxidase gene (COI) were examined. The sequences of the studied samples were compared with the sequences of eight other species in the gene bank by phylogenetic tree mapping. The percentage of Bootstrap endemic to *Saccostrea mordax* is located in a clade, indicating that the COI sequence is suitable for identifying the species of *Saccostrea oistre*, and this species has also been reported for the first time in this area.

* Corresponding Author's email: nabavishiba@yahoo.com