شناسایی مولکولی و فیلوژنی گونه‌های جنس *Nerita* در سواحل صخره‌ای شمال خلیج فارس

منا ایزدیان[۱]،حسین ذوالقرنین[۱*]، سیدمحمدباقر نبوی[۱]، آریا اشجع‌اردلان[۲]، سیامک یوسفی‌سیاه‌کلرودی[۳]

[*]zolgharnein@kmsu.ac.ir

۱- گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، ایران
۲- گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، ایران
۳- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم‌زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین پیشوا، ایران

تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۹۴ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۹۵

چکیده

در این پژوهش شناسایی مولکولی گونه‌های جنس *Nerita*، شامل *N. lognii*، *N. albicilla* و *N. polita*، در سواحل شمالی خلیج‌فارس به همراه بررسی مورفولوژیک آن‌ها انجام شد. این جنس متعلق به خانواده Neritidae بوده و از گونه‌های غالب شکم‌پایان سواحل صخره‌ای می‌باشد. نمونه‌برداری در سال‌های ۹۲ و ۹۳ در سواحل صخره‌ای صورت گرفت. نمونه‌ها مورد شناسایی مورفولوژیک قرار گرفتند و سپس مراحل استخراج DNA (با استفاده از پودر Chelex)، تکثیر قطعه ژنی زیر واحد I سیتوکروم اکسیداز (COI) و ۱۶S rRNA و با روش سنجر توالی‌یابی انجام شد. در مجموع تعداد ۶ توالی COI و ۶ توالی ۱۶S متعلق به ۳ گونه از جنس *Nerita* به‌دست آمد که این توالی‌ها برای اولین بار از منطقه شمالی خلیج‌فارس گزارش شده است. آنالیزهای فیلوژنی با استفاده از نرم‌افزارهای MEGA6 و BEAST و با رسم درخت‌های فیلوژنی Maximum Likelihood و Bayesian صورت گرفت. نتایج حاصل از شناسایی مولکولی گونه‌های *N. longii* و *N. albicilla* با شناسایی سنتی و مورفولوژیک مطابق بود؛ ولی درمورد گونه *N. polita* تفاوت‌هایی میان آن‌ها مشاهده شد که می‌تواند نشان دهنده اهمیت مطالعه هم‌زمان مولکولی و مورفولوژیک باشد. همچنین نتایج نشان داد که گونه‌های جنس *Nerita* مونوفیلتیک می‌باشند.

کلمات کلیدی: *Nerita*، سیتوکروم اکسیداز I، فیلوژنی، سواحل صخره‌ای، خلیج‌فارس

[*]**نویسنده مسئول**

مقدمه

رده Gastropoda (شکم‌پایان) بزرگترین رده از شاخه نرم‌تنان (Mollusca) می‌باشد. این رده حدود ۴۰ هزار گونه زنده و ۱۵ هزار گونه فسیل دارد و در زیستگاه‌های بسیار وسیعی شامل دریاها (از مناطق ساحلی تا اعماق زیاد)، آب‌های شیرین و خشکی یافت می‌شود (Hickman *et al.*, 2001). خانواده Neritidae یکی از خانواده‌های شکم‌پایان می‌باشد که جنس *Nerita* از این خانواده در این پژوهش مورد مطالعه قرار گرفته است. صدف در جنس *Nerita* ضخیم و تخم‌مرغی شکل یا کروی است و پیچش کمی دارد. صدف‌ها دارای مارپیچ‌های راه‌راه و یا شیارهای محوری هستند. سطح شکمی دارای ستونکی بزرگ یا دیواره‌ای ناقص است. دهانه صدف و لبه ستونک معمولاً مضرس بوده دارای دندانه‌های نازک یا ضخیم است. اوپرکولوم کلسیمی و ضخیم است و می‌تواند ساختاری صاف یا دانه‌دار داشته باشد. پیچش اصلی بدن با خطوط مارپیچی پوشیده شده است (Cook, 2010).

کلیه مطالعاتی که تاکنون بر روی گونه‌های مختلف *Nerita* در خلیج فارس صورت گرفته است، در زمینه ریخت شناسی، پراکنش و بوم شناسی آن‌ها بوده است؛ مانند مطالعاتی که بیرامی و همکاران (۱۳۹۴) برای شناسایی ریختی شکم‌پایان جنس *Nerita* در ناحیه جزرومدی بندر لنگه انجام دادند. نتایج این پژوهش نشان دهنده حضور سه گونه *N. adenensis*، *N. polita* و *N. lognii* با غالبیت *N. adenensis* در منطقه نمونه‌برداری بود. آنها همچنین بیان داشتند که بیشترین میزان تنوع در رنگ صدف نیز در گونه *N. adenensis* وجود داشت. اما در خارج از ایران مطالعات مولکولی فراوانی بر روی این جنس انجام شده است که از آن جمله می‌توان به Frey و Vermeij (۲۰۰۸) اشاره کرد که به مطالعه فیلوژنی مولکولی و تاریخ جغرافیایی‌زیستی جنس *Nerita* پرداختند. همچنین Quintero-Galvis و Castro (۲۰۱۳) فیلوژنی مولکولی خانواده Neritidae را بر اساس ژن‌های میتوکندریایی COI و ۱۶SrRNA مطالعه کردند. تاکنون هیچ مطالعه‌ای بر روی شناسایی ملکولی و روابط بین آن‌ها در ایران انجام نشده است. هدف از انجام این تحقیق شناسایی دقیق مولکولی گونه‌هایی از جنس *Nerita* است که تا پیش از این تنها براساس ویژگی‌های ظاهری مورد شناسایی قرار گرفته بودند. همچنین بررسی روابط فیلوژنی آن‌ها با یکدیگر و با سایر گونه‌های این جنس در مناطق دیگر جهان، بویژه آب‌های اطراف خلیج فارس مد نظر بود.

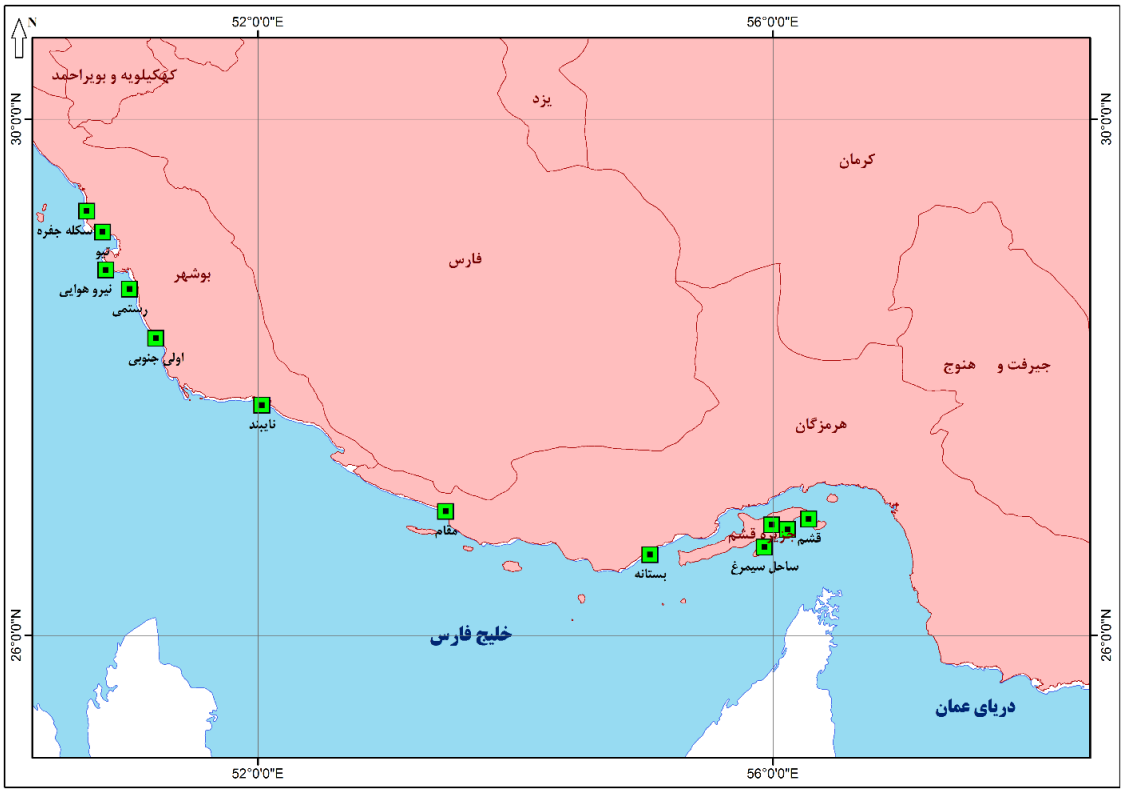
مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

طی سال‌های ۹۲ و ۹۳ نمونه‌برداری از بسترهای صخره‌ای سواحل شمالی خلیج‌فارس در زمان حداکثر جزر انجام گرفت. مشخصات ایستگاه‌های نمونه‌برداری در جدول شماره ۱ آورده شده است. بیشترین تعداد نمونه‌های جمع‌آوری شده متعلق به گونه *Nerita albicilla* بود که در مجموع تعداد ۵۴ نمونه از ایستگاه‌های نیروی هوایی، اسکله بوشهر، تیو، بندر رستمی، ساحل سیمرغ و قشم به دست آمد. نمونه‌های متعلق به گونه *Nerita lognii* تنها در دو ایستگاه اولی جنوبی و قشم به تعداد ۱۱عدد یافت شدند و در مورد نمونه‌های *Nerita polita* تنها در ایستگاه بندر رستمی و تنها در مرحله اول نمونه‌برداری تعداد ۹ نمونه به‌دست آمد. نمونه‌ها در اتانول ۹۸ درصد فیکس شد و در نهایت به آزمایشگاه دپارتمان جانورشناسی در دانشگاه OTAGO در کشور نیوزیلند انتقال یافت. موقعیت ایستگاه‌های نمونه‌برداری در شکل شماره ۱ نشان داده شده است. از آن‌جایی که صدف در گونه‌های این جنس دارای اپرکولوم می‌باشد و این درپوش مانع از رسیدن کامل الکل به بافت‌های درونی می‌شود، اپرکولوم نمونه‌ها جداسازی شد تا الکل به‌خوبی نفوذ کند و بافت‌های داخلی به طور کامل فیکس شوند (Layton, 2012).

جدول ۱: نام و مشخصات ایستگاه‌های نمونه‌برداری

ردیف	نام ایستگاه	شهر	استان	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی
۱	نیروی هوایی	بوشهر	بوشهر	۵۰°۸۰'۶۶"	۲۸°۹۳'۵۵"
۲	اسکله	بوشهر	بوشهر	۵۰°۸۲'۴۴"	۲۸°۹۷'۳۷"
۳	تیو	بوشهر	بوشهر	۵۰°۸۲'۵۸"	۲۸°۹۸'۱۳"
۴	بندر رستمی	تنگستان	بوشهر	۵۱°۰۰'۸۱"	۲۸°۵۶'۶۶"
۵	اولی جنوبی	دیر	بوشهر	۵۱°۹۰'۱۴"	۲۷°۸۳'۳۳"
۶	نایبند	عسلویه	بوشهر	۵۲°۶۷'۴۱"	۲۷°۴۲'۰۲"
۷	مقام	بندر لنگه	هرمزگان	۵۳°۴۸'۰۴"	۲۶°۹۵'۲۶"
۸	بستانه	بندر لنگه	هرمزگان	۵۲°۹۹'۳۸"	۲۷°۱۲'۴۱"
۹	قشم ۲	قشم	هرمزگان	۵۶°۱۲'۷۸"	۲۶°۸۳'۰۶"
۱۰	ساحل سیمرغ	قشم	هرمزگان	۵۶°۱۶'۳۷"	۲۶°۵۴'۱۲"
۱۱	قشم ۱	قشم	هرمزگان	۵۶°۲۶'۹۸"	۲۶°۹۳'۴۶"
۱۲	شیب دراز	قشم	هرمزگان	۵۵°۵۵'۵۶"	۲۶°۴۱'۱۴"



شکل ۱: موقعیت ایستگاه‌های نمونه‌برداری

شناسایی مورفولوژیک

نمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه جهت شناسایی مورفولوژیک بررسی شدند و با استفاده از کلیدهای شناسایی شامل: Sea Shells of Eastern Arabia (Bosch, *et al*., 2005)، Sea Shore of Kuwait Persian Gulf (Jones,1986)، Encyclopedia of Marine Gastropods (Robin, 2008) و اطلس نرم تنان خلیج فارس (حسین‌زاده صحافی و همکاران، ۱۳۷۹)، در حد گونه شناسایی شدند.

مطالعات مولکولی

پس از شناسایی مورفولوژیک نمونه‌ها، از هر گونه شناسایی شده دو نمونه انتخاب گردید و استخراج DNA با استفاده از پودر Chelex و پروتئیناز K انجام شد. پس از ارزیابی کمی و کیفی DNA استخراج شده بوسیله الکتروفورز و اسپکتروفوتومتر، تکثیر قطعه ژنی COI و ۱۶S rRNA انجام گرفت. به این منظور از پرایمر جهانی Folmer (1994) جهت تکثیر قطعه ژنی COI و از پرایمر Palumbi (1991) برای تکثیر ژن ۱۶S استفاده شد (جدول ۲). جهت تهیه محلول PCR، یک میکرولیتر (۱۰ نانوگرم) از DNA استخراجی، یک میکرولیتر از هر یک از پرایمرها (۱۰ پیکومول)، ۰/۵ میکرولیتر dNTP (۱۰ میلی‌مولار)، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq پلیمراز (۵u/µ)، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (۱۰X) و یک میکرولیتر $MgCl_2$ (۵۰ میلی‌مولار) استفاده شد که در نهایت حجم آن با آب مقطر به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد (McPherson & Møller, 2006). برنامه مورد استفاده جهت تکثیر قطعات ژنی در جدول شماره ۳ نشان داده شده است. در مواردی که نمونه‌ها از کیفیت مناسبی برخوردار نبودند، از روش و مواد دیگری در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده شد. به‌طور مثال از BSA، که در تکثیر ژن‌های نرم‌تنان کاربرد دارد، برای رفع عمل محدودکننده‌ها استفاده شد. محصول PCR مورد خالص-سازی قرار گرفت و جهت توالی یابی به دانشگاه OTAGO ارسال شد.

جدول ۲: نام و توالی پرایمرهای مورد استفاده

Primer Name (F/R)	Nucleotide Sequence (5' to 3')	Reference
LCO1490_t1	TGTAAAACGACGGCCAGTGGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	Folmer 1994
HCO2198_t1	CAGGAAACAGCTATGACTAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	
16Sar	CGCCTGTTTAACAAAAACAT	Palumbi 1991
16Sbr	CCGGTCTGAACTCAGATCACGT	

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

مراحل	درجه حرارت (°C)	زمان	تعداد چرخه (سیکل)
واسرشته سازی اولیه	۹۴	۲ دقیقه	۱
واسرشته سازی۱	۹۴	۳۰ ثانیه	
اتصال۲	۴۵	۳۰ ثانیه	۴۰
بسط۳	۷۲	۱ دقیقه	
بسط نهایی	۷۲	۴ دقیقه	۱

1 Denaturation
2 Annealing
3 Extention

ثبت توالی‌ها در پایگاه داده‌ها

به این منظور ابتدا توالی‌ها در سایت NCBI، BLAST [۴] 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[۵] توالی‌های بدست آمده، توسط نرم‌افزار CLC Sequence Viewer v6.5.4 (Knudsen et al., 2012)[۶] تعیین شد. سپس از طریق سایت DDBJ توالی‌ها در پایگاه داده NCBI ثبت گردید. در مجموع ۶ توالی COI و ۶ توالی ۱۶S خوانا و قابل تحلیل به‌دست آمد که این توالی‌ها برای نخستین بار از منطقه خلیج‌فارس گزارش شده است. مراحل ثبت یک مورد از این توالی‌ها تاکنون در بانک ژن جهانی به پایان رسیده و با شماره دسترسی LC060522 در سایت www.ncbi.nih.gov قابل مشاهده است.

رسم درخت فیلوژنی

آنالیز فیلوژنی با استفاده از روش‌های بیشینه احتمال (Maximum Likelihood) و Bayesian انجام شد. پیش از انجام آنالیزهای ML و BI، با استفاده از برنامه MrModeltest v2.3 (Nylander, 2004) و براساس معیار اطلاعاتی AIC (Akaike Information Criterion) و AICc مدل‌های مناسب برای داده‌های مورد نظر انتخاب شدند (Nylander, 2004). طبق این آزمون مدل GTR+I+G (Rodriguez *et al*., 1990) برای داده‌های این پژوهش انتخاب شد. کلیه توالی‌ها در فرمت FASTA جهت استفاده در نرم‌افزار MEGA6 (Tamura *et al*., 2011) آماده شد. جهت هم‌ردیف کردن توالی‌ها از نرم‌افزارهای Clustal W (Thompson *et al*., 1994) استفاده شد. آنالیز ML برای تمامی توالی‌های بدست آمده با استفاده از نرم‌افزار MEGA6 و تکرار بوت استراپ ۱۰۰۰ انجام شد.

از نرم‌افزار BEAST v1.8.2 (Drummond *et al*., 2012) برای تخمین زمان جدیدترین نیای مشترک (TMRCA)[۷] 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 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) می‌باشد (Sotelo *et al*., 2009). جهت تنظیم ساعت مولکولی، پس از بررسی منابع موجود از نرخ جایگزینی ۰/۳۵ تا ۱/۲ درصد در میلیون سال در این آنالیزها استفاده شد (Donald et al., 2005). آنالیز برای ۳۰ میلیون نسل اجرا و در هر ۱۰۰۰ مرحله نمونه‌گیری انجام شد.

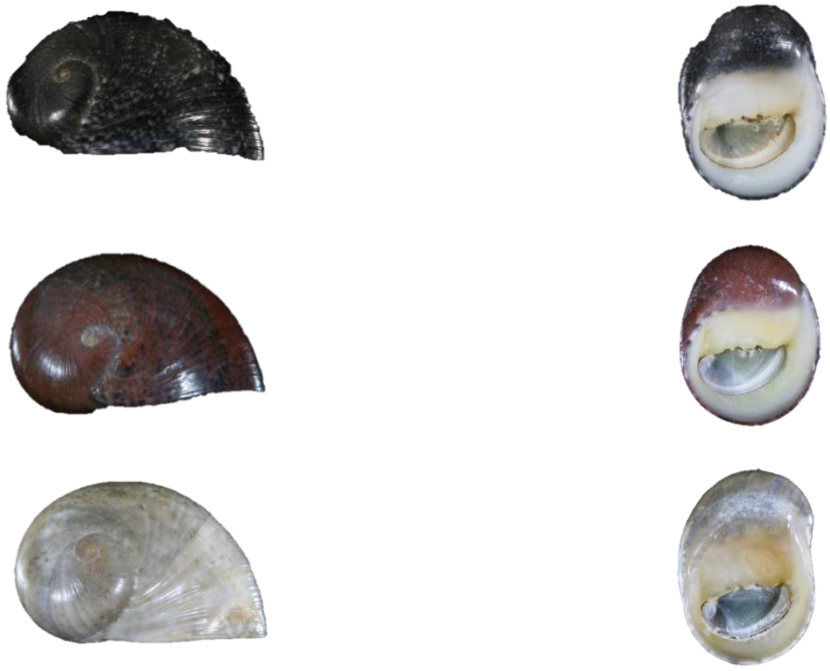
نتایج

پس از شناسایی مورفولوژیک نمونه‌ها مشخص شد که آن‌ها متعلق به سه گونه *Nerita longii*، *Nerita albicilla* و *Nerita polita* هستند. بزرگترین نمونه از گونه *N.albicilla*طولی معادل ۲۹ میلی‌متر داشت. نمونه‌های HoWi19 و BuAu58 به عنوان گونه *N.albicilla* شناسایی شدند. اندازه صدف گونه *N. lognii* در حدود ۳۵ تا ۴۰ میلی‌متر می‌باشد و نمونه‌های HoSp6 و BuAu52 به عنوان گونه *N. longii* شناسایی شدند. طول صدف در نمونه‌های جمع‌آوری شده از گونه *N. polita* حداکثر ۲ سانتی‌متر اندازه‌گیری شد. نمونه‌های BuAu41 و BuAu56 به عنوان گونه *N. polita* شناسایی شدند (شکل ۲).

4 Basic Local Alignment Search Tool
5 Fram
6 www.clcbio.com
7 Time to the Most Recent Common Ancestor (TMRCA)

***Nerita longii* (Récluz, 1842)**

***Nerita albicilla* (Linnaeus, 1758)**



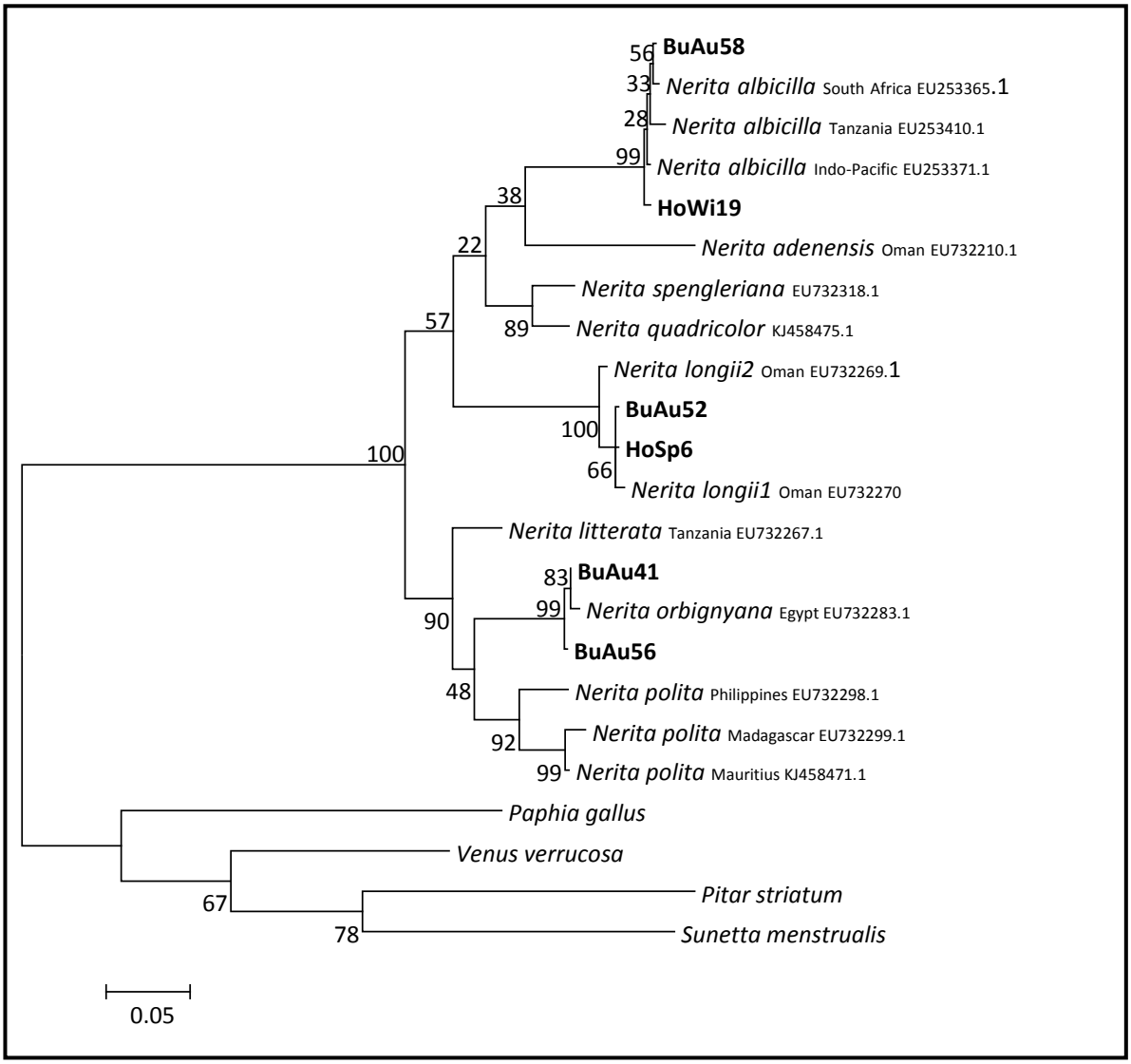
***Nerita polita* (Linnaeus, 1758)**

شکل ۲: تصاویر گونه‌های جنس *Nerita*

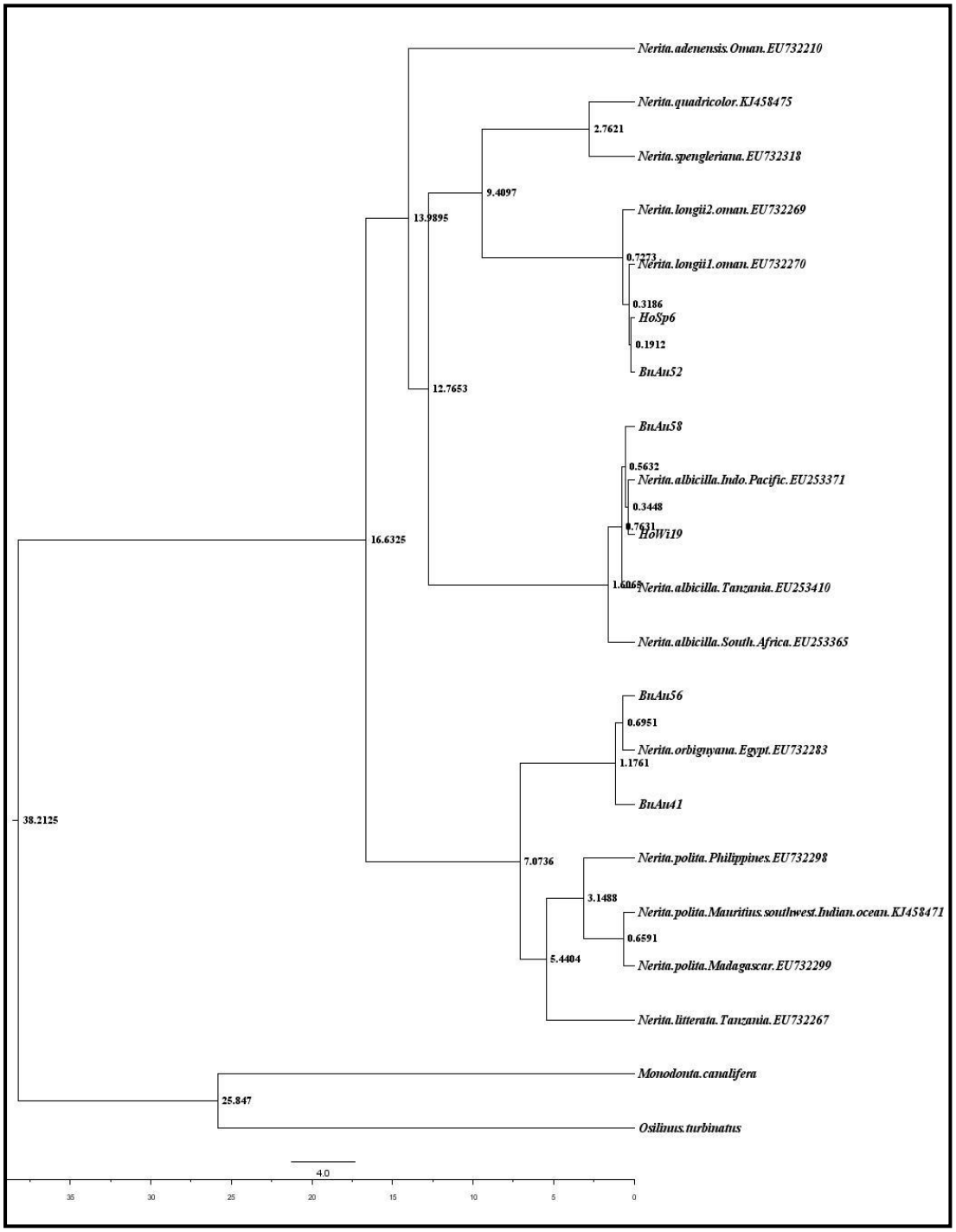
در مجموع ۶ توالی COI به‌دست آمد. درخت فیلوژنی رسم شده از این توالی‌ها و توالی‌های گزارش شده پیشین نشان داد که هر دو نمونه HoSp6 و BuAu52 با گونه *Nerita longii* از کشور عمان تطابق زیادی داشتند و با این گونه یک کلاد با ارزش بوت استرپ ۱۰۰=ML و احتمال پسین ۱ تشکیل دادند. این نتیجه با نتایج بررسی مورفولوژیک نیز هماهنگی دارد. نمونه‌های BuAu58 و HoWi19 نیز با گونه *Nerita albicilla* از نقاط مختلف جهان تطابق زیادی داشتند که در این مورد نیز نتایج حاصل با نتایج بررسی‌های مورفولوژیک مطابق است. این نمونه‌ها با گونه مذکور کلادی با ارزش بوت استرپ ۱۰۰=ML و احتمال پسین ۱ تشکیل دادند. اما نمونه‌های BuAu41 و BuAu56 که از نظر مورفولوژیک به عنوان گونه *Nerita polita* شناسایی شده بودند، با هیچ یک از توالی‌های متعلق به این گونه از نقاط مختلف جهان مطابقت نداشته و تطابق زیادی با گونه *Nerita orbignyana* از مصر نشان دادند. این دو نمونه با گونه *N. orbignyana* در یک کلاد با ارزش بوت استرپ ۹۹=ML و احتمال پسین ۱ قرار گرفتند. درخت ML رسم شده برای قطعه ژنی COI در شکل شماره ۳ نمایش داده شده است.

با استفاده از نرم‌افزار BEAST قدمت نزدیک‌ترین نیای مشترک گونه‌های مورد مطالعه در این تحقیق ۱۶/۶۳ میلیون سال پیش تخمین زده شد. زمان انشعاب نیای *Nerita orbigniyana* و *Nerita polita*، ۷/۰۷ میلیون سال پیش برآورد شد. زمان واگرایی گونه *Nerita albicilla* به ۱/۶۰ میلیون سال پیش بازمی‌گردد و ۰/۷۲ میلیون سال پیش زمان اشتقاق گونه *Nerita lognii* است. به همین ترتیب زمان برآورد شده برای ریشه درخت ۳۸/۲۱ میلیون سال پیش می‌باشد. درخت BI رسم شده برای قطعه ژنی COI در شکل شماره ۴ نمایش داده شده است.

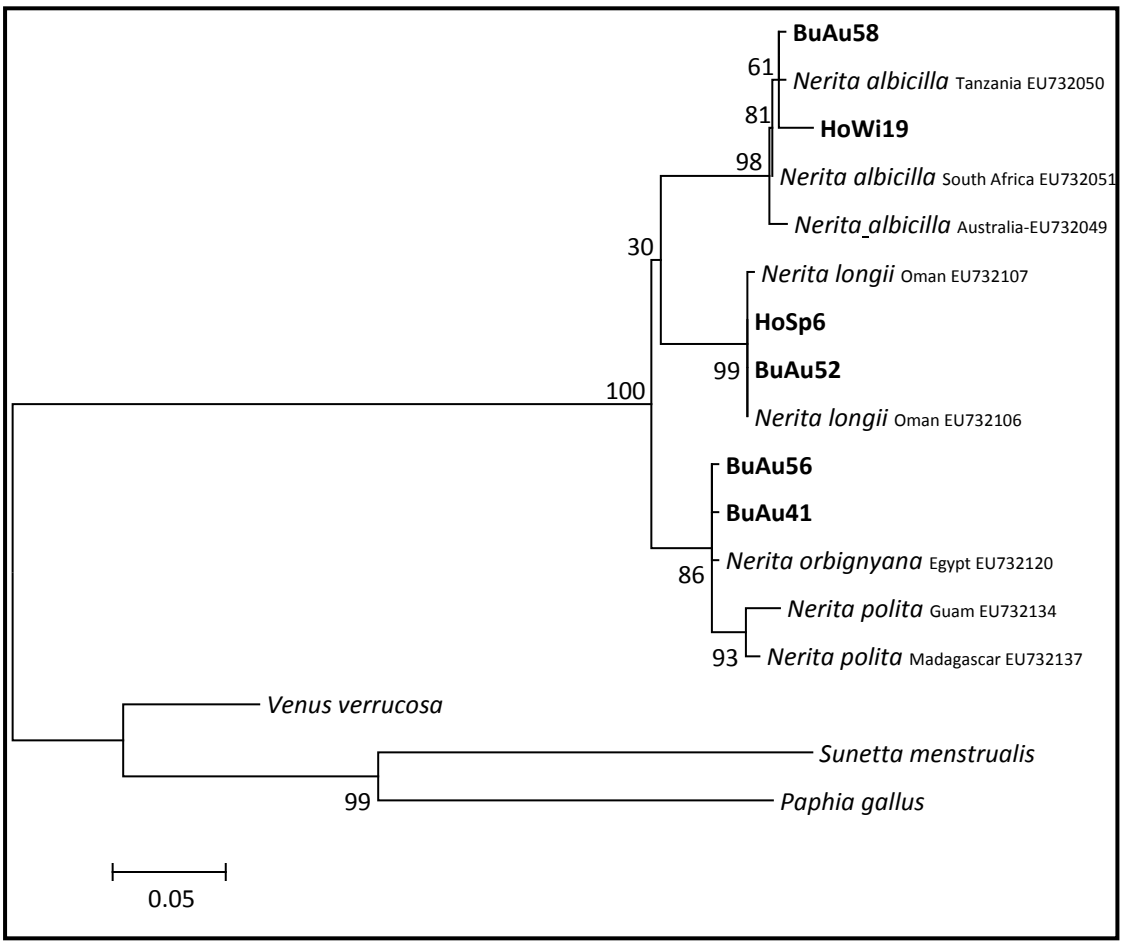
در این بررسی ۶ توالی ۱۶S نیز به‌دست آمد. به طور کلی نتایج آنالیزهای ML برای ژن‌های ۱۶S و COI در این کلاد کاملاً یکسان بود. حتی در مورد نمونه‌های BuAu41 و BuAu56 که نتایج مورفولوژیک با نتایج بررسی مولکولی قطعه ژنی COI متفاوت بود، این تفاوت در بررسی ژن ۱۶S نیز مشاهده شد و این نمونه‌ها را بیشتر شبیه به گونه *Nerita orbignyana* دانست تا گونه *Nerita polita*. نتایج نشان داد که تمامی گونه‌های *Nerita*ی مورد بررسی در این تحقیق مونوفیلتیک و دارای نیای مشترک هستند (ارزش بوت استرپ ۱۰۰=ML و احتمال پسین ۱). درخت ML رسم شده برای توالی‌های ۱۶S در شکل ۵ شماره نشان داده شده است.



شکل ۳: درخت ML رسم شده با توالی قطعه ژنی COI



شکل ۴: درخت BI رسم شده با توالی‌های قطعه ژنی COI



شکل ۵: درخت ML رسم شده با توالی‌های قطعه ژنی ۱۶S rRNA

بحث و نتیجه‌گیری

از میان نمونه‌های مورد بررسی، نمونه‌های HoSp6 و BuAu52 که به عنوان گونه *Nerita Longii* شناسایی شده بودند، هر دو با توالی‌های گونه *N. longii* از عمان تطابق زیادی داشتند. با این حال تمامی توالی‌های موجود در بانک ژن برای این گونه متعلق به کشور عمان بوده و امکان مقایسه این نمونه‌ها با توالی‌های سایر نقاط جهان میسر نبود. هر دو مطالعه مورفولوژیک و مولکولی، نمونه‌های BuAu58 و HoWi19 را متعلق به گونه *Nerita albicilla* دانستند. اما نکته قابل توجه در این مورد آن است که به علت دسترسی به توالی‌های دیگر از این گونه از نقاط دیگر جغرافیایی، امکان بررسی شباهت نمونه‌های خلیج فارس با آب‌های اطراف فراهم بود. همانطور که در شکل ۴ نشان داده شده است، نمونه‌های مورد بررسی از خلیج فارس با توالی گونه *N. albicilla* از آب‌های اقیانوسی هند-آرام در یک کلاد مجزا از نمونه‌های متعلق به آفریقای جنوبی و تانزانیا قرار گرفتند. این نتیجه می‌تواند نشان دهنده منشا حضور این گونه در خلیج فارس باشد که به علت ورود این گونه از جمعیت سواحل شرقی اقیانوس هند و سواحل غربی شبه قاره هند بوده است. اما در مورد نمونه‌های BuAu41 و BuAu56 اختلاف فاحش بین نتایج مولکولی و مورفولوژیک وجود داشت. نتایج مورفولوژیک آن‌ها را گونه *Nerita polita* معرفی کرد، در حالی‌که در تمامی درخت‌های فیلوژنی

رسم شده این نمونه‌ها در کلادی مجزا از توالی‌های این گونه از نقاط مختلف جهان قرار گرفتند و هر دو نمونه با وجود اختلاف با یکدیگر شباهت بسیاری با گونه *Nerita orbignyana* از مصر نشان دادند که با ارزش بوت‌استرپ و احتمال پسین بالا حمایت می‌شد. تمامی توالی‌های گونه *N. orbignyana* در بانک ژن متعلق به کشور مصر بود و امکان مقایسه بیشتر فراهم نشد. این در حالی است که این گونه تاکنون از ایران گزارش نشده است. در این مورد به علت وجود توالی‌های *N. polita* در بانک ژن و عدم تطابق این نمونه‌ها با هیچ یک از توالی‌های این گونه، می‌توان احتمال حضور گونه‌ای جدید را درنظر گرفت که مسلماً قطعیت بیشتر در این مورد نیازمند بررسی‌های دقیق‌تر مورفولوژیک و استفاده از نشانگرهای مولکولی دیگر می‌باشد. بیشترین فراوانی گونه‌های این جنس متعلق به گونه *N. albicilla* بود که بیرامی و همکاران (۱۳۹۴) نیز در مطالعه خود به این مطلب اشاره کرده‌اند. توالی از گونه *Nerita adenensis* از کشور عمان از بانک ژن استخراج و در رسم درخت استفاده شد. این گونه از دیگر گونه‌های گزارش شده از ایران می‌باشد که به‌علت ابهام در نمونه‌های BuAu41 و BuAu56 در رسم درخت استفاده شد اما تفاوت زیادی با این نمونه‌ها نشان داد (شکل‌های ۳ و ۴).

در این پژوهش دو نوع درخت Ml 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 نگردید. بالابودن 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 (Remigio and Hebert, 2003; Frey and Vermeij, 2008).

آنالیزهای حاصل از نرم‌افزار BEAST نشان داد که گونه‌های مورد بررسی در این تحقیق تقریباً در اوایل دوره میوسن اشتقاق یافته است. Frey و Vermeij نیز که مطالعات فیلوژنی بر روی جنس *Nerita* انجام دادند، زمان انشقاق این جنس را در اوایل میوسن تخمین زدند (Frey & Vermeij, 2008). بررسی‌های صورت گرفته نشان داد که جنس *Nerita* مونوفیلتیک بوده و تمامی اعضای آن که در این مطالعه بررسی شدند، دارای نیای مشترک می‌باشند. Quintero-Galvis و Raquel Castro (2013) نیز که با استفاده از ژنوم میتوکندریایی مطالعاتی بر روی فیلوژنی مولکولی خانواده Neritidea انجام دادند، به مونوفیلتیک بودن این کلاد و به‌خصوص گونه‌های جنس *Nerita* که در این پژوهش بررسی شدند، اذعان داشتند.

در انتها می‌توان چنین نتیجه گرفت که قطعه ژنی COI نشانگری کارآمد برای شناسایی نمونه‌ها در حد گونه می‌باشد. همچنین استفاده از نشانگر ۱۶S ضریب اطمینان کار را بالاتر برد؛ به طوری که در تمامی موارد نتایج حاصل از این دو نشانگر کاملاً یکسان و موید یکدیگر بودند. به‌طور کلی بررسی‌های انجام شده در مورد گونه‌های این پژوهش نشان داد که در اکثر موارد شناسایی‌های مورفولوژیک انجام شده در گذشته با نتایج مطالعات مولکولی این تحقیق یکسان هستند؛ ولی در مواردی نیز اختلافاتی بین آنها مشاهده شد که نشان‌دهنده لزوم مطالعه همزمان بررسی‌های مولکولی و مورفولوژیک می‌باشد. همچنین بررسی‌ها نشان داد که اعضاء جنس *Nerita* مونوفیلتیک بوده و دارای نیای مشترک می‌باشند.

منابع

حسین زاده صحافی، ه.، دقوقی، ب. و رامشی، ح.، ۱۳۷۹. اطلس نرمتنان خلیج فارس. موسسه تحقیقات شیلات ایران، تهران، ۲۴۸ صفحه.

بیرامی، ن.، سیف‌آبادی، ج. و علوی‌یگانه، م.ص.، ۱۳۹۴. شناسایی ریختی شکم‌پایان جنس *Nerita* در ناحیه جزرومدی بندر لنگه. نهمین کنفرانس ملی روز جهانی محیط زیست، صیانت از آب؛ نجات زندگی، دانشگاه تهران.

Bosch, D., Dance, S.P., Moolenbeek, R. and Oliver, P.G., 1995. Seashells of Eastern Arabia. Dubai: Motivate Publishing. 296P.

Cook, S.D.C., 2010. New Zealand Coastal Marine Invertebrates 1. Canterbury University Press, Christchurch, New Zealand. 632P.

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, 59 (8): 1701-1711.

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, 29: 1969-1973.

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, 3: 294-299.

Frey, M. and Vermeij, G.J., 2008. Molecular phylogenies and historical biogeography of a circumtropical group of gastropods (Genus: *Nerita*): implications for regional diversity patterns in the marine tropics. Molecular Phylogenetics & Evolution, 48: 1067-1086.

Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. and De Waard, J.R., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences, 270: 313-321.

Hickman, J.C.P., Roberts, L.S. and Larson, A., 2001. Integrated Principles of zoology. 11th ed. McGrawHill. 590P.

Jones, D.A., 1986. A field guide to the sea shores of Kuwait and the Persian Gulf. University of Kuwait Blandford Press, Poole, Kuwait. 192P.

Knudsen, B., Knudsen, T., Flensborg, 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., Grydholt, 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. CLC bio.

Layton, K., 2012. Examining patterns of genetic variation in Canadian marine molluscs through DNA barcodes. M.Sc. Thesis, University of Guelph.

McPherson, M.J. and Møller, S.G., 2006. PCR: Second Edition. Taylor & Francis Group. 292p.

Nylander, J.A.A., 2004. MrModeltest v2. Program distributed by the author.

Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, Sweden.

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. University of Hawaii.

Quintero-Galvis, J. and Castro, L.R., 2013. Molecular phylogeny of the Neritidae (Gastropoda: Neritimorpha) based on the mitochondrial genes cytochrome oxidase I (COI) and 16S rRNA. Acta biologica Colombiana, 18: 307-318.

Remigio, E.A. and Hebert, P.D.N., 2003. Testing the utility of partial COI sequences for phylogenetic estimates of gastropod relationships. Molecular Phylogenetics & Evolution, 29: 641-647.

Robin, A., 2008. Encyclopedia of Marine Gastropods, Ed. IKAN Unterwasser-Archive, ConchBooks, 480p.

Rodríguez, F., Oliver, J.F., Marín, A. and Medina, J.R., 1990. The general stochastic model of nucleotide substitution. Journal of Theoretical Biology, 142: 485-501.

Ronquist, F. and Huelsenbeck, J.P., 2003. MRBAYES3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics, 19: 1572-1574.

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, 2009 Oct; 53(1):314-9.

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, 28: 2731-2739.

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, 22: 4673-4680.

Molecular identification and phylogeny of *Nerita*'s species on rocky shores of the Northern Persian Gulf

Izadian M.[1]; Zolgharnein H.[*1]; Nabavi M.B.[1]; Ashja Ardalan A.[2]; Yousefi Siahkalroodi S.[3]

[*]zolgharnein@kmsu.ac.ir

1-Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science, Khorramshahr University of Marine Science and Technology
2- Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, Islamic Azad University North Tehran Branch
3- Department of Biology, Faculty of Biolobical Science, Islamic Azad University Varamin Pishva Branch

Received: Feburary 2016 Accepted: May 2016

Keywords: *Nerita*, Cytochrome oxidase I, phylogeny, Rocky shores, Persian Gulf

Abstract

*Nerita*s are among the most dominant groups of Gastropoda in the Persian Gulf. There is no previous study in relation to molecular and phylogeny of *Nerita*s in the study area. The molecular identification of *Nerita* species have been studied for the first time in the northern rocky coastal zones of Persian Gulf during 2013 and 2014. After morphological identifications of species, DNA extraction, amplifying partial of cytochrome oxidase COI and 16S rRNA and sequencing procedure were done in the laboratory. In this study, 6 COI and 6 16S rRNA sequences, belonging to 3 species, were obtained. Also, phylogeny analyses with drawing phylogeny trees of Maximum Likelihood and Bayesian were done using MEGA6 and BEAST softwares. Morphological and molecular identification results were similar for 2 species and dissimilar for one species. This discrepancy shows that a combination of morphological and molecular studies is more reliable for species identification than either of them solely. The results also showed that *Nerita* species are monophyletic.

[*]Corresponding author