Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 9:53 +0430 on Monday June 22nd 2020

شناسایی مولکولی چهار گونه از شکم پایان سواحل صخره‌ای خلیج‌فارس

چکیده

در این پژوهش شناسایی مولکولی چهار گونه از شکم پایان در آب‌های ساحلی خلیج‌فارس موردبررسی قرار گرفت. بدین منظور از ژن‌های میتوکندریایی COI و ۱۶S rRNA استفاده شد. نمونه‌برداری در مهرماه ۱۳۹۲ و اردیبهشت و دی‌ماه ۱۳۹۳ در سواحل صخره‌ای شمال خلیج‌فارس انجام گرفت و نمونه‌ها مورد شناسایی مورفولوژیک قرار گرفتند و گونه‌های *Planaxis sulcatus*، *Cerithidea cingulata*، *Siphonaria savignyi* و *Onchidium peronii* شناسایی شدند. سپس مراحل استخراج DNA با استفاده از پودر chelex و پروتئیناز k، تکثیر قطعه ژنی زیر واحد I سیتوکروم اکسیداز (COI) و S ۱۶rRNA انجام و توالی یابی شدند. درمجموع ۶ توالی COI و ۳ توالی ۱۶S rRNA متعلق به این گونه‌ها برای اولین بار از منطقه شمالی خلیج‌فارس گزارش و در بانک ژن به ثبت رسید. آنالیزهای فیلوژنی با استفاده از نرم‌افزارهای MEGA6 و PAUP و با رسم درخت‌های فیلوژنی Maximum Likelihood و Maximum Parsimony صورت گرفت. بررسی مولکولی این گونه‌ها نتایجی مطابق با شناسایی مورفولوژیک نشان داد. هر دو قطعه میتوکندریایی در شناسایی تا سطح گونه کارآمد عمل کردند. در این پژوهش دو نوع درخت Ml و MP رسم شده برای نمونه‌ها و آنالیزهای مولکولی با شناسایی مورفولوژیک انجام‌شده، نتایج یکسانی نشان داد. همچنین 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 انجام‌شده، اثباتی بر آن است که قطعه ژنی COI، نشانگری مطلوب برای ارزیابی و حل فرضیه‌های تکاملی می‌باشد.

واژگان کلیدی: *Planaxis sulcatus*، *Cerithidea cingulata*، *Siphonaria savignyi* و *Onchidium peronii*، COI، ۱۶S rRNA، خلیج‌فارس.

منا ایزدیان[1]*

۱. گروه تنوع زیستی و ایمنی زیستی، پژوهشکده محیط‌زیست و توسعه پایدار، سازمان حفاظت محیط‌زیست، تهران، ایران

***مسئول مکاتبات:**

izadian.mona@gmail.com

کد مقاله: ۱۳۹۸۰۴۰۷۴۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۷/۱۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۰/۲۶

این مقاله برگرفته از رساله دکتری است.

مقدمه

شکم پایان در میان نرم‌تنان، بزرگ‌ترین و گوناگون‌ترین گروه را تشکیل می‌دهند و از بعضی اقسام بسیار ابتدایی دریازی، تا حلزون‌ها و لیسه‌های هوازی و ساکن خشکی بسیار پیشرفته را شامل می‌شوند (Bouchet *et al.*, 2005). آن‌ها ازنظر اقتصادی به‌عنوان منبع پروتئین، تزئینات، رنگ و دارو حائز اهمیت هستند (Ahmad *et al.*, 2018). این رده شامل بیشترین تعداد گونه‌ها بعد از رده حشرات است که اکثر آن‌ها در اکوسیستم‌های دریایی زندگی می‌کنند (Abbott and Morris, 2001). سواحل صخره‌ای یکی از زیستگاه‌های این گروه بوده که محیط‌های ناهمگنی را برای حیات آن‌ها فراهم می‌سازند. این به‌نوبه خود بر توزیع و فراوانی جوامع ساحلی صخره‌ای در طول شیب تأثیر می‌گذارد (Pandey and Thiruchitrambalam, 2018). امروزه با شیوه‌های نوین ازجمله روش‌های مولکولی رده‌بندی‌های جدیدی برای شکم پایان مطرح می‌باشد؛ گسترش نشانگرهای ژنتیکی بر پایه DNA انقلابی در شناسایی و دانش ژنتیک جانوران ایجاد کرده است (Zietkiewicz *et al.*, 1992). در دهه‌های اخیر DNA میتوکندریایی mt-DNA به دلیل نرخ تکامل بالا (Avise, 1994) کاربرد گسترده‌ای در سیستماتیک یافته است (Wang

www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 9:53 +0430 on Monday June 22nd 2020

et al., 2000). ویژگی‌های خاص mt-DNA، آن را برای تحلیل‌های مقایسه‌ای مناسب می‌سازد (Avise, 2000). این ویژگی‌ها عبارت‌اند از اندازه کوچک مولکول (Attardi, 1985)، میزان بالای تکامل توالی‌های ژنی میتوکندری (Brown *et al.*, 1979)، توارث هاپلوئید مادری و فقدان نوترکیبی (Birky, 2001). Hebert و همکاران (۲۰۰۳) در مقاله‌ای که در شاخه علوم زیستی ژورنال جامعه سلطنتی لندن به چاپ رسید، استفاده از نشانگر COI را به‌عنوان نشانگر مولکولی عمومی برای شناسایی گونه‌های جانوری پیشنهاد دادند.

پیش‌ازاین دانه‌کار و همکاران (۱۳۸۲) به بررسی و معرفی فون شکم پایان ذخیره‌گاه بیوسفری حرا در سواحل شمالی خلیج‌فارس پرداختند. در این پژوهش ۳۰ گونه شکم پا از ۲۸ جنس، متعلق به ۲۲ خانواده ازجمله گونه *Cerithidea cingulate* شناسایی شد. خالقی (۱۳۹۱) به شناسایی و بررسی پراکنش شکم پایان در ناحیه جزرومدی جزیره لارک پرداخت. بیشترین فراوانی در سطح خانواده و گونه به ترتیب مربوط به خانواده Cerithiidae و گونه *Planaxis sulcatus* بود. موسوی پور (۱۳۹۲) به بررسی مولکولی و مورفولوژیک برخی از گونه‌های Heterobranchia در سواحل چابهار پرداختند. ترسیم درخت فیلوژنی نشان داد که گونه *Peronia peronii* در کلاد Panpulmonata قرارگرفته است و گونه چابهار ۱۰۰ درصد شبیه به *Peronia cf. peronii* و در یک گروه خواهری قرارگرفته‌اند. مهردوست و همکاران (۱۳۹۲) تنوع گونه‌ای شکم پایان ناحیه بین جزرومدی جزیره هنگام را بررسی نمودند و گونه *Palanxis sulcatus* از گونه‌های غالب نواحی بین جزرومدی جزیره معرفی شد.

Remigio و Hebert (۲۰۰۳) کاربرد استفاده از بخشی از توالی COI را در روابط فیلوژنتیک شکم پایان مطالعه کردند. در این تحقیق توالی‌های COI از ۷۳ گونه از شکم پایان، متعلق به ۷۰ جنس که هر پنج زیررده شکم پایان را نمایندگی می‌کردند، بررسی شدند. تمامی آنالیزها به‌طور موافق، Heterobranchia را به‌عنوان یک کلاد مجزا معرفی کردند. آن‌ها در این مطالعه نشان دادند که کاربرد COI در شناسایی قرابت فیلوژنتیک در میان بسیاری از گروه‌های شکم پایان، در رنج وسیعی از تاکسون‌ها، مفید می‌باشد.

Layton و همکاران (۲۰۱۴) با جمع‌آوری ۲۴۷۱ نرم‌تن دریایی کانادا و با استفاده از DNA بارکدینگ، مطالعاتی بر روی الگوی‌های مختلف ژنتیکی ۲۲۷ گونه انجام دادند. آن‌ها نشان دادند که DNA بارکدینگ برای فراهم آوردن درکی درست از توالی‌های مختلف در یک گروه وسیع تاکسونومیک، با مقیاس بزرگ جغرافیایی، کارآمد است. همچنین استفاده از توالی COI را ابزاری مفید، برای شناسایی نرم‌تنان کانادا و نیز برای آشکار کردن چشم‌اندازی بر موقعیت‌های احتمالی گونه‌های مختلف، معرفی نمودند.

رده‌بندی سنتی بر پایه مورفولوژی دارای کاستی‌های فراوانی است. از آن جمله می‌توان به‌اشتباه گرفتن تنوع درون‌گونه‌ای یا دوشکلی جنسی به‌جای تفاوت گونه‌ای، یکسان پنداشتن گونه‌های ظاهراً شبیه به هم، ناکارایی کلیدهای شناسایی برای مراحل پیش از بلوغ چرخه زندگی، نبود خصوصیات ریختی مشترک و قابل‌مقایسه در میان تاکسون‌های گوناگون، نیاز به متخصصان ویژه برای هر گروه از جانداران آن‌هم هنگامی‌که شمار این متخصصان در جهان رو به کاهش است، اشاره کرد (Hebert *et al.*, 2003). رده‌بندی مولکولی تا حد ممکن در پی جبران این کاستی‌ها است و آن را با دو رویکرد تعریف تاکسون‌های جدید یا بازآرایی تاکسون‌های شناخته‌شده بر پایه‌ی اطلاعات مولکولی و به‌کارگیری داده‌های مولکولی برای نسبت دادن نمونه‌های جدید به گونه‌های تعریف‌شده از سوی تاکسونومیست‌ها دنبال می‌کند.

در مواردی که میان رده‌بندی مولکولی و رده‌بندی معمول ریخت‌شناستی ناسازگاری چشمگیر وجود داشته باشد، بررسی توالی ژن‌های دیگر و نیز خصوصیات متنوع دیگر (رده‌بندی فراگیر) می‌تواند به حل مشکل کمک کند (Hajibabaei *et al.*, 2007). هم‌چنین در مواردی که نمونه‌ها دارای تفاوت‌های مورفولوژیک کم و یا هموپلازی هستند، روابطی که توسط داده‌های مولکولی آشکار می‌شوند می‌توانند بسیار مفید باشند (Latiolais *et al.*, 2006).

طبق مطالعات Sinniger و همکاران (۲۰۰۸) استفاده از نشانگر میتوکندریایی COI چندین مزیت بر ۱۶S rRNA دارد. COI به‌آسانی توسط آغازگرهای جهانی Folmer و همکاران (۱۹۹۴) قابل تکثیر است. به‌علاوه عدم وجود جهش حذف (deletions) یا اضافه (insertions) در این

www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 9:53 +0430 on Monday June 22nd 2020

قطعه ژنی امکان هم‌ردیفی (alignment) آن‌ها را با یکدیگر تسهیل می‌کند. از طرف دیگر توالی‌های ۱۶S rRNA نیز مزیت‌های مجزایی دارند. این نشانگر از قطعه ژنی COI متنوع‌تر بوده و نواحی حذف یا اضافه شدن (indel) در آن دیده می‌شود. این قطعات حذف یا اضافه‌شده خود می‌توانند منبع اطلاعات تاکسونومیک باارزشی باشند. گرچه این نواحی هنگام تطبیق توالی‌ها با یکدیگر ممکن است ایجاد اشکال کنند، اما در مواردی که کیفیت DNA یا توالی یابی چندان مناسب نیست، اطلاعات موجود در این نواحی در تفکیک گونه‌ها و کلادهای فیلوژنی بسیار کارآمد عمل می‌کند.

در این پژوهش به شناسایی مولکولی ۴ گونه از شکم پایان سواحل صخره‌ای خلیج‌فارس با هدف شناسایی دقیق‌تر این گونه‌ها و ثبت توالی آن‌ها در بانک ژن پرداخته‌شده است که پیش‌ازاین تنها با روش‌های متداول مورفولوژیک، که در مواردی موجب ابهام در شناسایی شکم پایان می‌شود، مورد شناسایی قرارگرفته بودند. پیش‌ازاین کلیه مطالعات بر روی شکم پایان ایران بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیک بوده و با مطالعات مولکولی می‌توان به میزان صحت مطالعات مورفولوژیک پی برد و در صورت وجود مغایرت به بررسی بیشتر پرداخت.

مواد و روش‌ها

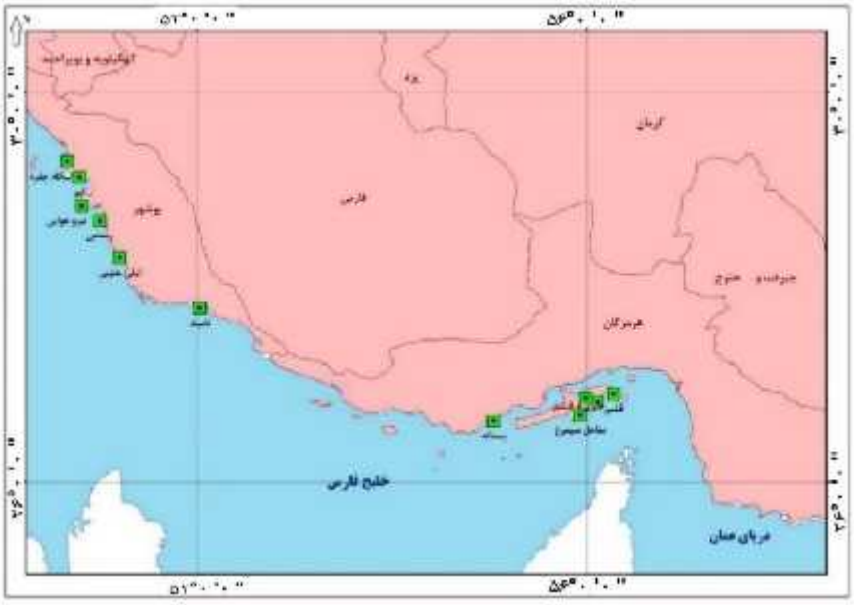
طی سال‌های ۱۳۹۲ و ۱۳۹۳ نمونه‌برداری از بسترهای صخره‌ای سواحل شمالی خلیج‌فارس در زمان حداکثر جزر انجام گرفت. مشخصات ایستگاه‌های نمونه‌برداری در جدول ۱ آورده شده است. نمونه‌ها در اتانول ۹۸ درصد فیکس شد و به آزمایشگاه انتقال یافتند. موقعیت ایستگاه‌های نمونه‌برداری در شکل ۱ نشان داده‌شده است.

جدول ۱: نام و مشخصات ایستگاه‌های نمونه‌برداری.

ردیف	نام ایستگاه	شهر	استان	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی
۱	نیرو هوایی	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	۰۰°۵۱'۸۱"	۵۶°۲۸'۶۶"
۵	اولی جنوبی	دیر	بوشهر	۹۰°۵۱'۱۴"	۸۳°۲۷'۳۳"
۶	نایبند	عسلویه	بوشهر	۶۷°۵۲'۴۱"	۴۲°۲۷'۰۲"
۷	بستانه	بندرلنگه	هرمزگان	۹۹°۵۲'۳۸"	۱۲°۲۷'۴۱"
۸	ساحل سیمرغ	قشم	هرمزگان	۱۶°۵۶'۳۷"	۵۴°۲۶'۱۲"
۹	قشم	قشم	هرمزگان	۲۶°۵۶'۹۸"	۹۳°۲۶'۴۶"

www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 9:53 +0430 on Monday June 22nd 2020



شکل ۱: موقعیت ایستگاه‌های نمونه‌برداری.

جهت شناسایی مورفولوژیک نمونه‌ها از کلیدهای شناسایی شامل: Sea Shells of Eastern Arabia (Bosch *et al.*, 1995)، Shore of Kuwait Persian Gulf (Jones,1986)، Encyclopedia of Marine Gastropods (Robin, 2008) و اطلس نرم تنان خلیج‌فارس (حسین زاده صحافی و همکاران، ۱۳۷۹)، استفاده شد.

پس از شناسایی مورفولوژیک نمونه‌ها، استخراج DNA از آن‌ها، انجام شد. استخراج DNA با استفاده از پودر Chelex و پروتئیناز K صورت گرفت. به‌این‌ترتیب که یک گرم پودر Chelex با ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شد. سپس ۴۰۰ میکرو لیتر از این مخلوط به‌علاوه ۱۰ میکرو لیتر پروتئیناز K به مقدار بسیار کمی از هر نمونه اضافه گردید. پس از سانتریفیوژ تیوب‌ها به مدت یک‌شب در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس‌ازآن به مدت ۱۰ دقیقه با ۱۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. محلول رویی حاوی DNA بود که مستقیماً برای تکثیر ژن در PCR مورداستفاده قرار گرفت. تکثیر قطعه ژنی COI و ۱۶S rRNA پس از ارزیابی کمی و کیفی DNA استخراج‌شده به‌وسیله الکتروفورز و اسپکتروفوتومتر، انجام گرفت. پرایمر مورداستفاده در تکثیر قطعه ژنی COI، پرایمر جهانی Folmer (1994) و پرایمر مورداستفاده جهت تکثیر ژن ۱۶S rRNA پرایمر Palumbi و همکاران (۱۹۹۱) بود که مشخصات آن‌ها در جدول ۲ آمده است. جهت تهیه محلول PCR، از یک میکرو لیتر (۱۰ نانوگرم) DNA استخراجی، یک میکرو لیتر از هر یک از پرایمرها (۱۰ پیکومول)، ۰/۵ میکرو لیتر dNTP (۱۰ میلی‌مولار)، ۰/۳ میکرو لیتر آنزیم Taq پلیمراز (۵u/µ)، ۲/۵ میکرو لیتر بافر (۱۰X) PCR و یک میکرو لیتر $MgCl_2$ (۵۰ میلی‌مولار) استفاده شد که درنهایت حجم آن با آب مقطر به ۲۵ میکرو لیتر رسانده شد (McPherson and Møller, 2006). 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 پلیمراز 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 توالی یابی ارسال شد.

www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 9:53 +0430 on Monday June 22nd 2020

جدول ۲: نام و توالی پرایمرهای مورداستفاده.

Primer Name (F/R)	Nucleotide Sequence (5’ to 3’)	Reference
LCO1490_t1	TGTAAAACGACGGCCAGTGGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	Folmer *et al*., 1994
HCO2198_t1	CAGGAAACAGCTATGACTAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	
16Sar	CGCCTGTTTAACAAAAACAT	Palumbi *et al*., 1991
16Sbr	CCGGTCTGAACTCAGATCACGT	

جدول ۳: برنامه دمایی زنجیره‌ای واکنش‌های پلیمراز به‌کاررفته در تکثیر قطعات ژنی در گونه‌های موردبررسی در سواحل صخره‌ای خلیج‌فارس (۱۳۹۳-۱۳۹۲).

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

جهت ثبت توالی‌ها در پایگاه داده‌ها ابتدا توالی‌ها در سایت NCBI، BLAST 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 توالی‌های به‌دست‌آمده، توسط نرم‌افزار CLC Sequence Viewer v6.5.4 (Knudsen *et al*., 2012) تعیین شد. سپس از طریق سایت DDBJ توالی‌ها در پایگاه داده NCBI ثبت گردید.

کلیه توالی‌ها در فرمت FASTA، جهت استفاده در نرم‌افزار MEGA6 (Tamura *et al*., 2011) و در فرمت Nexus، جهت استفاده در نرم‌افزار PAUP (Swofford, 2003) مرتب شدند. جهت هم‌ردیف کردن توالی‌ها از نرم‌افزارهای Clustal W (Thompson *et al*., 1994) و AliView (Larsson, 2014) استفاده شد. پس از هم‌ردیفی توسط نرم‌افزار توالی‌ها به‌صورت چشمی مجدداً هم‌ردیف شدند. آنالیز فیلوژنی با استفاده از روش‌های بیشینه صرفه‌جویی (Maximum Parsimony)، بیشینه احتمال (Maximum Likelihood) انجام شد. پیش از انجام آنالیزهایMP و ML، با استفاده از برنامه MrModeltest v2.3 (Nylander, 2004) و بر اساس معیار اطلاعاتی AIC (Akaike Information Criterion) و AICc مدل‌های مناسب برای داده‌های موردنظر، انتخاب شدند (Nylander, 2004). طبق این آزمون مدل GTR+I+G (Rodriguez *et al*., 1990) برای داده‌های این پژوهش انتخاب شد. آنالیز MP برای داده‌ها به همراه توالی‌های مرجع با استفاده از نرم‌افزار PAUP نسخه 4b10 (Swofford, 2003) انجام گرفت. برای انجام آنالیزها از الگوریتم مبادله شاخه به شاخه روش دو نیمه‌سازی 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. آنالیزهای MP با ۱۰۰۰ تکرار بوت استرپ بررسی شدند. آنالیز ML برای توالی‌های به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار MEGA6 (Tamura *et al*., 2011) و تکرار بوت استراپ ۱۰۰۰ انجام شد.

www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 9:53 +0430 on Monday June 22nd 2020

نتایج

پس از بررسی ظاهری نمونه‌ها با استفاده از کلیدهای شناسایی ۴ گونه *Planaxis sulcatus*، *Cerithidea cingulata*، *Onchidium peronei* و *Siphonaria savignyi* شناسایی شدند که رده‌بندی آن‌ها در جدول ۴ و تصاویر آن‌ها در شکل ۲ آمده است.

جدول ٤: رده‌بندی گونه‌های موردبررسی.

Species	Genus	Family	Order	Subclass
Planaxis sulcatus	*Planaxis*	Planaxidae	Caenogastraopoda	Caenogastraopoda
Cerithidea cingulata	*Cerithidea*	Potamididae		
Siphonaria savignyi	*Siphonaria*	Siphonariidae	-	Heterobranchia
Onchidium peronii	*Onchidium*	Onchidiidae	Systellommatophora	

ویژگی‌های ظاهری *Planaxis sulcatus*، صدف‌هایی با ابعاد کوچک، بین۱۰ –۲۰ میلی‌متر می‌باشند که بزرگ‌ترین نمونه اندازه‌گیری شده ۱۴ میلی‌متر بود. رنگ صدف خاکستری سیاه می‌باشد. لب خارجی آن دندانه‌دار و پیچ‌های همراه با نوارهای مارپیچی دارد. داخل دهانه صدف مخطط است. نمونه‌های HoWi18 و BuAu38 به‌عنوان گونه *Planaxis sulcatus* شناسایی شدند.

ویژگی‌های ظاهری *Cerithidea cingulata*، این‌گونه صدفی مخروطی شکل بین ۲۰ تا ۴۰ میلی‌متر طول دارد. بزرگ‌ترین نمونه اندازه‌گیری شده ازاین‌گونه در مطالعه حاضر ۲۱ میلی‌متر طول داشت. صدف دارای خطوط پیچ‌خورده به رنگ‌های قهوه‌ای، سفید و سیاه است. لب بیرونی پهن و با بندهای دایره‌ای مهره‌دار است. سه ردیف مهره در هر پیچ وجود دارد. نمونه BuAu34 به‌عنوان گونه *Cerithidea cingulata* شناسایی شد.

ویژگی‌های ظاهری *Onchidium peronii*، این‌گونه فاقد صدف می‌باشد. طول این نمونه بین ۳۰ تا ۱۰۰ میلی‌متر است. بدنی نرم و تخم‌مرغی شکل دارد که بر روی آن برجستگی‌های زگیل مانند دیده می‌شود. رنگ بدن سبز تیره مایل به قهوه‌ای می‌باشد. یک جفت تنتاکل بر روی سر وجود دارد که چشم‌ها در رأس آن‌ها قرارگرفته‌اند. حاشیه جانور به‌وسیله لکه‌های رنگی متمایز و یا نوارهای کوتاه شعاعی مشخص می‌باشد. نمونه HoSp9 به‌عنوان جنس *Onchidium peronii* شناسایی شد.

ویژگی‌های ظاهری *Siphonaria savignyi*، صدف گنبدی شکل است و بزرگ‌ترین نمونه اندازه‌گیری شده دارای ۱۵ میلی‌متر طول داشت. نوارهای زیاد و برجسته‌ای از قله به‌طرف لبه ادامه دارد. قسمتی از لبه برآمدگی بیشتری دارد. درون صدف قهوه‌ای و سفید است و اثر ماهیچه‌ای قهوه‌ای تیره است. نمونه‌های BuAu28 و BuAu44 به‌عنوان جنس *Siphonaria savignyi* شناسایی شدند.

درمجموع ۶ توالی COI و ۳ توالی ۱۶S خوانا و قابل‌تحلیل به‌دست‌آمده آمد که این توالی‌ها برای نخستین بار از منطقه خلیج‌فارس گزارش‌شده 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 ۵ قابل‌مشاهده است.

www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 9:53 +0430 on Monday June 22nd 2020

شکل ۲: تصاویر گونه‌های موردبررسی در سواحل صخره‌ای خلیج‌فارس (۱۳۹۳-۱۳۹۲).

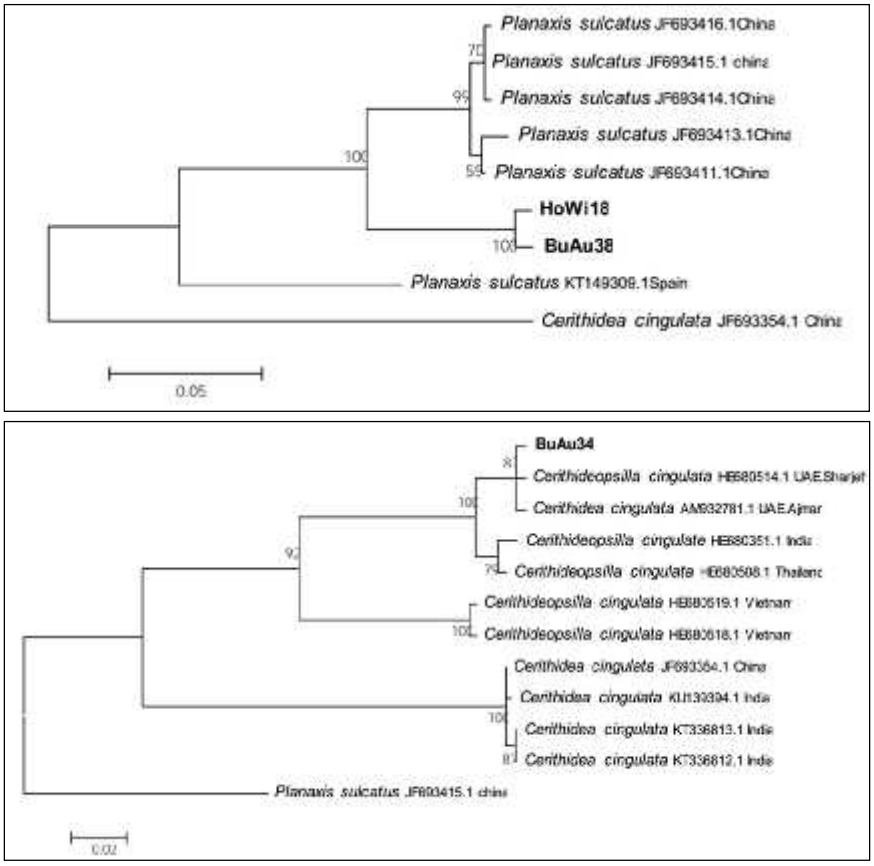
جدول ۵: شماره دسترسی توالی‌های ثبت‌شده در NCBI.

ردیف	ژن	اسم ثبت‌شده	نام خانواده	Accession Number
۱	COI	*Peronia sp. IM*	Onchidiidae	LC027608.1
۲	COI	*Planaxidae sp.MI7*	Planaxidae	LC060527
۳	COI	*Planaxidae sp. MI26*	Planaxidae	LC167817
۴	COI	*Cerithidea cingulata*	Potamididae	LC167815
۵	COI	*Siphonaria savignyi*	Siphonariidae	LC167812
۶	COI	*Siphonaria savignyi*	Siphonariidae	LC167488

www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 9:53 +0430 on Monday June 22nd 2020

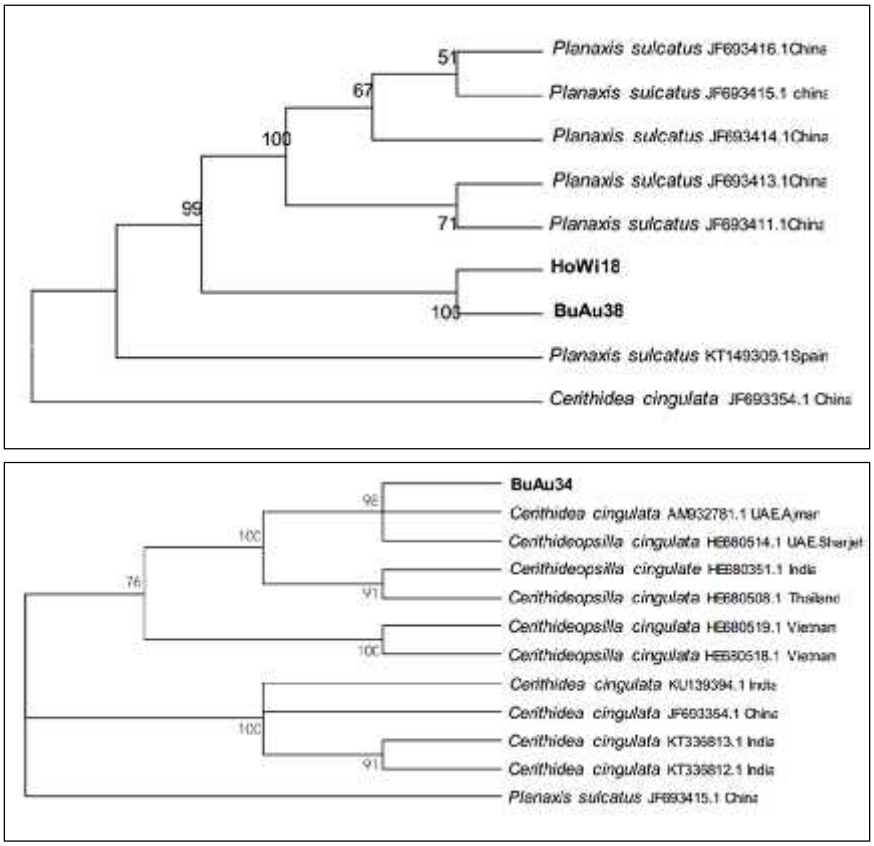
دو نمونه HoWi18 و BuAu38 تطابق زیادی باهم نشان دادند و با توالی‌های *Planaxis sulcatus* از چین در یک کلاد قرار گرفتند. شباهت با این‌گونه، مؤید مطالعات مورفولوژیک انجام‌گرفته بر روی آن‌ها بود که این دو نمونه را گونه *Planaxis sulcatus* معرفی کرده بودند. توالی‌های این مطالعه به توالی‌های گزارش‌شده از چین نزدیکی بیشتری نشان داد و با توالی مطالعه شده از کشور اسپانیا اندکی تفاوت نشان داد. نمونه BuAu34 که تنها نمونه معرفی‌شده به‌عنوان گونه *Cerithidea cingulata* توسط بررسی‌های مورفولوژیک بود، با این‌گونه از امارات متحده عربی تطابق داشت. شایان‌ذکر است که جنس *Cerithideopsilla* مترادف با جنس *Cerithidea* می‌باشد و به علت ثبت توالی‌های آن‌ها با این اسامی در بانک ژن از اسامی ثبت‌شده استفاده شد. درخت‌های رسم شده برای این توالی‌ها در شکل‌های ۳ و ۴ نمایش داده‌شده است.



شکل ۳: درخت ML رسم شده با توالی قطعه ژنی COI در سواحل صخره‌ای خلیج‌فارس (۱۳۹۳-۱۳۹۲).

www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 9:53 +0430 on Monday June 22nd 2020



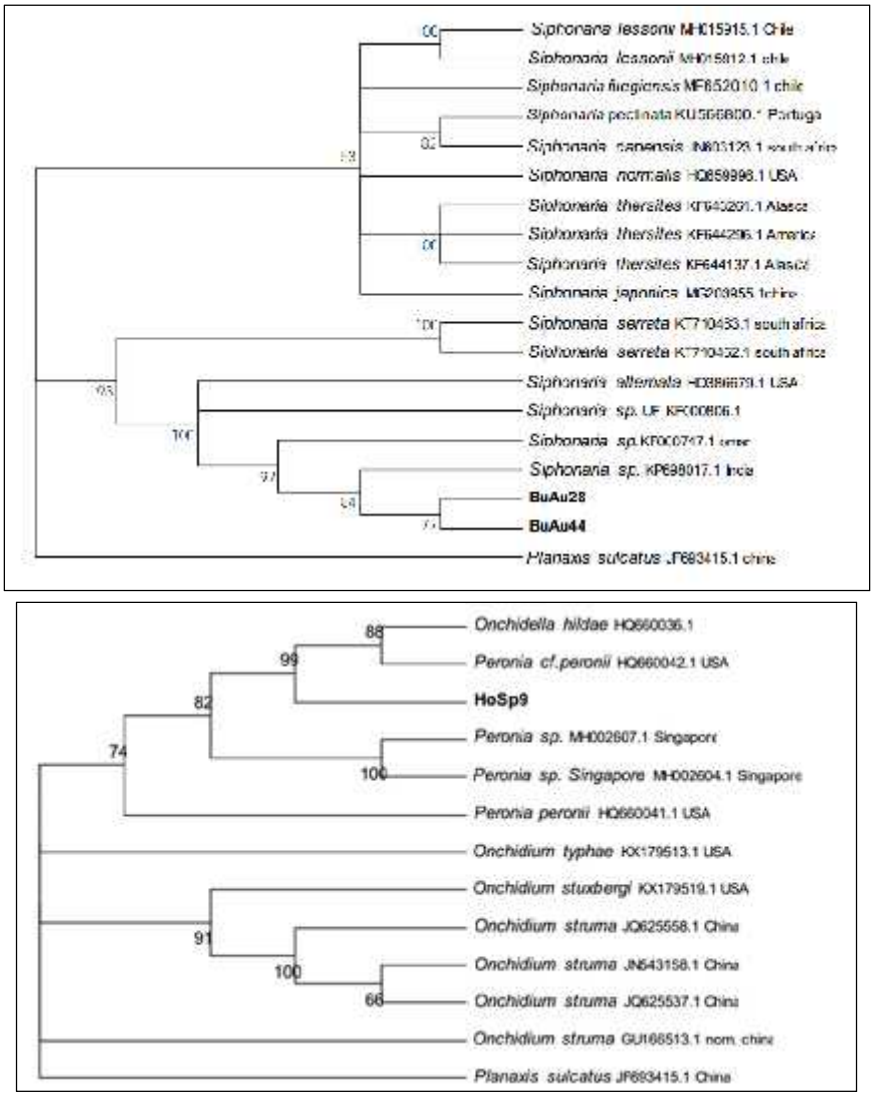
شکل ٤: درخت MP رسم شده با توالی قطعه ژنی COI در سواحل صخره‌ای خلیج‌فارس (۱۳۹۳-۱۳۹۲).

از کلاد Heterobranchia ۳ توالی COI به‌دست آمد. دو نمونه BuAu28 و BuAu44 ازنظر مورفولوژیک به‌عنوان گونه *Siphonaria savignyi* شناسایی‌شده بودند. به علت عدم وجود توالی این‌گونه در بانک ژن، گونه‌های دیگر از این جنس جهت مقایسه در درخت فیلوژنی استفاده شدند. نتایج نشان داد که این دو نمونه بیشترین شباهت را با یک توالی از این جنس از عمان دارند و با سایر توالی‌های جنس *Siphonaria* از نقاط مختلف جهان در یک کلاد قرار گرفتند.

نمونه HoSp9 در بررسی مورفولوژیک گونه *Onchidium peronii* تشخیص داده شد. از سوی دیگر در برخی منابع نام *Peronia peronei* مترادف با این‌گونه گزارش‌شده است. در مطالعات فیلوژنی نیز این نمونه با گونه‌های مختلف این دو جنس در یک کلاد قرار گرفت. درخت‌های رسم شده برای این کلاد در شکل‌های ۵ و ۶ نمایش داده‌شده است.

www.SID.ir

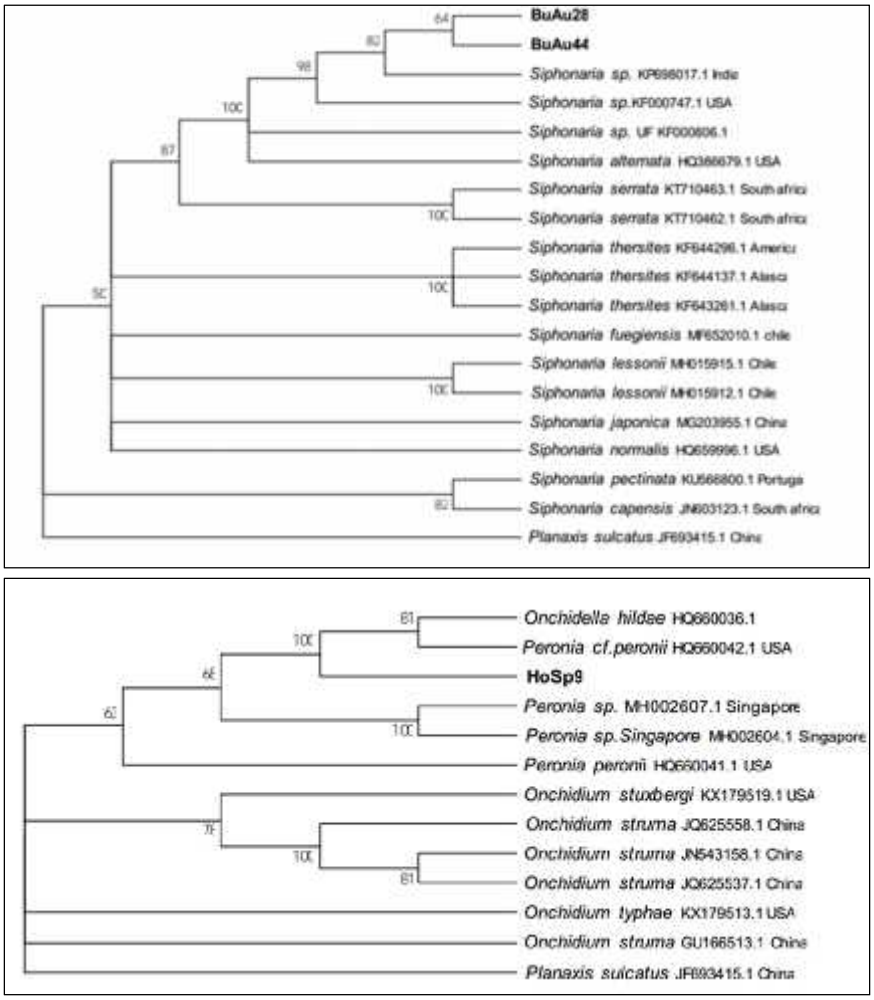
Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 9:53 +0430 on Monday June 22nd 2020



شکل ۵: درخت ML رسم شده با توالی قطعه ژنی COI.

www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 9:53 +0430 on Monday June 22nd 2020



شکل ٦: درخت MP رسم شده با توالی قطعه ژنی COI .

در کل ۳ توالی ۱۶S rRNA به‌دست‌آمده آمد. نمونه BuAu34 با توالی این‌گونه *Cerithideopsilla cingulata* از امارات تطابق نشان داد. نمونه BuAu38 که به‌عنوان *Planaxis sulcatus* شناسایی‌شده بود، اگرچه با توالی‌های این‌گونه از چین و فوجی در یک کلاد قرار گرفت، تفاوت قابل‌ملاحظه‌ای را با آن‌ها نشان داد که می‌تواند نشانه‌ای بر لزوم بررسی‌های بیشتر و دقیق‌تر مولکولی و مورفولوژیک باشد.

از کلاد Heterobranchia نیز تنها یک توالی ۱۶SrRNA به دست آمد که متعلق به نمونه BuAu28 با شناسایی مورفولوژیک *Siphonaria savignyi* بود. بررسی ژن ۱۶ SrRNA این نمونه را با یک توالی گزارش‌شده از کشور عمان متعلق به جنس *Siphonaria* کاملاً منطبق نشان داد. ازآنجایی‌که توالی گزارش‌شده تنها بانام جنس ثبت‌شده بود، نتایج این تحقیق می‌تواند نشان‌دهنده تعلق توالی مذکور به گونه *Siphonaria savigny* باشد.

www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 9:53 +0430 on Monday June 22nd 2020

بحث و نتیجه‌گیری

تاکسونومی بخش ضروری از هر مطالعه بیولوژیک است (Galan *et al.*, 2018). در مطالعات علمی که در مورد یک‌گونه مشخص می‌باشند، شناسایی دقیق و صحیح آن‌گونه خاص اهمیت بسیاری دارد (Fontanilla *et al.*, 2014). تاکسونومی سنتی به‌تنهایی گاهی در شناسایی گونه‌ها دچار اشتباه می‌شود (Packer *et al.*, 2009) و سودمندی روش‌های سنتی در موارد تشابه مورفولوژیک گونه‌ها و مواقعی که گونه‌های مورد بررسی در مراحل نابالغ هستند، محدود می‌گردد (Gossner and Hausmann, 2009). روش‌های مولکولی تاکسونومی جهت تکمیل شیوه‌های مورفولوژیک شناسایی گونه‌ها و تعیین روابط فیلوژنی بسیار پرکاربرد است (Ferri *et al.*, 2009).

در این مطالعه برای نخستین بار شناسایی مولکولی ۴ گونه از شکم پایان سواحل صخره‌ای خلیج‌فارس انجام گرفت. تمامی مطالعات گذشته برای رده‌بندی و شناسایی آن‌ها، تنها با توجه به ویژگی‌های ریختی این موجودات صورت گرفته بود. ازاین‌رو هیچ توالی گزارش‌شده‌ای از آب‌های ایران برای مقایسه و مطالعه بیشتر در دسترس نبود و توالی‌های به‌دست‌آمده در این پژوهش برای نخستین بار از ایران گزارش شدند. به همین علت حداکثر تلاش انجام گرفت تا با یافتن توالی‌هایی از گونه‌های نمونه‌های موردبررسی از نزدیک‌ترین آب‌ها به این ناحیه جغرافیایی، شبیه‌ترین توالی‌ها استخراج شود و برای رسم درخت و مقایسه به کار رود. در برخی موارد اطلاعاتی از گونه‌های بررسی‌شده در سایر کشورهای هم‌جوار با خلیج‌فارس موجود بود، در پاره دیگر از موارد توالی‌هایی از کشورهای حاشیه اقیانوس هند به دست آمد. ولی در موارد دیگری هیچ توالی از آب‌های اطراف در بانک ژن ثبت‌نشده بود و حتی در برخی موارد حتی هیچ توالی از گونه موردنظر از هیچ منطقه‌ای از جهان تاکنون گزارش نشده بود. در این شرایط سعی بر این شد تا از نزدیک‌ترین مناطق و گونه‌ها استفاده شود.

در کلاد Caenogastropoda در مورد دو نمونه HoWi18 و BuAu38 مطالعات مورفولوژیک و مولکولی یکسان بوده و هر دو این نمونه‌ها را گونه *Planaxis sulcatus* معرفی کردند. در این مورد توالی‌های استفاده‌شده در رسم درخت متعلق به کشورهای چین و اسپانیا بودند که هر دو فاصله زیادی با آب‌های موردمطالعه در این پژوهش دارند. در درخت رسم شده نیز دو نمونه متعلق به ایران در یک کلاد با مقداری تفاوت با گونه‌های گزارش‌شده پیشین قرار گرفتند که می‌تواند نشانه‌ای بر لزوم بررسی‌های بیشتر مورفولوژیک و مولکولی درزمینهٔ حضور گونه جدید باشد.

در مطالعه‌ای که ملک پور و همکاران (۱۳۹۴) بر روی شکم پایان جزیره خارگ انجام دادند توالی‌هایی ازاین‌گونه را با توالی‌های مطالعه حاضر که در بانک ژن ثبت‌شده بود مقایسه و درخت فیلوژنی رسم نمودند. نتایج نشان داد که نمونه‌های جزیره خارگ با نمونه‌های مطالعه حاضر همگی با شباهت بسیار بالا در یک کلاد و مجزا از سایر نمونه‌های گزارش‌شده ازاین‌گونه از سایر کشورها قرار گرفتند. به‌این‌ترتیب نمونه‌هایی که از ایران ازنظر مورفولوژیک شبیه به گونه *Planaxix sulcatus* گزارش‌شده‌اند ازنظر ژنتیکی در کلادی جداگانه قرار می‌گیرند و دارای رابطه خواهری هستند. به‌طورکلی بررسی‌های انجام‌شده در مورد گونه‌های مختلف نشان داده‌اند که در اکثر موارد شناسایی‌های مورفولوژیک انجام‌شده درگذشته با نتایج مطالعات مولکولی یکسان هستند، ولی در مواردی نیز اختلافاتی بین آن‌ها مشاهده می‌شود که نشان‌دهنده لزوم مطالعه همزمان بررسی‌های مولکولی و مورفولوژیک می‌باشد.

نمونه BuAu34 هماهنگ با بررسی‌های مورفولوژیک با توالی گونه *Cerithidea cingulata* از امارات متحده عربی تطابق داشت و با دو توالی گزارش‌شده از کشور امارات که پیش‌ازاین از منطقه خلیج‌فارس گزارش‌شده بود، در یک کلاد قرار گرفت که نشان‌دهنده تطابق مطالعات مولکولی و مورفولوژیک در این مورد می‌باشد. یک توالی ازاین‌گونه از کشور هند وجود داشت و توالی‌هایی از کشورهای تایلند و ویتنام نیز تعلق این نمونه به گونه مذکور را تأیید می‌کند. توالی‌های گزارش‌شده این‌گونه از چین در یک کلاد جدا قرار گرفتند که به علت فاصله جغرافیایی تفاوت موجود طبیعی به نظر می‌رسد.

www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 9:53 +0430 on Monday June 22nd 2020

در این پژوهش در کلاد Heterobranchia به علت عدم وجود توالی از گونه *Siphonaria savignyi* در بانک ژن، امکان بررسی صحت مطالعات مورفولوژیک که نمونه‌های BuAu28 و BuAu44 را با عنوان این‌گونه شناسایی کرده بودند وجود نداشت. گونه‌های دیگر از این جنس جهت رسم درخت فیلوژنی استفاده شدند و با نمونه‌های این بررسی در یک کلاد قرار گرفتند و طبیعتاً بدون تطابق کامل، با توالی ثبت‌شده از کشور عمان بیشترین شباهت را نشان دادند.

نمونه HoSp9 که در بررسی مورفولوژیک گونه *Onchidium peronii* تشخیص داده‌شده بود، با آن‌که توالیی تحت این عنوان در بانک ژن وجود نداشت، با سایر توالی‌های مربوط به این جنس و نیز مترادف آن *Peronia*، شباهت زیادی نشان داد و باارزش بوت‌استرپ بسیار بالا با آن‌ها در یک کلاد قرار گرفت.

عطاران فریمان و همکاران در سال ۱۳۹۳ مطالعه‌ای بر روی فیلوژنی گونه *Peronia peronii* در سواحل بین جزر و مدی چابهار انجام دادند. آنالیزهای فیلوژنی انجام‌شده نشان داد که نمونه‌های چابهار صد درصد شبیه به *Peronia cf. peronii* بوده و در یک گروه خواهری قرار گرفتند. چنانچه بررسی‌های ویژگی‌های مورفولوژیک نیز تعلق این نمونه‌ها به این‌گونه را نشان می‌داد. این بررسی با استفاده از توالی ژنی ۱۸ SrDNA انجام‌گرفته که به علت تفاوت با توالی ژنی مورداستفاده در مطالعه حاضر امکان مقایسه و استفاده از آن توالی در درخت‌های رسم شده در این پژوهش میسر نبود. بااین‌حال مطالعات عطاران فریمان و همکاران نیز مطابق بامطالعه حاضر، تأییدکننده تعلق گونه‌های سواحل ایران به گونه *Peronia peronii* و یا مترادف آن *Onchidium peronii* می‌باشد.

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 ۱۶ S rRNA در کنار یکدیگر نشانگرهای قابلی جهت تفکیک گونه‌ای شکم پایان هستند (Medina *et al.*, 1999; Collin, 2003; Donald *et al.*, 2005; Frey and Vermeij, 2008; Strong and Bouchet, 2013; Quintero-Galvis and Castro, 2013). در مطالعه حاضر نیز هر دو قطعه میتوکندریایی در شناسایی تا سطح گونه کارآمد عمل کردند. در این پژوهش دو نوع درخت Ml و MP برای نمونه‌ها رسم شد و آنالیزهای مولکولی نتایج یکسانی نشان داد. همچنین 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 انجام‌شده، 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).

در این مطالعه نمونه‌ها از دو روش شناسایی مورفولوژیک و مولکولی بررسی شدند و دو نوع درخت ML و MP برای آن‌ها ترسیم شد. نتایج هر دو روش یکسان بود و همچنین در مورد تمامی گونه‌ها نتایج مشابهی از بررسی نشانگرهای COI و ۱۶ S rRNA حاصل شد. درخت‌های فیلوژنی رسم شده نیز نتایج همگونی داشته و بالا بودن شاخص‌های حمایتی گره‌های پایه در آنالیزهای انجام‌شده، اثباتی بر آن است که قطعه ژنی COI، نشانگری مطلوب برای ارزیابی و شناسایی مولکولی می‌باشد. به‌طورکلی به نظر می‌رسد شناسایی مولکولی در اکثر موارد با شناسایی مورفولوژیک تطابق دارد؛ بااین‌حال سایر گونه نیاز به بررسی بیشتر دارند.

منابع

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

خالقی، ع.، ۱۳۹۱. شناسایی و پراکنش شکم‌پایان در ناحیه جزرومدی جزیره لارک. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تربیت مدرس، ۱۳۶ ص.

www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 9:53 +0430 on Monday June 22nd 2020

دانه‌کار، ا.، سماعی، ع. و کیابی، ب.، ۱۳۸۲. بررسی و معرفی فون شکم پایان ذخیره‌گاه بیوسفری حرا در سواحل شمالی خلیج‌فارس. فصلنامه پژوهش و سازندگی، ۱۶ (۲): صفحات ۲۷-۲۱.

عطاران فریمان، گ.، موسوی پور، ی. و شکوری، آ.، ۱۳۹۳. بررسی فیلوژنتیکی گونه *Peronia peronii* (نرم‌تنان: شکم پایان، Sea Slug) در سواحل بین جزر و مدی چابهار بر اساس توالی ژنی SrDNA ۱۸. مجله تازه‌های بیوتکنولوژی سلولی-مولکولی، ۴ (۱۵): صفحات ۳۴-۲۹.

ملک پور، آ.، عیدی، م. و نوری کوپائی، آ.، ۱۳۹۵. شناسایی مولکولی و آنالیز فیلوژنی شکم پایان جزیره خارگ، خلیج‌فارس. فصلنامه دانش زیستی ایران، ۱۱(۴): صفحات ۵۰-۴۵.

مهردوست، م.، عوفی، ف. و احسانی، ک.، ۱۳۹۲. شناسایی و تنوع گونه‌ای شکم پایان ناحیه بین جزرومدی جزیره هنگام خلیج‌فارس. دومین همایش ملی حفاظت و برنامه زیری محیطزیست، همدان، ۱۱ ص.

موسوی پور، ی.، ۱۳۹۲. بررسی مولکولی و مورفولوژیکی برخی از گونه‌های Heterobranchia (نرم تنان) در سواحل چابهار. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، ۱۱۳ ص.

Abbott, R. T. and Morris, A. P., 2001. A Field Guide to Shells: Atlantic and Gulf Coasts and the West Indies. Houghton Mifflin Harcourt, 512 P.

Ahmad, T. B., Liu, L., Kotiw, M. and Benkendorff, K., 2018. Review of anti-inflammatory, immune-modulatory and wound healing properties of molluscs. Journal of Ethnopharmacology. 210:156–178.

Attardi, G., 1985. Animal mitochondrial DNA: an extreme example of genetic economy. International Review of Cytology. 93: 93-145.

Avise, J. C., 1994. Molecular Markers**,** Natural History**,** and Evolution. Chapman & Hall, New York, 511 p.

Avise, J. C., 2000. Phylogeography. The History and Formation of Species, Harvard University Press, Cambridge. 447 p.

Birky, C. W., 2001. The Inheritance of genes in mitochondria and choroplasts: Laws, Mechanisms, and Models. Annual Review of Genetics. 35: 125-148.

Bosch, D., Dance, S. P., Moolenbeek, R. and Oliver, P. G., 1995. Seashells of Eastern Arabia Motivate Publishing, pp. 24-186.

Bouchet, P., Rocroi, J. P., Frýda, J., Hausdorf, B., Ponder, W., Valdés, Á. and Warén, A., 2005. Classification and nomenclator of gastropod families. Malacologia: International Journal of Malacology (Hackenheim, Germany: ConchBooks), 47 (1-2): 1–397.

Brown, W. M., George, M. and Wilson, A. C., 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 76: 1967-1971.

Collin, R., 2003. Phylogenetic relationships among calyptraeid gastropods and their implications for the biogeography of speciation. Systematic Biology, 52 (5): 618-640.

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.

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.

Fontanilla, K. I., Torres, A. F., Cañasa J. A. D. G., Yap S. L. and Ong P. S., 2014. State of animal DNA barcoding in the Philippines: A review of COI sequencing of the Philippine native fauna. Philippine Science Letters, 4(1): 104-137.

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 and Evolution, 48: 1067-1086.

Ferri, E., Barbuto, M., Bain, O., Galimberti, A., Uni, S., Gurrero, R., Ferte, H., Bandi, C., Martin, C. and Casiraghi, M., 2009. Integrated taxonomy: traditional approach and DNA barcoding for the identification of filarioid worms and related parasites (Nematoda). Frontiers in Zoology 6: 1-12.

www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 9:53 +0430 on Monday June 22nd 2020

Galan, G. L., Mendez, N. P. and Dela Cruz, R. Y., 2018. DNA barcoding of three selected gastropod species using cytochrome oxidase (COI) gene. Annals of West University of Timişoara, ser. Biology, 21 (1): 93-102.

Gossner, M. M. and Hausmann A., 2009. D barcoding enables the identification of caterpillars feeding on native and alien oak (Lepidoptera: Geometridae). Mitteilungen Muenchener Entomologischen Gesellschaft, 99:135-140.

Hajibabaei, M., Singer, G. A. C., Hebert, P. D. N. and Hickey, D. A., 2007. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. Trends in Genetics, 23: 167-172.

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.

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.

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.

Larsson, A., 2014. AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets, Bioinformatics, 30 (22): 3276-3278. DOI: http://dx.doi.org /10.1093/ bioinformatics/btu531.

Latiolais, J. M., Taylor, M. S., Roy, K. and Hellberg, M. E., 2006. A molecular phylogenetic analysis of strombid gastropod morphological diversity. Molecular Phylogenetics and Evolution, 41: 436-444.

Layton, K., Martel, A. L. and Hebert, P. D. N., 2014. Patterns of DNA Barcode Variation in Canadian Marine Molluscs. Public Library of Science One. 9(4): 1-9.

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

Medina, M., Weil, E. and Szmant, A. M., 1999. Examination of the Montastraea annularis species complex (Cnidaria: Scleractinia) using ITS and COI sequences. Marine Biotechnology, 1: 89-97.

Nylander, J. A. A., 2004. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, Sweden.

Packer, L., Gibbs J., Sheffield, C. and Hanner R. 2009. DNA Barcoding and the mediocrity of morphology. Molecular Ecology Resources, 9:42-50.

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, University of Hawaii.

Pandey, V. and Thiruchitrambalam, G., 2018. Spatial and temporal variability in the vertical distribution of gastropods on the rocky shores along the east coast of SouthAndaman Island, India. Marine Biodiversity.

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 Biológica 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 and Evolution. 29: 641-647.

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

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

Sinniger F., Reimer, J. D. and Pawlowski, J., 2008. Potential of DNA sequences to identify zoanthids (Cnidaria: Zoantharia). Zoological Science. 25:1253-1260

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, 132 (4): 326-351.

www.SID.ir

Swofford, D. L., 2003. PAUP. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

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.

Wang, L., Jiang, T. and Gusfield, D., 2000. A more efficient approximation scheme for tree alignment. SIAM Journal on Computing, 30 (1): 283- 299.

Zietkiewicz, E., Labuda, M., Sinnett, D., Glorieux, F. H. and Labuda, D., 1992. Linkage mapping by simultaneous screening of multiple polymorphic loci using Alu oligonucleotide-directed PCR. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 89: 8448–8451.

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 9:53 +0430 on Monday June 22nd 2020

www.SID.ir