Archive of SID

بررسی فیلوژنی و زمان اشتقاق گونه‌های کلاد Neogastropoda در آب‌های خلیج فارس

- **منا ایزدیان:** گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، صندوق پستی : ۶۴۱۹۹-۴۳۱۷۵
- **حسین ذوالقرنین*:** گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، صندوق پستی : ۶۴۱۹۹-۴۳۱۷۵
- **سیدمحمدباقر نبوی:** گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، صندوق پستی : ۶۴۱۹۹-۴۳۱۷۵
- **آریا اشجع‌اردلان:** گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، صندوق پستی: ۷۳۱۳۳-۱۹۸۷۹
- **سیامک یوسفی‌سیاه‌کلرودی:** گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم‌زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین- پیشوا

تاریخ دریافت: دی ۱۳۹۳ تاریخ پذیرش: فروردین ۱۳۹۴

چکیده

کلاد Neogastropoda یکی از راسته‌های زیررده Caenogastropoda از رده شکم‌پایان می‌باشد. خانواده‌هایی از این کلاد در آب‌های جنوبی ایران حضور دارند که در این بررسی برای اولین بار به مقایسه‌های فیلوژنی آن‌ها و نیز تخمین زمان اشتقاق آن‌ها پرداخته شد. به این منظور نمونه‌برداری در سال‌های ۱۳۹۲ و ۱۳۹۳ در سواحل صخره‌ای خلیج‌فارس صورت گرفت. DNA نمونه‌ها پس از شناسایی مورفولوژیک، استخراج شد، قطعه ژنی زیر واحد I سیتوکروم اکسیدازI (COI) و ۱۶S rRNA تکثیر و سپس توالی‌یابی گردید. با استفاده از نرم‌افزارهایPAUP و BEAST آنالیزهای فیلوژنی انجام شد و درخت‌های فیلوژنی Maximum Parsimony و Bayesian رسم گردید. در مجموع تعداد ۷ توالی COI و ۳ توالی ۱۶S متعلق به ٤ گونه از این کلاد به‌دست آمد که این توالی‌ها برای اولین بار از منطقه شمالی خلیج‌فارس گزارش می‌شوند. نتایج نشان داد که اعضاء کلاد Neogastropoda حاضر در خلیج فارس، در اواسط دوران ائوسن[1] اشتقاق یافته‌اند، به‌طوری‌که قدمت نیای مشترک کلاد Neogastropoda در این مطالعه در حدود ٤٧ میلیون سال پیش تخمین زده شد. هم‌چنین بررسی‌ها کلاد Neogastropoda را یک کلاد مونوفیلتیک معرفی کرد.

کلمات کلیدی: Neogastropoda، سیتوکروم اکسیداز I، فیلوژنی، اشتقاق، خلیج‌فارس

[1] Eocene

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: zolgharnein@kmsu.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

گونه‌های شکم‌پایان دریایی خلیج فارس بسیار متنوع و فراوانند و منبع غذایی مهمی را برای زنجیره بعدی مصرف کنندگان به‌وجود آورده‌اند (Al-Khayat، ۲۰۰۸). یکی از گروه‌های مهم شکم‌پایان در خلیج فارس Neogastropoda می‌باشد که اعضایی از خانواده‌های Nassariidae، Muricidae و Columbellidae متعلق به این کلاد، در این آب‌ها مشاهده می‌شوند. Neogastropodها معمولاً با سیفون ورودی طویلی که دارند قابل تشخیص هستند. هم‌چنین ساختار سیفونی بر روی پایه صدف قرار گرفته است. تقریباً تمامی اعضا کلاد Neogastropoda دریازی هستند. اکثر آن‌ها در دریاهای گرمسیری زندگی می‌کنند و اغلب آن‌ها شکارچی و عده‌ای لاشه‌خوارند. سیفون دراز آن‌ها لوله‌ای قابل ارتجاع است که از یک چین‌خوردگی جبه شکل گرفته و برای مکش آب به داخل حفره جبه استفاده می‌شود (Cunha و همکاران، ۲۰۰۹). این جانداران تنها یک دهلیز، یک کلیه و یک آبشش دندانه‌دار دارند. رشته‌های آبششی تنها بر روی یک سمت از محور مرکزی گسترش یافته‌اند. رادولا تنها دارای دو دندانک بر روی هر ردیف عرضی می‌باشد (Barnes، ۱۹۸۲).

در رده‌بندی که توسط Bouchet و Rocroi (۲۰۰۵) منتشر شد، مفهوم کلاد مورد استفاده قرار گرفت که حاصل بررسی‌های اخیر فیلوژنتیکی می‌باشد. برخلاف اکثر رده‌بندی‌های پیشین شکم‌پایان که براساس ویژگی‌های ریختی انجام شده بود و از مرتبه‌های تاکسونومیک مانند راسته، فوق راسته و زیرراسته استفاده می‌شد، در این زمینه، مفهوم کلاد، "گروه‌بندی طبیعی" جانداران براساس تحلیل‌های آماری خوشه‌ای (statistical cluster analysis) می‌باشد. در روش تاکسونومی Bouchet و Rocroi (۲۰۰۵) لفظ کلاد برای مرتبه‌ای بین رده و فوق‌خانواده استفاده می‌شود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری: نمونه‌برداری طی سال‌های ۱۳۹۲ و ۱۳۹۳ از بسترهای صخره‌ای سواحل شمالی خلیج‌فارس در زمان حداکثر جزر انجام گرفت که مشخصات ایستگاه‌های نمونه‌برداری در جدول ۱ و موقعیت ایستگاه‌های نمونه‌برداری در شکل ۱ نشان داده شده است. نمونه‌ها در اتانول ۹۸ درصد فیکس شد. از آن جایی که صدف در این گونه‌های 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 به‌طور کامل فیکس شوند (Layton، ۲۰۱۲). در نهایت نمونه‌های فیکس شده به آزمایشگاه دپارتمان جانورشناسی در دانشگاه OTAGO در کشور نیوزیلند انتقال یافتند.

جدول۱: نام و مشخصات ایستگاه‌های نمونه‌برداری

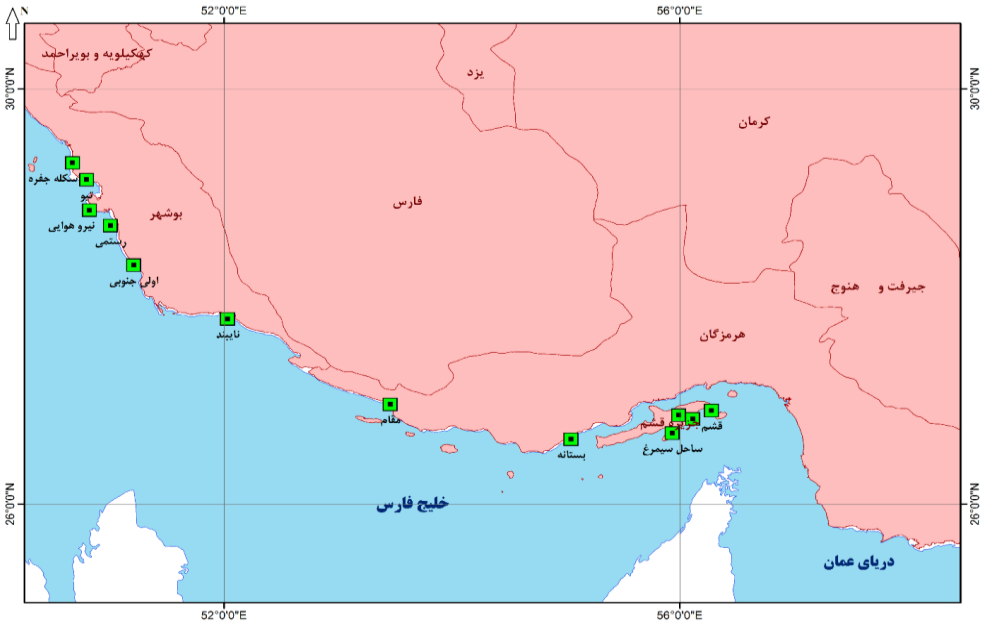
ردیف	نام ایستگاه	شهر	استان	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی
۱	نیروهوایی	بوشهر	بوشهر	"۵۰°۸۰'۶۶	"۲۸°۹۳'۵۵
۲	اسکله	بوشهر	بوشهر	"۵۰°۸۲'۴۴	"۲۸°۹۷'۳۷
۳	تیو	بوشهر	بوشهر	"۵۰°۸۲'۵۸	"۲۸°۹۸'۱۳
۴	بندر رستمی	تنگستان	بوشهر	"۵۱°۰۰'۸۱	"۲۸°۵۶'۶۶
۵	اولی جنوبی	دیر	بوشهر	″۵۱°۹۰′۱۴	″۲۷°۸۳′۳۳
۶	نایبند	عسلویه	بوشهر	″۵۲°۶۷′۴۱	″۲۷°۴۲′۰۲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

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، ۱۹۹۵)، Sea Shore of Kuwait Persian Gulf

www.SID.ir

Archive of SID

Encyclopedia of Marine Gastropods ،(Jones ،۱۹۸۶) (Robin، ۲۰۰۸) و اطلس نرم‌تنان خلیج‌فارس (حسین‌زاده صحافی و همکاران، ۱۳۷۹) تاحدگونه شناسایی شدند.



شکل ۱: موقعیت ایستگاه‌های نمونه‌برداری

مطالعات مولکولی: پس از شناسایی مورفولوژیک نمونه‌ها، استخراجDNA با استفاده از پودر Chelex انجام شد. پس از ارزیابی کمی و کیفی DNA استخراج شده به‌وسیله الکتروفورز و اسپکتروفوتومتر، تکثیر قطعه ژنی COI وrRNA ۱۶S 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. 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 و Møller ، ۲۰۰۶). در مواردی که نمونه‌ها از کیفیت مناسبی برخوردار نبودند، از روش و مواد دیگری در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده شد. به‌طور مثال برای رفع عمل محدودکننده‌ها از BSA، که در تکثیر ژن‌های نرم‌تنان کاربرد دارد، استفاده شد. محصول PCR مورد خالص‌سازی قرار گرفت و جهت توالی یابی در دانشگاه OTAGO ارسال شد.

ثبت توالی‌ها در پایگاه داده‌ها: به این منظور ابتدا توالی‌ها در سایت NCBI[1]، BLAST[2] 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[3] توالی‌های به‌دست آمده، توسط نرم‌افزار CLC Sequence Viewer v6.5.4 (Knudsen و همکاران، ۲۰۱۲)[4] تعیین شد. سپس از طریق سایت DDBJ[5] توالی‌ها در پایگاه داده NCBI ثبت گردید. در مجموع ۷ توالی COI و ۳ توالی ۱۶Sخوانا و قابل تحلیل به‌دست آمد که این توالی‌ها برای نخستین بار از منطقه خلیج‌فارس گزارش شده‌است. مراحل ثبت چهار مورد از این توالی‌ها تاکنون در بانک ژن جهانی به پایان رسیده و با شماره‌های دسترسی[6] LC060521، LC029913.1، LC027607.1 و LC060622 درسایت www.ncbi.nih.gov قابل مشاهده هستند.

رسم درخت فیلوژنی: آنالیز فیلوژنی با استفاده از روش‌های Maximum Parsimony و Bayesian انجام شد. پیش از انجام

[1]NCBI=National Center for Biotechnology Information
[2]Basic Local Alignment Search Tool
[3]Fram
[4] www.clcbio.com
[5]DDBJ=DNA Data Bank of Japan
[6]Accession number

www.SID.ir

Archive of SID

آنالیزهایMP و BI، با استفاده از برنامه MrModeltest v2.3 (Nylander، ۲۰۰۴) و براساس معیار اطلاعاتی AIC (Akaike Information Criterion) و AICc 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.

کلیه توالی‌ها جهت استفاده در نرم‌افزارهای فیلوژنی به فرمت Nexus درآمد. آنالیز MP برای داده‌ها به همراه توالی‌های مرجع با استفاده از نرم‌افزار PAUP[1] نسخه 4b10 (Swofford، ۲۰۰۳) انجام گرفت. این نرم‌افزار که نرم‌افزار 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.

از نرم‌افزار BEAST v1.8.2 (Drummond و همکاران، ۲۰۱۲) برای تخمین زمان جدیدترین نیای مشترک (TMRCA)[2] برای گروه‌های موردنظر 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 و Huelsenbeck، ۲۰۰۳) می‌باشد (Sotelo و همکاران، ۲۰۰۹). جهت تنظیم ساعت مولکولی، پس از بررسی منابع موجود، از نرخ جایگزینی[3] 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.

نتایج

پس از شناسایی مورفولوژیک، مشخص شد که نمونه‌ها متعلق به چهار گونه *Thais savignyi*، *Mitrellablanda*، *Nassariuspersicus* و *Hexaplex* sp. هستند که تصاویر آن‌ها در شکل ۲ آمده است.

در مجموع ۷ توالی COI و ۳ توالی ۱۶S خوانا و قابل تحلیل به‌دست آمد که این توالی‌ها برای نخستین بار از منطقه خلیج فارس گزارش شده است. مراحل ثبت چهار مورد از این توالی‌ها تاکنون در بانک ژن جهانی به پایان رسیده و با شماره‌های دسترسی[4] LC060521، LC029913.1، LC027607.1 و LC060622 در سایت www.ncbi.nih.gov قابل مشاهده هستند.

درخت فیلوژنی رسم شده از ۷ توالی COI به‌دست آمده و توالی‌های گزارش شده پیشین نشان داد که نمونه‌های HoSp4 و BuAu36 که به‌عنوان گونه *Thalessasavignyi* شناسایی شده بودند، با توالی این گونه از امارات متحده عربی مطابقت زیادی داشته و با قرار گرفتن در کلادی با ارزش بوت استرپ MP=۱۰۰ و احتمال پسین ۱ مطالعات مورفولوژیک را تایید کردند. از سوی دیگر نمونه HoAu1 از نظر مورفولوژیک در حد جنس *Hexaplex* شناسایی شده بود، اما تنها یک گونه از این جنس در بانک ژن وجود داشت که تفاوت زیادی را با گونه مورد نظر نشان داد. این نمونه با گونه‌های مختلف جنس *Chicoreus*، که همانند جنس *Hexaplex* متعلق به خانواده Muricidae می‌باشد، در یک کلاد با ارزش بوت استرپ MP=۶۸ و احتمال پسین ۱ قرار گرفت. اما با آن‌که بیش‌ترین شباهت را با گونه *Chicoreusramosus* از هند نشان داد، با هیچ‌یک از گونه‌های این جنس نیز مطابقت کافی نداشت.

بررسی‌های فیلوژنی در مورد نمونه‌های HoWi20، HoWi22 و BuAu30 که هر سه از نظر مورفولوژیک به عنوان گونه *Nassariuspersicus* شناسایی شده بودند، تفاوت‌هایی بین نمونه‌های استان هرمزگان و بوشهر نشان داد. به این ترتیب که دو نمونه استان هرمزگان، HoWi20 و HoWi22 با شباهت زیاد به یکدیگر تفاوت بسیار زیادی با تمامی گونه‌های جنس *Nassarius* نشان دادند و حتی با هیچ یک از آن‌ها گروه مونوفیلتیک تشکیل ندادند. درحالی‌که نمونه BuAu30 از بوشهر با گونه *Nassariussufflatus* از چین گروه مونوفیلتیک تشکیل داد و هم‌چنین با سایر گونه‌های این جنس یک کلاد تشکیل داد. شایان ذکر است هیچ توالی از گونه *Nassariuspersicus* در بانک ژن جهت مقایسه وجود نداشت.

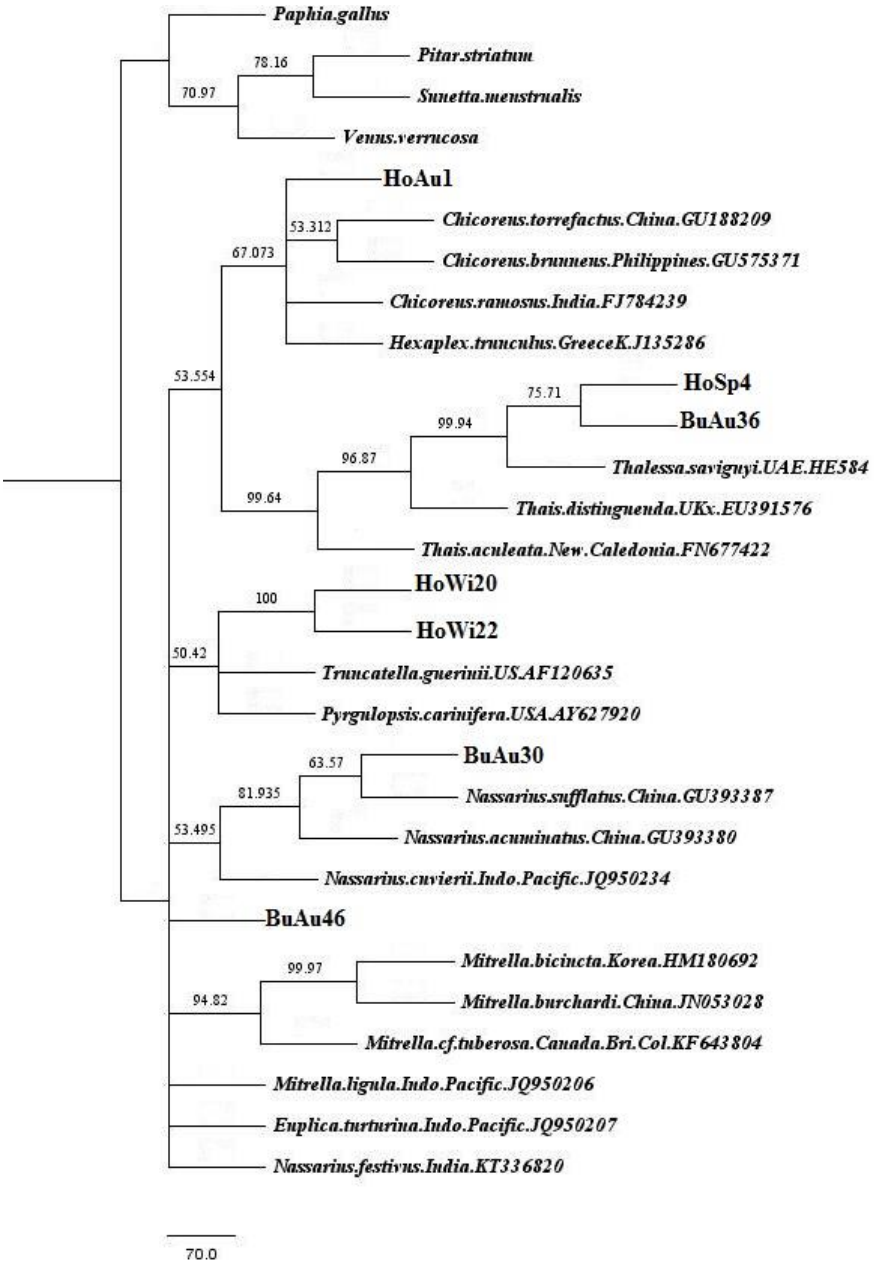
نمونه BuAu46 که در بررسی مورفولوژیک گونه *Mitrellablanda* تشخیص داده شده بود، اگرچه با گونه‌های جنس *Mitrella* در یک کلاد قرار گرفت، با هیچ‌یک از آن‌ها گروه مونوفیلتیک تشکیل نداد. این نمونه بیش‌ترین شباهت را با

[1] Phylogenetic Analysis Using Parsimony
[2] Time to the Most Recent Common Ancestor (TMRCA)
[3] Substitutional Rates
[4] Accession number

www.SID.ir

Archive of SID

گونه *Euplicaturturina* از منطقه اقیانوسی هند- آرام نشان داد و با آن در یک گروه مونوفیلتیک قرار گرفت. در این مورد نیز توالیی از گونه *Mitrellablanda* در بانک ژن وجود نداشت. نمونه BuAu46 با هیچ‌یک از گونه‌های دیگر از خانواده Columbelldidae نیز مطابقت نداشت. درخت‌های رسم شده برای این کلاد در شکل‌های ۳ تا ۵ نشان داده شده است.



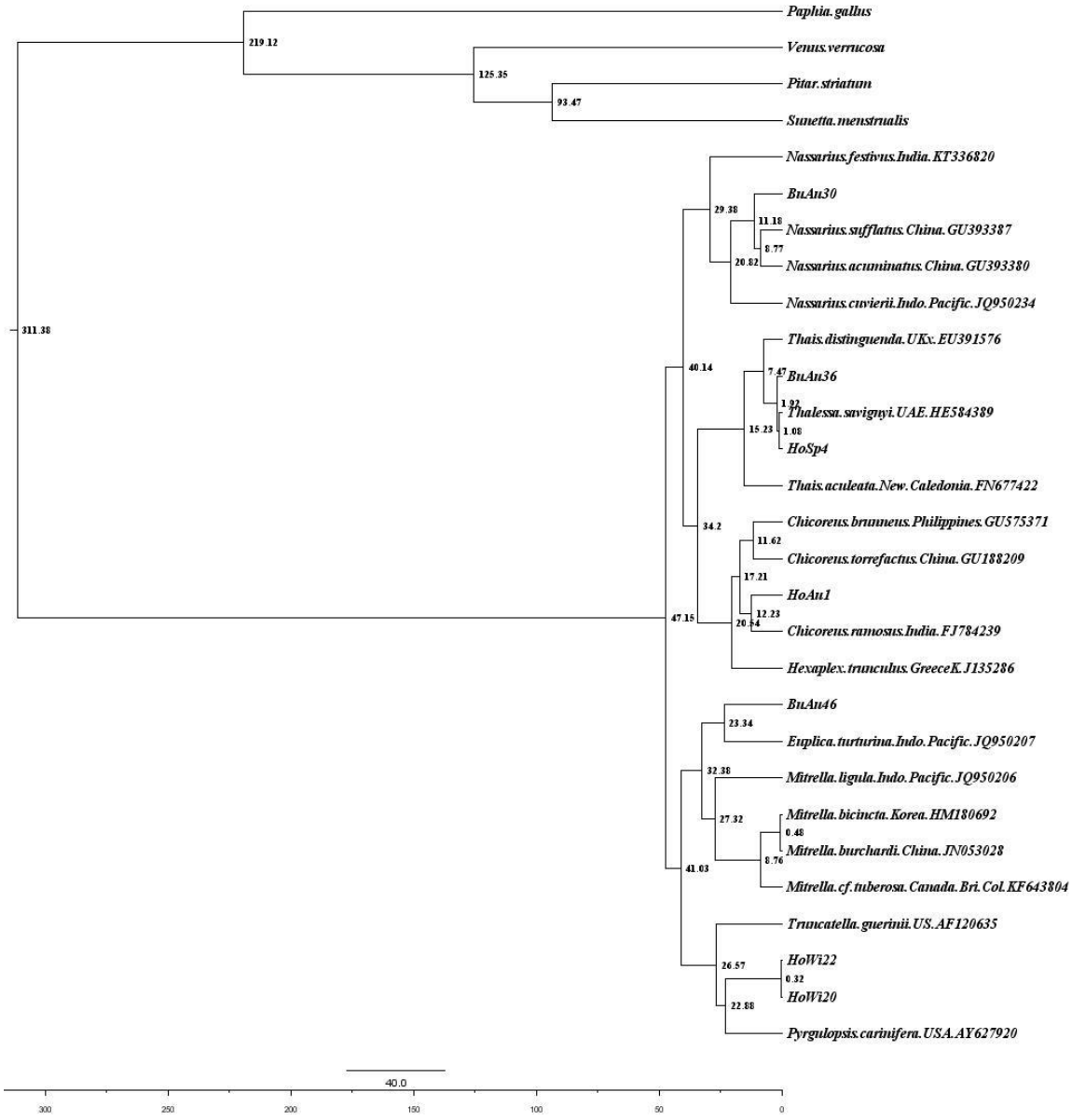
شکل ۳: درخت MP رسم شده با استفاده از نرم‌افزار PAUP برای توالی قطعه ژنی COI

با استفاده از نرم‌افزار BEAST قدمت نزدیک‌ترین نیای مشترک کلاد Neogastropoda، ۴۷/۱۵ میلیون سال پیش تخمین زده شد. زمان انشعاب نیای خانواده Muricidae، ۳۴/۲۰ میلیون سال پیش برآورد شد. زمان واگرایی *Thais* به ۱۵/۲۳ میلیون سال پیش بازمی‌گردد. ۲۹/۳۸ میلیون سال زمان اشتقاق در کلاد *Nassarius* است. به همین ترتیب زمان برآورد

www.SID.ir

Archive of SID

شده برای ریشه درخت ۳۱۱ میلیون سال پیش می‌باشد (شکل ۴).

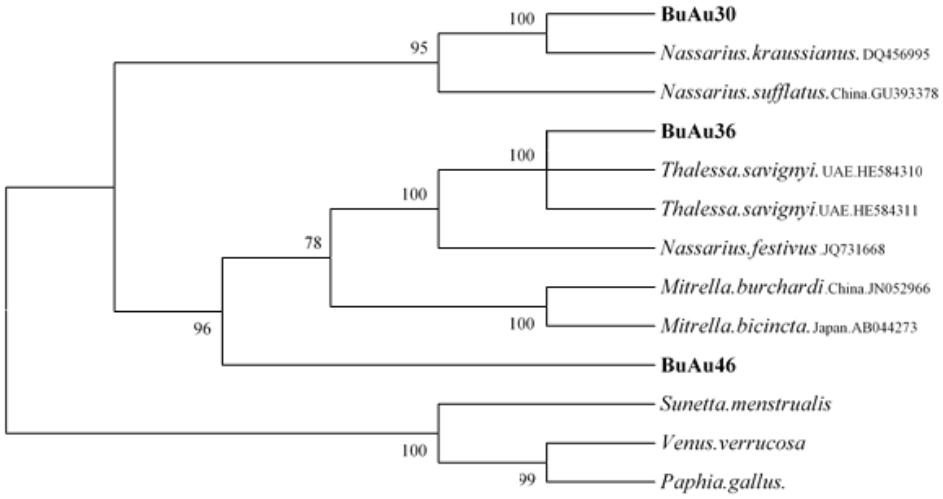


شکل۴: درختBA رسم شده با استفاده از نرم‌افزار BEAST برای توالی قطعه ژنیCOI

از این کلاد ۳ توالی ۱۶S rRNAبه‌دست آمد. در این مورد نیز تطبیق نمونه BuAu36 با گونه *Thalessa savgnyi* از امارات واضح بود. نمونه BuAu46 مجدداً بدون تطابق با گونه‌های مختلف جنس *Mitrella* با آن‌ها در یک کلاد قرار گرفت. درمورد ژن ۱۶S rRNAنیز توالی از گونه*Nassarius persicus* گزارش نشده بود و نمونه BuAu30 با سایر گونه‌های جنس *Nassarius* در یک کلاد قرار گرفت. درخت رسم شده برای این قطعه ژنی در شکل ۵ نمایش داده شده است.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۵: درخت MP رسم شده با استفاده از نرم‌افزار PAUP توالی قطعه ژنی ۱۶S rRNA

بحث

در این پژوهش برای نخستین بار فیلوژنی مولکولی گونه‌های متعلق به کلاد Neogastropoda در آب‌های خلیج فارس بررسی شد، تمامی مطالعات گذشته برای رده‌بندی و شناسایی آن‌ها، تنها با توجه به ویژگی‌های ریختی این موجودات صورت گرفته بود. از این‌رو هیچ توالی گزارش شده‌ای از آب‌های ایران برای مقایسه و مطالعه بیش‌تر در دسترس نبود. به‌همین علت حداکثر تلاش انجام گرفت تا با یافتن توالی‌هایی از گونه‌های نمونه‌های مورد بررسی از نزدیک‌ترین آب‌ها به این ناحیه جغرافیایی، شبیه‌ترین توالی‌ها استخراج شود و برای رسم درخت و مقایسه به‌کار رود. در برخی موارد اطلاعاتی از گونه‌های بررسی شده در سایر کشورهای همجوار با خلیج‌فارس موجود بود، در پاره دیگر از موارد توالی‌هایی از کشورهای حاشیه اقیانوس هند به‌دست آمد. ولی در موارد دیگری هیچ توالی از آب‌های اطراف در بانک ژن ثبت نشده بود و حتی در برخی موارد حتی هیچ توالی از گونه مورد نظر 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 Neogastropoda نمونه‌های HoSp4 و BuAu36 همان‌طور که مطالعات مورفولوژیک نیز نشان داده بود با گونه *Thalessa savignyi* از امارات متحده عربی مطابقت زیادی داشت، اما تفاوت موجود بین آن‌ها درحدی است که باید احتمال پدید آمدن گونه‌ای جدید را نیز در نظر گرفت و با بررسی‌های بیش‌تر نظر قاطع‌تری ارائه نمود. در این مورد جهت بررسی منشاء نمونه‌های مذکور، توالی‌های مناسب در بانک ژن وجود نداشت. هیچ توالی از گونه *Nassarius persicus* در بانک ژن وجود نداشت تا بتوان برای مقایسه نمونه‌های HoWi20، HoWi22 و BuAu30 که بررسی‌های مورفولوژیک آن‌ها را متعلق به این گونه دانسته بود، از آن استفاده کرد. به‌همین علت از سایر گونه‌های جنس *Nassarius* در رسم درخت استفاده شد که نمونه متعلق به استان بوشهر BuAu30 با آن‌ها در یک کلاد قرار گرفت و طبیعتاً با هیچ‌یک از آن‌ها تطابق نداشت. اما نکته قابل ملاحظه آن است که دو نمونه دیگر که متعلق به استان هرمزگان بودند، ضمن شباهت زیاد با یکدیگر تفاوت فاحشی با تمامی گونه‌های این جنس نشان دادند و دریک کلاد مجزا قرار گرفتند. این تفاوت لزوم بررسی‌های بیش‌تر و دقیق‌تر برروی این گونه را، به‌خصوص در آب‌های استان هرمزگان نشان می‌دهد. در مورد نمونه BuAu46 نیز هیچ توالی از گونه *Mitrella blanda* در بانک ژن وجود نداشت و این نمونه با سایر گونه‌های این جنس در یک کلاد قرار گرفت و طبیعتاً با هیچ‌یک از آن‌ها مطابق نبود. نمونه HoAu1 در بررسی‌های مورفولوژیک در حد جنس *Hexaplex* شناسایی شد، با آن که این جنس دارای تعداد زیادی گونه می‌باشد، تمامی ۱۴۲ توالی موجود در بانک ژن از این جنس متعلق به گونه *Hexaplex trunculus* بود که در رسم درخت نیز از آن استفاده شد، اما تفاوت زیادی با نمونه مورد بررسی نشان داد (شکل‌های ۳ تا ۵).

www.SID.ir

Archive of SID

فسیل‌های موجود از اعضا کلاد Neogastropoda تقریباً کامل هستند و نظریه تعلق مبدا تکاملی آن‌ها به اوایل دوره کرتاسه را که مورد تایید گسترده‌ای می‌باشد، حمایت می‌کنند. هم‌چنین این نظریه بیان می‌کند که اعضا این کلاد در اواخر دوره کرتاسه و دوره پالئوسن به‌سرعت تنوع یافته‌اند (Cunha و همکاران، ۲۰۰۹).

آنالیزهای حاصل از نرم‌افزار BEAST نشان داد که اعضاء کلاد Neogastropoda حاضر در خلیج فارس، در اواسط دوران ائوسن (Eocene) اشتقاق یافته‌اند به‌طوری‌که قدمت نیای مشترک کلاد Neogastropoda در این مطالعه در حدود ۴۷ میلیون سال پیش تخمین زده شد. بررسی‌ها کلاد Neogastropoda را مونوفیلتیک نشان داد و نتایج حاصل از آنالیزهای مولکولی با نتایج رده‌بندی سنتی مطابق بود. Strong (۲۰۰۳) نیز در مطالعاتی که بر روی فیلوژنی شکم‌پایان انجام داد، بیان کرد که کلاد Neogastropoda مونوفیلتیک می‌باشد. این نتایج با نتایج مطالعه حاضر کاملاً مطابقت دارد.

منابع

۱. **حسین‌زاده صحافی، ه.؛ دقوقی، ب. و رامشی، ح.، ۱۳۷۹.** اطلس نرمتنان خلیج فارس. موسسه تحقیقات شیلات ایران، تهران. ۲۴۸ صفحه.

2. **Al-Khayat, J.A., 2008.** Molluscs of the state of Qatar. Qatar Biodiversity Newsletter. Vil. 2, No. 1, pp: 1-5.
3. **Barnes, R.D., 1982.** Invertebrate Zoology. Philadelphia, PA: Holt-Saunders International. 376 p.
4. **Bosch, D.; Dance, S.P.; Moolenbeek, R. and Oliver, P.G., 1995.** Seashells of Eastern Arabia Motivate Publishing. pp: 24-186.
5. **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). Vol. 47, No. 1-2, pp: 1-397.
6. **Cunha, R.L.; Grande, C. and Zardoya, R., 2009.** Neogastropod phylogenetic relationships based on entire mitochondrial genomes. BMC Evolutionary Biology. Vol. 9, 210 p.
7. **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.
8. **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.
9. **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.
10. **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.
11. **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. 2 p.
12. **Layton, K., 2012.** Examining patterns of genetic variation in Canadian marine molluscs through DNA barcodes. Master of Science Thesis in Integrative Biology, University of Guelph. 84 p.
13. **McPherson, M.J. and Møller, S.G., 2006.** PCR Second Edition. Taylor & Francis Group. Second edition. 292 p.
14. **Nylander, J.A.A., 2004.** MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, Sweden. 279 p.
15. **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. 208 p.
16. **Robin, A., 2008.** Encyclopedia of Marine Gastropods, Ed. IKAN Unterwasser-Archive, ConchBooks. 480 p.
17. **Rodríguez, F.; Oliver, J.F.; Marín, A. and Medina, J.R., 1990.** The general stochastic model of nucleotide substitution. J TheorBiol. Vol. 142, pp: 485-501.
18. **Ronquist, F. and Huelsenbeck, J.P., 2003.** MRBAYES3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics. Vol. 19, pp: 1572-1574.
19. **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. Vol. 53, No. 1, pp: 314-319.
20. **Strong, E.E., 2003.** ReWningmolluscan characters: morphology, character coding and a phylogeny of the Caenogastropoda. Zool. J. Linn. Soc. Vol. 137, pp: 447-554.

www.SID.ir