



فیلوژنی مولکولی حلزون مخروطی دریایی *Conus frigidus* Reeve, 1848 از سواحل خلیج فارس (لارک و قشم) با استفاده از بارکدگذاری DNA

حلیمه رجبی^{۱*}، حسین ذوالقرنین^۲، محمد تقی رونق^۳، احمد سواری^۴، محمد شریف رنجبر^۵

تاریخ پذیرش: شهریور ۹۵

تاریخ دریافت: خرداد ۹۵

چکیده

حلزون مخروطی *Conus frigidus* شکم‌پای دریایی شکارگر و سمی از کلاد *Virgiconus* است که در سواحل قشم و لارک یافت می‌شود. گونه‌های این کلاد از نظر ریخت‌شناختی بسیار شبیه به هم هستند و گاهی به خطا نامگذاری می‌شوند. بنابراین، شناسایی مولکولی آن‌ها حائز اهمیت است. در این مطالعه، استخراج DNA به روش CTAB انجام شد. از قطعه ژن COI به عنوان بارکد در شناسایی این گونه استفاده شد. پس از تکثیر قطعه ژن و توالی‌یابی آن، درخت‌های تبارشناسی با استفاده از نرم‌افزارهای MEGA 6 و MrBayes 3.2 ترسیم شدند. نتایج نشان داد توالی‌های نوکلئوتیدی قطعه ژن COI گونه *C. frigidus* در دو ساحل قشم و لارک با توالی گونه *C. frigidus* از ناحیه اندوپاسفیک تنها در یک نوکلئوتید اختلاف داشتند. رسم درخت تبارشناسی گونه‌های کلاد *Virgiconus* بیانگر تفاوت چشمگیر این گونه با گونه‌های مختلف در این کلاد بود. از این رو، به نظر می‌رسد که خواستگاه *C. frigidus* خلیج فارس، از گونه‌های مشابه آن در سواحل اقیانوس هند و آرام باشد. زمانی که شناسایی گونه‌ها به دلیل شباهت‌های ریخت‌شناسی در کلاد *Virgiconus* مشکل می‌شود، شناسایی بر اساس ژن COI در تفکیک گونه‌ها بسیار مفید خواهد بود.

واژگان کلیدی: *COI*, *Conus frigidus*, خلیج فارس، فیلوژنی.

- ۱- دانشجوی دکتری زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران.
- ۲- دانشیار گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران.
- ۳- استادیار گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران.
- ۴- استاد گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران.
- ۵- استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه هرمزگان، بندر عباس، ایران.

* نویسنده مسئول: halimeh.rajabi@gmail.com

مقدمه

اجداد و شجرنامه جانداران است (Kohn, 2010; Biggs et al., 1990). الگوی انشعاب شاخه‌های درخت که نشان دهنده واگرایی تکاملی است، فیلوژنی نامیده می‌شود (Duda and Palumbi, 1999; Duda et al., 2001; Puillandre et al., 2014, 2015). قبل از بررسی‌های مولکولی، برای استنباط فیلوژنی داده‌ها، می‌توان از منابعی مانند ریخت‌شناسی، رفتار، توزیع جغرافیایی و غیره استفاده کرد (Kohn, 1990; Schulz et al., 2004; Franklin et al., 2007; Salisbury et al., 2010). امروزه داده‌های مولکولی که به شکل توالی‌های DNA یا پروتئین وجود دارند، قادر هستند چشم‌انداز تکاملی بسیار مناسبی از موجودات فعلی را نشان دهند (Kaas et al., 2010). زیرا همان طور که موجودات تکامل (نمو) می‌یابند، انباشته شدن جهش‌های مواد ژنتیکی، در طول زمان موجب تغییر فنوتیپی و ریختی موجودات می‌شوند. از این رو، ژن‌ها که محل حفظ جهش‌های انباشته شده هستند، می‌توانند به عنوان فسیل‌های مولکولی در نظر گرفته شوند. با بررسی مقایسه‌ای فسیل‌های مولکولی تعدادی از موجودات مرتبط، می‌توان تاریخچه تکاملی ژن‌ها و حتی جانداران را آشکار کرد (Duda and Palumbi, 1999; Espiritu,

گرایش بیشتر پژوهشگران به مباحث تنوع زیستی و تکامل موجب شده است که شناسایی گونه‌ها اهمیت بیشتری پیدا کند. بررسی‌های اولیه در شناسایی گونه‌ها معمولاً با توجه به ویژگی‌های ریخت‌شناختی صورت می‌گیرد و سپس ارتباطات فیلوژنتیکی با استفاده از داده‌های مولکولی، تخمین زده می‌شود (Kohn, 2003; Franklin et al., 2007; Lorenz and Puillandre, 2015).

در فرآیند گونه‌زایی، در سطح پایین‌دستی تکامل، آنالیزهای ژنتیک جمعیت و در سطوح بالاتر آنالیزهای فیلوژنتیکی مطرح است (Da Motta, 1991; Olivera, 2006; Tucker and Tenorio, 2009). آنالیز توالی‌های زیستی بر پایه اصول محکم تکامل استوار است. معمولاً تشابهات (Similarities) و واگرایی (Divergences) توالی‌های زیستی مرتبط با یکدیگر که با هم‌ردیفی (انطباق) توالی مشخص می‌شوند، باید در قالب درخت‌های فیلوژنتیکی مورد تفسیر قرار گیرند. از این رو فیلوژنی مولکولی حوزه‌ای بنیادی و مهم در بیوانفورماتیک محسوب می‌شود (Puillandre et al., 2012 a,b). فیلوژنتیک مطالعه تاریخچه تکاملی موجودات زنده با استفاده از نمودارهای (دیگرام‌های) درختی شکل برای نشان دادن

شاخه نرم‌تنان با حدود ۸۰۳ گونه شناخته شده، اشاره کرد (WoRMS, 2014). گرچه تنوع زیادی در ویژگی‌های ریختی صدف گونه‌های حلزون مخروطی وجود دارد، اما تمامی آن‌ها در یک جنس یعنی *Conus* گنجانده شده‌اند (Da Motta, 1991; Olivera, 2006; Tucker and Tenorio, 2013). به همین دلیل در بین زیست‌شناسان تکاملی علاقه بسیار زیادی برای انجام پژوهش‌های مولکولی بر گونه‌های این جنس وجود دارد. اولین مطالعه در ارتباط با فیلولوژنی مولکولی حلزون‌های مخروطی در سال ۱۹۹۹ توسط Monje و همکاران و همچنین Duda و Palumbi انجام شد (Duda and Palumbi, 1999; Monje et al., 1999). پس از آن Duda و Kohn در سال ۲۰۰۵، از حدود ۱۳۸ گونه در بررسی فیلولوژنی مولکولی استفاده کردند که شامل حدود ۲۰٪ از گونه‌های موجود بود. اخیراً مقاله‌ای در ارتباط با تکامل و فیلولوژنی مولکولی حلزون‌های مخروطی منتشر شد و طبقه‌بندی جدیدی را برای آن‌ها ارائه کرد. در این طبقه‌بندی بر خلاف تاکسونومی سنتی که خانواده Conoidae را تنها شامل یک جنس *Conus* می‌داند، با ابزار مولکولی و آنالیزهای متعدد نرم‌افزاری، ۴ جنس معرفی شد که عبارت بودند از: *Conus*,

et al., 2001; Duda et al., 2001; Duda and Kohn, 2005). طی سال‌های اخیر، بارکدگذاری DNA، به عنوان روشی برای شناسایی تاکسون‌ها به شکل چشمگیری در میان تاکسونومیست‌ها، اکولوژیست‌ها و زیست‌شناسان تنوع زیستی، مورد توجه قرار گرفته است. این روش ابزار قدرتمندی برای شناسایی گونه‌های جانوری است و می‌تواند به عنوان مکمل تاکسونومی سنتی مورد استفاده قرار گیرد (Hebert et al., 2003). تا کنون پژوهشگران بسیاری روش بارکدگذاری را برای شناسایی گونه‌های مختلف حلزون‌های مخروطی دریایی به کار برده‌اند (Duda and Palumbi, 1999; Duda and Kohn, 2005; Bandyopadhyay et al., 2006; Cunha et al., 2008; Duda, 2008; Espino et al., 2008; Nam et al., 2009; Biggs et al., 2010; Puillandre et al., 2010; Pereira et al., 2010; Kaufenstein et al., 2011; Kraus et al., 2012). مطالعه ژن‌های میتوکندریایی نرم‌تنان نشانگر تغییرات گسترده‌ای در مقایسه با ژن‌های میتوکندریایی سایر جانوران است (Boore, 1999; Kurabayashi and Ueshima, 2000; Boore et al., 2004; Grande et al., 2008). از این میان می‌توان به حلزون‌های مخروطی دریایی، یکی از متنوع‌ترین گروه‌ها در

است، در مطالعه حاضر، از ژن سیتوکروم اکسیداز یک (COI) به عنوان بارکد، برای شناسایی حلزون‌های مخروطی استفاده شد. حلزون‌های مخروطی به دلیل وجود پپتیدهای دارویی و ضد درد اختصاصی در هر گونه و تبدیل شدن آن‌ها به ابزارهای مطالعات دارویی از اهمیت زیادی برخوردار بوده، توجه بسیاری از پژوهشگران را به خود جلب کرده‌اند (Walker et al., 1999; Terlau and Olivera, 2004; Olivera, 2006; Kaas et al., 2010; Wu et al., 2010; Hu et al., 2011). همچنین بررسی‌های فیلوژنتیکی و شناسایی مولکولی گونه‌های هر منطقه می‌تواند پایه مطالعات بعدی را بنیان‌گذاری کند. مطالعات انجام شده در سواحل خلیج فارس، تا کنون صرفاً بر اساس ریخت‌شناسی بوده است (حسین‌زاده صحافی و همکاران، ۱۳۷۹؛ نبی‌پور و همکاران، ۱۳۸۹). از این رو، پژوهش حاضر، اولین مطالعه در زمینه فیلوژنی مولکولی گونه *C. frigidus* است که تا کنون گزارشی از بررسی‌های ریخت‌شناختی و مولکولی آن، در سواحل خلیج فارس ثبت نشده است و بعضاً به دلیل تشابه الگوی رنگی صدف، آن را تحت عنوان *C. terebra*، *C. virgo* و *C. flavius*، که از اعضای دیگر کلاد *Virgiconus* هستند،

Californiconus، *Conasprella*، *Profundiconus* این ۴ جنس ۷۱ زیر جنس دارند (Puillandre et al., 2015). آنالیزهای فیلوژنی مولکولی تایید کرده‌اند که حلزون‌های مخروطی دریایی یک گروه ناهمگن هستند که با وجود هموژن بودن ویژگی‌های ریختی، گونه‌زایی در آن‌ها نتیجه فرآیندهای تکاملی متنوعی است که به مباحث اکولوژی و جغرافیایی نیز مربوط می‌شود (Da Motta, 1991; Olivera, 2006). تنوع گونه‌ای بالا در حلزون‌های مخروطی دریایی همچنین می‌تواند به دلیل کاهش پراکندگی در لاروهای لیستوتروف و غیرپلانکتونی باشد (Kohn, 2003). ۶۰ درصد گونه‌های حلزون مخروطی دریایی متعلق به نواحی گرمسیری و زیرگرمسیری اقیانوس هند و آرام هستند (Duda and Kohn, 2005). یکی از این گونه‌ها که در ناحیه بین جذر و مدی سواحل جزایر لارک و قشم جزء گونه‌های غالب به شمار می‌آید *C. frigidus* است. اما با وجود فراوانی این گونه، تا کنون گزارشی از حضور آن در این نواحی ثبت نشده است. از آنجایی که تکنیک‌های توالی‌یابی جدید و بررسی‌های مولکولی، فرصت‌های بی‌شماری را برای مطالعات ژنتیکی جانداران فراهم کرده

سپس نمونه‌های جمع‌آوری شده همراه با آب دریا به آزمایشگاه منتقل شدند و مورد مطالعه ریخت‌شناختی قرار گرفتند. سپس در شرایط استریل تشریح شدند و بافت عضله پای نمونه‌ها برای مطالعه ژنتیکی جداسازی و در اتانول ۹۶٪ قرار داده شد (Duda et al., 2001).

مطالعات ریخت‌شناختی

برای مطالعه ریخت‌شناختی دو فاکتور مهم مورد بررسی قرار گرفت:

الف) آناتومی صدف شامل طرح صدف (بر اساس مقایسه الگوی رنگ‌آمیزی)، طول صدف (با استفاده از کولیس) و شکل صدف با توجه به چهار فاکتور نوع پیچش صدف (Whorl)، حالت مخروط (Spire)، شانه صدف (Shoulder) و دهانه مخروط (Aperture) بررسی شد.

ب) آناتومی خود حلزون مخروطی که شامل سیفون، خرطوم، دهان، پا و پایه چشمی است، نیز مورد بررسی قرار گرفت (Duda, 2008; Franklin et al., 2007; Gong et al., 2012; Lorenz and Puillandre, 2015).

مطالعات ژنتیکی

استخراج DNA

تعداد ۷ نمونه از نمونه‌های جمع‌آوری شده، قبل از انجام مراحل استخراج، از اتانول خارج

نامیده‌اند. همچنین در این پژوهش مقایسه توالی‌های نوکلئوتیدی *C. frigidus* از دو ساحل لارک و قشم با سایر توالی‌های ثبت شده از همین گونه و کلاد *Virgiconus* در پایگاه داده‌ای NCBI و BOLD System انجام شد. با توجه به این که اثرات مطلوب ضد دردی پپتیدهای جدا شده از *C. frigidus* با آزمون فرمالین بر روی موش سوری توسط پژوهشگران مطالعه حاضر در دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور به اثبات رسیده است، معرفی این گونه و ارائه جایگاه آن از نظر فیلولوژی در مقایسه با هم‌گونه‌های آن در نقاط دیگر جهان ضرورت دارد.

مواد و روش‌ها

حلزون‌های مخروطی دریایی گونه *C. frigidus* از سواحل جزایر قشم و لارک به ترتیب با موقعیت‌های جغرافیایی $26^{\circ} 55' 63'' N$ و $56^{\circ} 15' 20'' E$ و $26^{\circ} 41' 1'' N$ و $55^{\circ} 55' 71'' E$ جمع‌آوری شدند. بر اساس جداول زمان‌بندی جزر و مد، در زمان بیشینه جزر و با توجه به این که حلزون‌های مخروطی دریایی متعلق به نواحی بین جزر و مدی هستند، نمونه‌ها به صورت گشت و جستجو در منطقه جمع‌آوری شدند.

جذب نوری نمونه در طول موجهای ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر به دست آمد و نسبت جذب نوری ۲۶۰/۲۸۰ به وسیله دستگاه اندازه‌گیری شد و در پایان غلظت DNA با استفاده از رابطه ۱ محاسبه شد.

رابطه ۱:

$$C_{DNA}(\text{ng/mL}) = D \times A_{260} \times 50$$

C_{DNA} : غلظت DNA؛ D: رقت؛ A: نسبت جذب.

برای بررسی کیفیت DNA نمونه‌ها، از ژل آگارز ۱٪ و الکتروفورز افقی استفاده شد (Brown et al., 2005).

واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز

قطعه ژن COI با استفاده از جفت آغازگرهای ارائه شده در جدول ۱ تکثیر و توالی‌یابی شد (Folmer et al., 1994).

واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (۱۰X)، ۰/۵ میکرولیتر dNTP (۱۰mM)، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر

شده، پس از خشک شدن به قطعات بسیار کوچک تقسیم شد و همراه با حدود ۷۰ میکرولیتر محلول SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) ۱۰٪، ۶۳۰ میکرولیتر CTAB (Cetyltrimethylammonium Bromide) و ۱۰ میکرولیتر پروتئیناز K به مدت یک شب در بن‌ماری در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس به میکروتیوب‌های حاوی نمونه، ۲۰ میکرولیتر بتامرکاپتواتانول، ۲۴۰ میکرولیتر کلرید سدیم ۵ مولار و حدود ۲۵۰ میکرولیتر کلروفرم افزوده شد و پس از سانتریفیوژ با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه، فاز رویی دور ریخته شد و برای رسوب دادن DNA، به نمونه‌ها ۷۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد افزوده شد. برای شست‌وشوی DNA از ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰٪ استفاده شد (Duda et al., 2001; Brauer et al., 2012).

ارزیابی کمی و کیفیت DNA استخراج شده برای تعیین کمی و خلوص DNA نمونه‌ها از روش اسپکتوفتومتری استفاده شد. مقدار

جدول ۱: آغازگرهای مورد استفاده

آغازگر	توالی
آغازگر پیشرو (LCOI490)	5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'
آغازگر معکوس (LCO2198)	5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'

شدند. سایر توالی‌های ثبت شده از همین گونه و سایر گونه‌های حلزون مخروطی دریایی از کلاد *Virgiconus* نیز از سایت BOLD System و NCBI استخراج شدند. هم‌ردیف‌سازی توالی‌ها در نرم‌افزار Clustal W انجام شد. بهترین مدل برای تفسیر و آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار J Model Test 0.1 بررسی شد. درخت فیلولوژی تجزیه و تحلیل ماتریس داده‌ها بر اساس روش‌های مبتنی بر فاصله یا پیوند همجواری (Neighbour Joining)، ماکزیمم احتمال (Maximum Likelihood) با استفاده از مدل Tamura et al.,) Mega 6 در نرم‌افزار K2P Posterior (2013) و روش احتمال پسین (Probability) با استفاده از مدل GTR+G با ۲۰۰۰ ۰۰۰ تکرار به همراه ۲۵٪ Burn-in در نرم‌افزار Mrbayes 3.2.5 انجام شد. آنالیز داده‌ها تا زمان رسیدن ESS (Effective Sample Size) یا اندازه مناسب نمونه به بالای ۲۰۰ در تمامی ران‌ها در نرم‌افزار Tracer 1.4.1 بررسی شد (Ronquist and Huelsenbeck, 2003; Rambaut and Drummond, 2007; Lorenz and Puillandre, 2015). همچنین فاصله ژنتیکی، تعداد بازهای متفاوت و درصد GC نمونه‌های *C. frigidus* در نواحی مختلف

۱۰ پیکومول، ۱ میکرولیتر DNA ژنومی، ۰/۳ میکرولیتر DNA پلیمرز Taq (۵u)، ۱ میکرولیتر $MgCl_2$ (۵۰mM) بود که در شرایط زیر انجام گرفت: واسرشته‌سازی (Denaturation) اولیه در $94^{\circ}C$ به مدت ۱۰ دقیقه، ۳۵ سیکل واسرشته‌سازی در $94^{\circ}C$ در ۴۵ ثانیه، اتصال آغازگرها به هدف (Annealing) در $48^{\circ}C$ به مدت ۶۰ ثانیه و بسط آغازگرها (Extension) در $72^{\circ}C$ در ۴۵ ثانیه، و در نهایت بسط نهایی در $72^{\circ}C$ به مدت ۵ دقیقه انجام شد. برای ارزیابی محصول PCR از ژل آگارز ۲٪ استفاده شد. محصول PCR برای توالی‌یابی به روش سانجر (Brown et al., 2005) توسط شرکت فزا پژوه به امریکا ارسال شد.

آنالیزهای نرم‌افزاری

توالی‌های به دست آمده در مطالعه حاضر که برای اولین بار از منطقه خلیج فارس گزارش شده است، با نرم‌افزار Chromas Lite 2.1.1 بررسی و در نرم‌افزار CLC Sequence Viewer 6.5.4 به توالی اسید آمینه ترجمه شدند، قالب خواندن (Frame) آن‌ها تعیین شد (Knudsen et al., 2012) و با دریافت شماره پذیرش، توالی‌ها در بانک ژن NCBI ثبت

به رنگ زرد و نارنجی نمایان شد. میانگین طول تعداد ۴۵ نمونه، ۵/۴ سانتی متر محاسبه شد. شکل صدف بر اساس نوع پیچش صدف (Whorl)، حالت مخروط (Spire)، شانه صدف (Shoulder) و دهانه مخروط (Aperture) مورد بررسی قرار گرفت. پیچش بدن به صورت محدب شکل بود. لبه داخلی صدف صاف، فاقد طرح خاص و تیره رنگ بود (شکل ۱- الف). حالت مخروط، صاف و با نوک کوتاه (اصطلاحاً Conical) بود و سه شیار موازی یا حلقه‌ای داشت. شانه صدف حالت مسطح و سفت داشت، به همین دلیل با نام Frigid Cone خوانده می‌شود. دهانه مخروط زیاد گسترده نبود و به رنگ زرد دیده می‌شد که در سمت لبه خارجی تیره رنگ بود (شکل ۱- ب).

آناتومی حلزون مخروطی

سیفون در گونه *C. frigidus* طویل و به رنگ زرد با خطوط مشکی بود. سیفون مشابه بینی عمل می‌کند. حلزون‌های مخروطی دریایی، یک جفت چشم دارند که در هر طرف دهان جای گرفته است که با توجه به قرارگیری چشم‌ها روی پایک‌ها یا تنتاکول‌ها، در گونه *C. frigidus* کوتاه به نظر می‌رسیدند (شکل ۱- ج).

محاسبه شد (Lorenz and Puillandre, 2015).

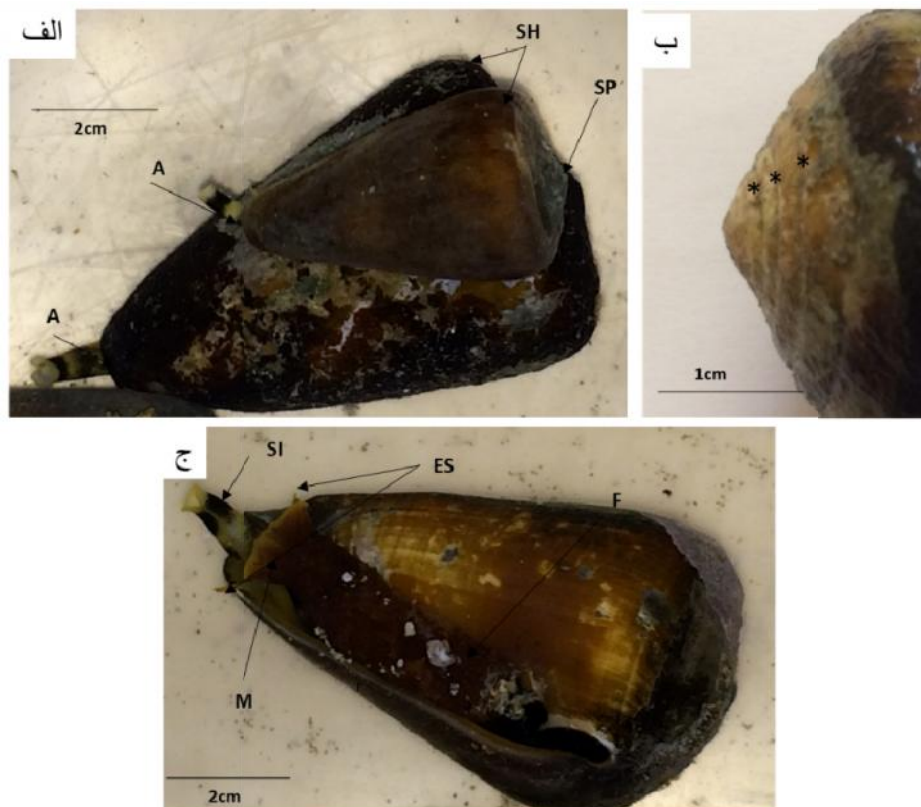
در این بررسی از ۲۹ توالی ثبت شده در پایگاه داده‌ها که شامل کلاد *Virgiconus* (۹ توالی از گونه *C. frigidus* ثبت شده از نقاط مختلف، ۲ توالی مربوط به مطالعه حاضر و ۸ توالی از سایر گونه‌ها)، کلاد *Lividoconus* (۵ توالی) و سایر کلادها (۴ توالی) بودند، مطابق با نتایج Puillandre و همکاران (۲۰۱۴) و (۲۰۱۵)، گونه‌هایی با فاصله زیادی نسبت به گونه‌های دیگر جنس *Conus* بودند. برای Out Group (۱ توالی) از گونه *Bathytoma neocaledonica* استفاده شد. هدف از قرار دادن Out Group و گونه‌های کلادهای دور، مقایسه بهتر گونه‌های نزدیک به هم با گونه‌ای است که از لحاظ ژنتیکی با گونه مورد مطالعه تفاوت بیشتری دارد. این کار صحت کار را بالا برده و مقایسه را راحت‌تر می‌کند.

نتایج

مطالعات ریخت‌شناختی

آناتومی صدف

طرح صدف در گونه *C. frigidus* لایه نسبتاً ضخیمی از Periostracum به رنگ قهوه‌ای بود که پس از حذف آن، طرح زیرین



شکل ۱: ریخت‌شناسی حلزون مخروطی *Conus frigidus*. الف: شانه صدف (SH) به صورت مسطح و حالت مخروط (SP) نوک کوتاه یا Conical است. پیچش بدن به صورت محدب و راستگرد دیده می‌شود. ب: بر روی مخروط سه شیار دیده می‌شود که از ویژگی‌های خاص این نوع حلزون است. ج: آناتومی حلزون مخروطی در این شکل دیده می‌شود که شامل سیفون (SI) به رنگ زرد و با خط مشکی در وسط، چشم‌ها که روی پایه‌های چشمی (ES) و روی دهان (M) قرار گرفته‌اند و پای عضلانی بزرگ که از دهانه صدف خارج شده است. A: دهانه مخروط.

مطالعات ژنتیکی

که در شکل ۲- الف با ستاره (*) نشان داده شده‌اند، برای PCR مورد استفاده قرار گرفتند. قطعه ژن تکثیر شده توسط PCR نیز در شکل ۲- ب) نشان داده شده است.

پس از استخراج DNA با روش CTAB و سنجش کیفیت DNA استخراجی با ژل آگارز ۱٪ (جدول ۲)، باندهای فاقد اسمیر و آلودگی

شباهت زیاد در قطعه ژنی COI کلادی مشترک را تشکیل دادند که این کلاد با ارزش بالای بوت استرپ (ML=۹۹) و احتمال پسین بالا (PP=۱) حمایت شد و هر دو در کلادی مشترک با گونه *C. frigidus* از ناحیه اندوپاسفیک قرار گرفتند و از سایر گونه‌های موجود در کلاد *Virgiconus* تفاوت آشکاری را نشان دادند. همچنین با دقت در کلادهای درخت فیلوژنی می‌توان دید که تمام توالی‌های ثبت شده از گونه *C. frigidus* در دو کلاد مجزا با ارزش‌های بوت استرپ (ML=۸۹) و احتمال پسین بالا (PP=۱) قرار گرفتند. هر یک از این کلادها محدوده‌های متفاوتی از ناحیه اندوپاسفیک را شامل می‌شوند. کلادی که گونه‌های خلیج فارس در آن قرار دارند، در ناحیه اقیانوس هند و غرب اقیانوس آرام است که با گونه‌های مشابه در همین ناحیه و همچنین اقیانوس هند (کشور ماداگاسکار در جنوب شرق آفریقا) ACL5560 یک کلاد مجزا را تشکیل داده‌اند.

ترسیم درخت فیلوژنی به روش Neighbor Joining با مدل K2P، نیز نشان دهنده توپولوژی مشابهی با درخت‌های فیلوژنی فوق الذکر بود و همچنین با نتایج حاصل از بررسی فاصله ژنتیکی میان گونه‌های *C. frigidus* نقاط

جدول ۲: میانگین خلوص و کمیت DNA استخراج شده از نمونه‌های *Conus frigidus*

ردیف	DNA (µg/mL)	OD _{DNA}
*۱	۲۲	۱/۷۸
۲	۷۹	۱/۶۳
*۳	۶۵	۱/۸۱
۴	۱۲۳	۱/۹۶
*۵	۴۵	۱/۸
*۶	۵۸	۱/۸
*۷	۸۹	۱/۸۵

: ردیف‌هایی که با علامت «» نشان داده شده‌اند شامل نمونه‌هایی هستند که در واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز با موفقیت تکثیر شده‌اند و از این میان فقط دو توالی مناسب و قابل ثبت از ردیف‌های ۳ و ۷ به دست آمد. OD: چگالی نوری (Optical Density)

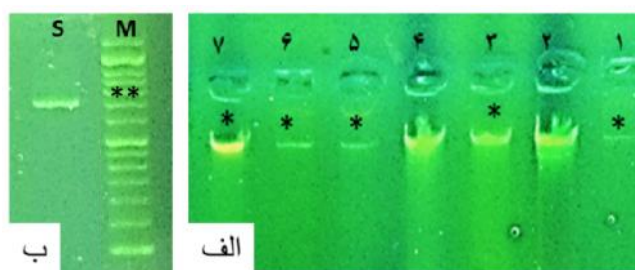
نتایج روابط تکاملی

نتیجه محاسبات فیلوژنی و روابط تکاملی ML (Maximum Likelihood) و BI (Bayesian)، ۲۹ توالی ژن COI از گونه *C. frigidus* الگوی توپولوژی یکسانی را برای درختان تکاملی نشان داد. نتایج اختلافات ژنتیکی در توپولوژی درختان تکاملی منعکس شد (شکل ۳).

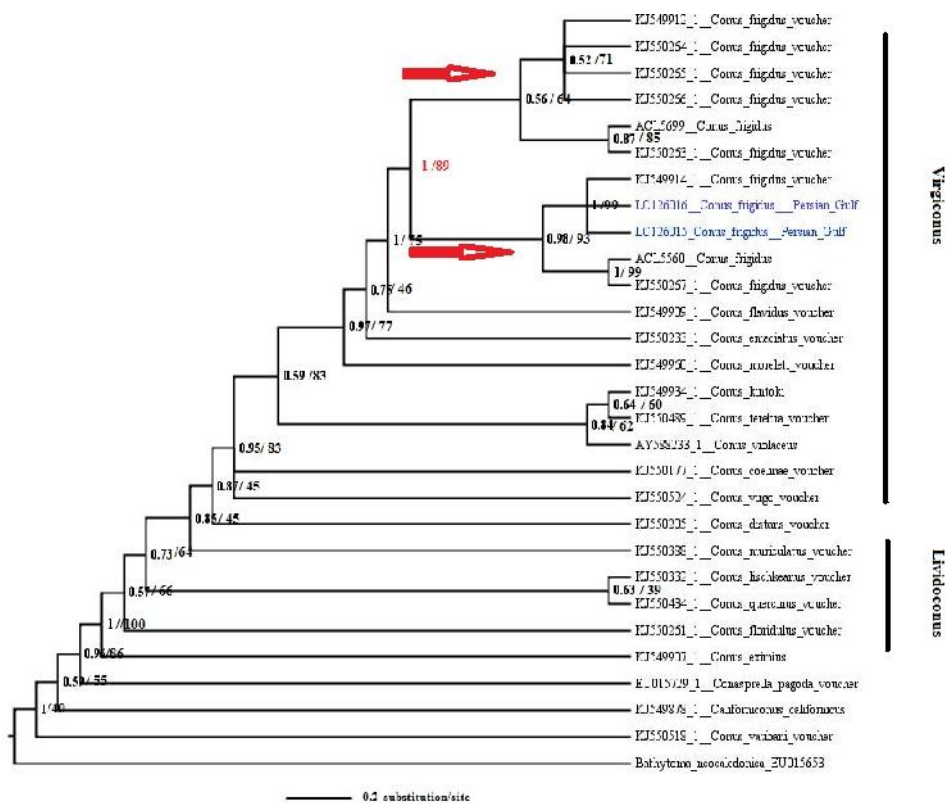
در کلاد *Virgiconus*، گونه‌های LC126015 و LC126016 به سبب داشتن

مختلف دنیا، همخوانی داشت (جدول ۳). این انطباق، با نتایج شمارش تفاوت نوکلئوتیدها پس از هم‌ردیف‌سازی با نرم‌افزار و محاسبه چشمی آن نیز قابل رویت بود. به طوری که دو گونه LC126015 و LC126016 از خلیج فارس تنها در یک نوکلئوتید با گونه KJ549914 از ناحیه شرق اندوپاسفیک تفاوت داشت. این در حالی است که با گونه‌های دیگر بین ۹-۲۰ نوکلئوتید تفاوت دیده شد که

بیشترین تفاوت مربوط به نواحی شرق اقیانوس آرام و جنوب آن (کشور وانواتو در جنوب اقیانوس آرام) AC5699 بود. با توجه به نسبت نوکلئوتیدها و درصد GC محاسبه شده برای این گونه‌ها، گونه‌های خلیج فارس با مقادیر ۳۹/۳٪ برای LC126016 و ۳۹/۴٪ برای LC126015 فاصله کمی با گونه‌های نقاط مختلف نشان دادند (جدول ۴).



شکل ۲: تصاویر ژل مربوط به DNA استخراجی و تکثیر شده از بافت عضله یا *Conus frigidus*. الف: تصویر قطعه DNA استخراج شده. تعداد نمونه‌های تزریق شده در چاهک ۷ عدد است. نمونه‌های نشان داده شده با علامت «*» فاقد اسمیر و مناسب جهت تکثیر بودند. ب: قطعه DNA تکثیر شده و محصول نهایی PCR. علامت «**» نشان دهنده باند ۶۵۰ جفت باز از مارکر (M) با مشخصات 100-1000bp ساخت شرکت سیناکلون و S قطعه ژن تکثیر یافته است.



شکل ۳: درخت فیلوژنی Maximum Likelihood و Bayesian گونه *Conus frigidus*. درصد های بوت استرپ برای (ML) و احتمال توزیع پسین (Posterior Probability)، برای Bayesian روی گره ها نشان داده شده است (به ترتیب: PP/ML). دو پیکان قرمز روی شکل نشان دهنده دو محدوده متفاوت از ناحیه اندوپاسفیک است. گونه های مورد مطالعه در این پژوهش به رنگ آبی و در محدوده غرب ناحیه اندوپاسفیک قرار گرفته اند. کلاد دیگر شامل گونه های جنوب و شرق ناحیه اندوپاسفیک است.

جدول ۳: فاصله ژنتیکی توالی‌های گونه *Conus frigidus* خلیج فارس با سایر نقاط جهان به روش Pairwise Distance

	*KJ549914
	ACL5699
	ACL5560
	KJ549912
	KJ550263
	KJ550264
	KJ550265
	KJ550266
	KJ550267
	Out group/EU015653
	Persian Gulf/LC126016
	Persian Gulf/LC126015

*: در این ستون شماره‌های دسترسی نمونه‌های *C. frigidus* در نقاط مختلف ذکر شده است.

جدول ۴: درصد نوکلئوتیدها در توالی‌های قطعه ژنی COI گونه *Conus frigidus* در نقاط مختلف جغرافیایی

شماره دسترسی نمونه‌های مختلف	T(U)	C	A	G	تعداد کل بازها
Persian Gulf/LC126016	۳۸/۵	۱۷/۴	۲۲/۱	۲۲/۰	۶۳۳/۰
Persian Gulf/LC126015	۳۸/۶	۱۷/۶	۲۲/۱	۲۱/۸	۶۲۵/۰
ACL5699	۳۸/۰	۱۷/۳	۲۲/۳	۲۲/۳	۶۵۸/۰
ACL5560	۳۸/۳	۱۶/۹	۲۲/۰	۲۲/۸	۶۵۸/۰
KJ549912	۳۷/۸	۱۷/۵	۲۲/۴	۲۲/۴	۶۵۳/۰
KJ549914	۳۸/۳	۱۶/۸	۲۲/۲	۲۲/۷	۶۵۳/۰
KJ550263	۳۷/۹	۱۷/۳	۲۲/۴	۲۲/۴	۶۵۵/۰
KJ550264	۳۷/۷	۱۷/۴	۲۲/۱	۲۲/۷	۶۵۵/۰
KJ550265	۳۷/۷	۱۷/۴	۲۲/۳	۲۲/۶	۶۵۵/۰
KJ550266	۳۷/۶	۱۷/۶	۲۲/۳	۲۲/۶	۶۵۵/۰
KJ550267	۳۸/۲	۱۶/۸	۲۲/۱	۲۲/۹	۶۵۵/۰

بحث

و همکاران، ۱۳۷۹) صورت گرفت.

وجود طرح‌های متنوع در حلزون‌های مخروطی که در حقیقت هر طرح مختص یک گونه است را می‌توان از جمله ویژگی‌های مهم شناسایی گونه‌ای دانست. الگوهای رنگی متنوع در صدف حلزون‌های مخروطی می‌تواند توسط یک مکانیسم عصبی در جبهه تولید شود. الگوهای رنگی صدف نرم‌تنان، فنوتیپ‌های پیچیده‌ای دارد که در بین گونه‌های نزدیک به هم نیز متفاوت است. این پیچیدگی‌ها، توصیف شباهت‌ها و تفاوت‌ها و تاثیرات انتخاب طبیعی را مشکل می‌سازد (Gong et al., 2012). همچنین به نظر نمی‌رسد که طرح حلزون‌های مخروطی با تنوع سموم موجود در آن‌ها و یا اندازه و حتی رفتار شکار آن‌ها ارتباط داشته باشد (Duda, 2008). البته باید توجه داشت که در طبیعت، لایه ضخیم Periostracum روی صدف حلزون‌های مخروطی را می‌پوشاند. حضور این لایه در حلزون‌های مخروطی، در طبیعت برای استتار آن‌ها مهم است (Kohn, 2003). اما همین موضوع باعث دشواری شناسایی آن‌ها می‌شود. در مطالعه‌ای که سال ۱۳۷۹ توسط حسین‌زاده صحافی و همکاران در قالب یک اطلس از نرم‌تنان خلیج فارس با شناسایی ریخت‌شناختی انجام شده بود به این

به کارگیری داده‌های مولکولی برای بازسازی تاریخچه تکاملی نیازمند ارائه فرضیاتی است. فرض اول این است که توالی‌های مولکولی مورد استفاده در ساختار فیلوژنتیکی هومولوگ هستند، یعنی یک جد مشترک دارند و طی زمان از آن فاصله گرفته‌اند. فرض دیگر این است که هر ناحیه‌ای در توالی به صورت مستقل تکامل می‌یابد. بنابراین تفاوت توالی‌ها اطلاعات کافی را برای ساخت درخت‌های فیلوژنتیک مستدل، ارائه می‌کند (Duda et al., 2001; Puillandre et al., 2012b, 2014). اگر چه استفاده از شاخص‌های مولکولی نقش مهمی را در شناسایی گونه‌ها بازی می‌کند، اطلاعات ریخت‌شناختی و زیست‌شناختی همچنان ابزار اولیه شناسایی محسوب می‌شوند (Franklin et al., 2007; Duda, 2008; Lorenz and Puillandre, 2015). در مطالعه حاضر نیز شناسایی گونه حلزون مخروطی در ابتدا بر اساس ریخت‌شناسی صدف و آناتومی خود حلزون مخروطی و با استفاده از کلیدهای شناسایی *Sea Shells of Eastern Arabia Encyclopedia of* (Bosch et al., 1995)، *Marine Gastropods* (Robin, 2008) و اطلس نرم‌تنان خلیج فارس (حسین‌زاده صحافی

خوانده می‌شود کاملاً متفاوت است و آن را با نام *C. hughmorrisoni* معرفی کردند.

از ویژگی‌های منحصر به فرد ریختی که در شناسایی حلزون‌های مخروطی بکار گرفته می‌شود و در این مطالعه استفاده نشد، شکل و ساختار رادولا است. این ویژگی به همراه طرح و رنگ پا، دهان، خرطوم و سیفون در کنار طرح و رنگ صدف حلزون مخروطی، در شناسایی بسیار حائز اهمیت است. ترکیب تمامی این فاکتورها در شناسایی ریخت‌شناختی و شناسایی گونه‌های حلزون مخروطی از جمله موارد کلیدی به شمار می‌رود (Franklin et al., 2007).

در قلمرو دریایی گونه‌های مخفی و شناسایی نشده به وفور وجود دارند که روش شناسایی سنتی توسط ویژگی‌های ریختی، شناسایی آن‌ها را با مشکل مواجه می‌کند. بنابراین، ترکیبی از داده‌های ریخت‌شناختی و مولکولی قطعاً اطلاعات بیشتری را برای بازسازی و ترسیم درخت تکاملی در حلزون‌های مخروطی فراهم خواهد کرد (Tucker and Tenorio, 2009; Brauer et al., 2012; Lorenz and Puillandre, 2015). بسیاری از موجودات دریایی دارای تنوع رنگی فراوانی هستند و میان پراکنش ساختارهای رنگی و الگوهای ساختاری ژنتیکی آن‌ها پیچیدگی زیادی وجود دارد. در

گونه‌ها اشاره شده بود: *C. flavidus*، *C. striatus*، *C. tessellates*، *C. coronatus*، *C. inscriptus*، *C. vexillum*، *C. quercinus* و *C. textile*. همچنین در مطالعه‌ای که نی‌پور و همکاران (۱۳۸۹) انجام دادند در آب‌های سواحل ایرانی خلیج فارس ۹ گونه مختلف از حلزون مخروطی دریایی را گزارش کردند که عبارت بودند از: *C. coronatus*، *C. virgo*، *C. quercinus*، *C. striatus*، *C. tessellates*، *C. distans*، *C. aculeiformis*، *C. omaria* و *C. abbreviates*. در این مطالعات هیچ اشاره‌ای به گونه *C. frigidus* نشده است. با توجه به حضور نسبتاً غالب این گونه در سواحل خلیج فارس به ویژه جزایر قشم و لارک، احتمال می‌رود که به دلیل تشابه ریختی زیاد در گونه‌های موجود در کلاد *Virgiconus* به اشتباه همه تحت نام *C. virgo* یا *C. flavidus* نامگذاری شده و به جزییات تفاوت میان این دو گونه توجه نشده باشد.

در مطالعه مشابهی که Lorenz و Puillandre (۲۰۱۵) انجام دادند نیز با داده‌های مولکولی و ریخت‌شناختی بر اساس ساختار رادولا، اثبات کردند گونه‌ای که در ناحیه ایرلند جدید، Papua New Guinea، تحت نام‌های *C. exiguus* و *C. hanshassi*

بنابراین، دو گونه مورد بررسی نیز دو گونه متفاوت هستند (Lorenz and Puillandre, 2015). با توجه به جدول ۳، فاصله ژنتیکی گونه مورد مطالعه با نمونه اندوپاسفیک حدود ۰/۲٪ بود و این فاصله با هم‌گونه‌های دیگر که مربوط به سواحل شرقی اقیانوس آرام هستند، بین ۲٪-۳٪ است. با توجه به این که خلیج فارس دریای نیمه بسته‌ای است که از طریق تنگه هرمز به دریای عمان و اقیانوس هند ارتباط می‌یابد. این ارتباط، با وجود تفاوت شرایط محیطی، منجر به شباهت بسیاری از گونه‌های موجود در دو ناحیه شده است. همچنین می‌توان بیان کرد که بسیاری از گونه‌ها از طریق جریان‌های اقیانوسی از اقیانوس هند به خلیج فارس منتقل شده‌اند و در این ناحیه باقی مانده‌اند (Reynolds, 1993). نتایج حاصل از بررسی محتوای GC موجود در گونه‌ها نیز این امر را تایید کرد. مطابق جدول ۴، درصد GC در گونه *C. frigidus* در خلیج فارس تقریباً مشابه سایر نقاط بود. هر قدر نسبت GC در یک گونه بیشتر باشد، آن گونه اجدادی‌تر است (Rodriguez-Trelles et al., 2000). در زیست‌شناسی مولکولی یا ژنتیک، محتوای GC، درصدی از بازهای نیتروژنی مولکول DNA است که محتوای گوانین و سیتوزین را

بعضی موارد الگوهای رنگی مختلف از لحاظ ژنتیکی جدا هستند و ممکن است حتی معرف گونه‌های جداگانه‌ای باشند (Da Motta, 1991; Olivera, 2006; Tucker and Tenorio, 2009).

در مطالعه حاضر برای اولین بار از روش بارکدگذاری DNA و ژن COI برای شناسایی گونه *C. frigidus* در سواحل شمالی خلیج فارس و در دو منطقه لارک و قشم استفاده شد. نتایج نشان دهنده قرارگیری گونه مزبور در کلادی مشترک با گونه *C. frigidus* ناحیه اندوپاسفیک بود. بررسی توالی‌های DNA به صورت چشمی نشان داد که بین توالی‌های گونه مورد مطالعه و نمونه اندوپاسفیک تنها در یک نوکلئوتید اختلاف وجود داشت. بنابراین، می‌توان بیان کرد که این دو گونه هاپلوتایپ هستند. Duda و Kohn (۲۰۰۵) بیان کردند که وقتی دو گونه در یک کلاد قرار می‌گیرند، منشا یکسان داشته، دارای روابط مونوفیلیتیک هستند و گونه‌های خواهری محسوب می‌شوند که جد یکسانی دارند. همچنین، هر قدر دو گونه به هم شبیه‌تر باشند، فاصله ژنتیکی آن دو کمتر است (کمتر از ۰/۳٪) و اگر توالی‌های DNA بیش از ۱۰٪ فاصله ژنتیکی را نشان دهند، آن‌ها توالی‌های کاملاً متفاوت هستند.

تنهایی مناسب نیست و باید از روش‌های مبتنی بر نشانگرهای ژنتیکی برای قرار دادن صحیح گونه‌ها در جایگاه اصلی خود استفاده کرد. بنابراین پیشنهاد می‌شود زمانی که ویژگی‌های ریختی برای تشخیص مرز بین گونه‌ها ناکافی است، آنالیزهای مولکولی برای روشن شدن وضعیت گونه‌های مورد مطالعه کارآمد خواهد بود. بنابراین روش بارکدگذاری DNA می‌تواند به عنوان مکمل در کنار تاکسونومی سنتی استفاده شود و باعث تسهیل پژوهش در زمینه تنوع گونه‌ای و توصیف گونه‌ها، به ویژه گونه‌های نزدیک به هم شود.

از بین چهار نوع باز مختلف نشان می‌دهد. این درصد می‌تواند مربوط به کل DNA و RNA و یا قطعه‌ای از آن‌ها باشد. در ساختار مولکولی بازهای G و C سه پیوند هیدروژنی وجود دارد، بنابراین پایدارتر از دو باز دیگر یعنی A و T است که تنها دو پیوند هیدروژنی دارند (Yakovchuk et al., 2006). نسبت GC در ژنوم جانداران مختلف به طور قابل توجهی متغیر است و این امر مربوط به تغییر جهش و نوترکیبی DNA است (Birdsell, 2002).

مطالعه حاضر نشان داد شناسایی بر مبنای ریخت‌شناسی برای شناخت مرز گونه‌ها به

منابع

- حسینزاده صحافی ه.، دقوقی ب. و رامشی ح. ۱۳۷۹. اطلس نرم‌تنان خلیج فارس. موسسه تحقیقات شیلات ایران. ۱۱۲ص.
- نبی‌پور ا.، نجفی ا. و بوالخیر ا. ر. ۱۳۸۹. نرم‌تنان دارویی خلیج فارس. انتشارات دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر. ۸۵ص.
- Bandyopadhyay P.K., Stevenson B.J., Cady M.T., Olivera B.M. and Wolstenholme D.R. 2006.** Complete mitochondrial DNA sequence of a Conoidean gastropod, *Lophiotoma (Xenuroturris) cerithiformis*: Gene order and gastropod phylogeny. *Toxicon*, 48(1): 29–43.
- Biggs J.S., Watkins M., Puillandre N., Ownby J.P., Lopez-Vera E., Christensen S., Moreno K.J., Bernaldez J., Licea-Navarro A., Showers Corneli P. and Olivera B.M. 2010.** Evolution of *Conus* peptide toxins: Analysis of *Conus californicus* Reeve, 1844. *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 56: 1–12.
- Birdsell J.A. 2002.** Integrating genomics, bioinformatics, and classical genetics to study the effects of recombination on genome evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 19(7): 1181–1197.
- Boore J.L. 1999.** Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research*, 27: 1767–1780.
- Boore J.L., Medina M. and Rosenberg L.A. 2004.** Complete sequences of the highly rearranged molluscan mitochondrial genomes of the Scaphopod *Graptacme eborea* and the bivalve *Mytilus edulis*. *Molecular Biology and Evolution*, 21(8): 1492–1503.
- Bosch D., Dance S.P., Moolenbeek R. and Oliver P.G. 1995.** Seashells of Eastern Arabia. Motivate Publishing. 296P.
- Brauer A., Kurz A., Stockwell T., Baden-Tillson H., Heidler J., Wittig I., Kaufenstein S., Mebs D., Stocklin R. and Remm M. 2012.** The mitochondrial genome of the venomous cone snail *Conus consors*. *Plos One*, 7(12): 1–10 (e51528).
- Brown M.A., Begley G.S., Czerwiec E., Stenberg L.M., Jacobs M., Kalume D.E. and Roepstorff P., Stenflo J., Furie B.C. and Furie B. 2005.** Precursors of novel Gla-containing conotoxins contain a carboxy-terminal recognition site that directs gammacarboxylation. *Biochemistry*, 44: 9150–9159.
- Cunha R.L., Tenorio M.J., Afonso C., Castilho R. and Zardoya R. 2008.** Replaying the tape: Recurring biogeographical patterns

- in Cape Verde *Conus* after 12 million years. *Molecular Ecology*, 17: 885–901.
- Da Motta A.J. 1991.** A systematic classification of the gastropod family Conidae at the generic level. *La Conchiglia*, Roma. 48P.
- Duda T.F. 2008.** Differentiation of venoms of predatory marine gastropods: Divergence of orthologous toxin genes of closely related *Conus* species with different dietary specializations. *Journal of Molecular Evolution*, 67: 315–321.
- Duda T.F. and Kohn A.J. 2005.** Species-level phylogeography and evolutionary history of the hyperdiverse marine gastropod genus *Conus*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 34: 257–272.
- Duda T.F. and Palumbi S.R. 1999.** Molecular genetics of ecological diversification: Duplication and rapid evolution of toxin genes of the venomous gastropod *Conus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96: 6820–6823.
- Duda T.F., Kohn A.J. and Palumbi S.R. 2001.** Origins of diverse feeding ecologies within *Conus*, a genus of venomous marine gastropods. *Biological Journal of the Linnean Society*, 73: 391–409.
- Espino S.L., Kohn A.J., Villanueva J.A., Heralde F.M., Showers Corneli P., Concepcion G.P., Olivera B.M. and Santos A.D. 2008.** Feeding behavior, phylogeny, and toxinology of *Conus furvus* Reeve, 1843 (Gastropoda: Neogastropoda: Conidae). *Nautilus*, 122: 143–150.
- Espiritu D.J.D., Watkins M., Dia-Monje V., Cartier G.E., Cruz L.E. and Olivera B.M. 2001.** Venomous cone snails: Molecular phylogeny and the generation of toxin diversity. *Toxicon*, 39: 1899–1916.
- 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.
- Franklin J.B., Fernando S.A., Chalke B.A. and Krishnan K.S. 2007.** Radular morphology of *Conus* (Gastropoda: Caenogastropoda: Conidae) from India. *Molluscan Research*, 27(3): 111–122.
- Gong Z., Matzke N.J., Ermentrout B., Songa D., Vendettib J.E., Slatkin M. and Osterd G. 2012.** Evolution of patterns on *Conus* shells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(5): 234–241.

- Grande C., Templado J. and Zardoya R. 2008.** Evolution of gastropod mitochondrial genome arrangements. *BMC Evolution Biology*, 8(61): 1–15.
- Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L. and De Waard J.R. 2003.** Identification of birds through DNA barcodes. *PloS Biology*, 10 (2): 1657–1663 (e312).
- Hu H., Bandyopadhyay P.K., Olivera B.M. and Yandell M. 2011.** Characterization of the *Conus bullatus* genome and its venom-duct transcriptome. *BMC Genomics*, 60: 1471–2164.
- Kaas Q., Westermann J.C. and Craik D.J. 2010.** Conopeptide characterization and classifications: An analysis using ConoServer. *Toxicon*, 55(8): 1491–1509.
- Kaufenstein S., Porth C., Kendel Y., Wunder C., Nicke A., Kordis D., Favreau P., Koua D., Stocklin R. and Mebs D. 2011.** Venomic study on cone snails (*Conus* spp.) from South Africa. *Toxicon*, 57: 28–34.
- Knudsen B., Knudsen T., Flensburg M., Sandmann H., Heltzen M., Andersen A., Dickenson M., Bardram J., Steffensen P.J., Mønsted S., Lauritzen T., Forsberg R., Thanbichler A., Bendtsen J.D., Gorlitz 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. 2P.
- Kohn A.J. 1990.** Tempo and mode of evolution in Conidae. *Malacologia*, 32: 55–67.
- Kohn A.J. 2003.** Infaunal invertebrates of an intertidal sand flat, Dampier, Western Australia. P: 109–113. In: Wells F.E., Walker D.I. and Jones D.S. (Eds.). *Proceedings of the Eleventh International Marine Biological Workshop: The Marine Flora and Fauna of Dampier*. Western Australia, Museum, Perth.
- Kraus N.J., Watkins M., Bandyopadhyay P.K., Seger J., Olivera B.M. and Showers Corneli P. 2012.** A very short, functionally constrained sequence diagnoses cone snails in several *Conasprella* clades. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 65: 335–338.
- Kurabayashi A. and Ueshima R. 2000.** Complete sequence of the mitochondrial DNA of the primitive opisthobranch gastropod *Pupa strigosa*: Systematic implication of the genome

- organization. *Molecular Biology and Evolution*, 17: 266–277.
- Lorenz F. and Puillandre N. 2015.** *Conus hughmorrisoni*, a new species of cone snail from New Ireland, Papua New Guinea (Gastropoda: Conidae). *European Journal of Taxonomy*, 129: 1–15.
- Monje V.D., Ward R., Olivera B.M. and Cruz L.J. 1999.** 16S mitochondrial ribosomal RNA gene sequences: A comparison of seven *Conus* species. *The Philippine Journal of Science*, 128: 225–237.
- Nam H.H., Corneli P.S., Watkins M., Olivera B. and Bandyopadhyay P. 2009.** Multiple genes elucidate the evolution of venomous snail-hunting *Conus* species. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 53(3): 645–652.
- Olivera B.M. 2006.** *Conus* peptides: Biodiversity-based discovery and exogenomics. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(42): 31173–31177.
- Pereira C.M., Rosado J., Seabra S.G., Pina-Martins F., Paulo O.S. and Fonseca P.J. 2010.** *Conus pennaceus*: A phylogenetic analysis of the Mozambican molluscan complex. *African Journal of Marine Science*, 32: 591–599.
- Puillandre N., Bouchet P., Duda T. F., Kaufenstein S., Kohn A., Olivera B.M., Watkins M. and Meyer C. 2014.** Molecular phylogeny and evolution of the cone snails. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 78: 290–303.
- Puillandre N., Duda T.F., Meyer C., Olivera B.M. and Bouchet P. 2015.** One, four or 100 genera? A new classification of the cone snails. *Molluscan Study*, 81: 1–23.
- Puillandre N., Koua D., Favreau P., Olivera B.M. and Stocklin R. 2012a.** Molecular phylogeny, classification and evolution of conopeptides. *Journal of Molecular and Evolution*, 74: 297–309.
- Puillandre N., Lambert A., Brouillet S. and Achaz G. 2012b.** ABGD, automatic barcode gap discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology*, 21: 1864–1877.
- Puillandre N., Watkins M. and Olivera B.M. 2010.** Evolution of *Conus* peptide genes: Duplication and positive selection in the A-superfamily. *Journal of Molecular and Evolution*, 70: 190–202.
- Rambaut A. and Drummond A.J. 2007.** Tracer V1.4. Retrieved July 14, 2014 from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
- Reynolds R.M. 1993.** Physical oceanography of the Gulf, Strait of Hormuz, and the Gulf of Oman—Results from the Mt Mitchell Expedition. *Marine Pollution Bulletin*, 27: 35–60.
- Robin A. 2008.** Encyclopedia of Marine Gastropods. IKAN

- Unterwasser-Archive. Germany. 480P.
- Rodriguez-Trelles F., Tarrío R. and Ayala F.J. 2000.** Evidence for a high ancestral GC content in *Drosophila*. *Molecular Biology and Evolution*, 17(11): 1710–1717.
- Ronquist F. and Huelsenbeck J.P. 2003.** MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19(12): 1572–1574.
- Salisbury S.M., Martin G.G., Kier W.M. and Schulz J.R. 2010.** Venom kinematics during prey capture in *Conus*: The biomechanics of a rapid injection system. *Journal of Experimental Biology*, 213: 673–682.
- Schulz J.R., Norton A.G. and Gilly W.F. 2004.** The projectile tooth of a fish-hunting cone snail: *Conus catus* injects venom into fish prey using a high-speed ballistic mechanism. *The Biological Bulletin*, 207(2): 77–79.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipowski A. and Kumar S. 2013.** MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0.
- Terlau H. and Olivera B.M. 2004.** *Conus* venoms: A rich source of novel ion channel-targeted peptides. *Physiological Reviews*, 84(1): 41–68.
- Tucker J.K. and Tenorio M.J. 2009.** Systematic classification of recent and fossil conoidean gastropods. Hackenheim, Germany. 295P.
- Tucker J.K. and Tenorio M.J. 2013.** Illustrated catalog of the living cone shells. MDM Publishing, Wellington, USA. 517P.
- Walker C.S., Steel D., Jacobsen R.B., Lirazan M.B., Cruz L.J., Hooper D., Shetty R., Delacruz R.C., Nielsen J.S., Ming Zhou L., Bandyopadhyay P., Craig A.G. and Olivera B.M. 1999.** The T-superfamily of conotoxins. *The Journal of Biological Chemistry*, 274: 30664–30671.
- WoRMS. 2014.** World Register of Marine Species. Retrieved December 17, 2016, from <http://www.marinespecies.org>.
- Wu X., Shao X., Guo Z.Y. and Chi C.W. 2010.** Identification of neuropeptide Y-like conopeptides from the venom of *Conus betulinus*. *Acta Biochimica Biophysica Sinica*, 42: 502–505.
- Yakovchuk P., Protozanova E. and Frank-Kamenetskii M.D. 2006.** Base-stacking and base-pairing contributions into thermal stability of the DNA double helix. *Nucleic Acids Research*, 34(2): 564–574.



Molecular phylogeny of the cone snail *Conus frigidus* Reeve, 1848 from Persian Gulf coastal region (Larak and Qeshm) using DNA barcode

Halimeh Rajabi^{1*}, Hossein Zolgharnen², Mohammad Taghi Ronagh³,
Ahmad Savari⁴, Mohammad Sharif Ranjbar⁵

Received: June 2016

Accepted: September 2016

Abstract

Conus frigidus is venomous predatory marine gastropod that is placed in *Virgiconus* clade of the coast of Qeshm and Lark. The species in this clade is morphologically similar and sometimes named wrongly. Therefore, their molecular identification is important. In this study, DNA was extracted by CTAB. The COI gene fragment was used as a barcode to identify the species. After amplification of the gene and its sequencing, phylogenetic trees were depicted using MEGA 6 and MrBayes 3.2 softwares. The results showed that the nucleotide sequence of COI gene fragment of *C. frigidus*, on the coast of Qeshm and Lark, have only differ in one nucleotide from the Indo-Pacific sequence of *C. frigidus*. Phylogeny tree of *Virgiconus* clade represents a dramatic difference of this species with other clade species. Therefore, it seems that the origins of *C. frigidus* of the Persian Gulf, was from the species from the east coast of the Indian and Pacific Oceans. Identification of species based on COI gene in the species is very useful and precise method when characteristics resemblances among species are high.

Key words: *COI*, *Conus frigidus*, *Persian Gulf*, *Phylogeny*.

1- Ph.D. Student in Marine Biology, Faculty of Marine Sciences and Oceanography, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran.

2- Associated Professor in Department of Marine Biology, Faculty of Marine Sciences and Oceanography, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran.

3- Assistant Professor in Department of Marine Biology, Faculty of Marine Sciences and Oceanography, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran.

4- Professor in Department of Marine Biology, Faculty of Marine Sciences and Oceanography, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran.

5- Assistant Professor in Department of Biology, Faculty of Science, Hormozgan University, Bandar Abbas, Iran.

*Corresponding Author: halimeh.rajabi@gmail.com