

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

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

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۹۸

### چکیده

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

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



## مقدمه

(Miller و Schindel، ۲۰۰۵). این امر برای شناسایی گونه‌ها در گروه‌هایی (Taxa) با سطوح بالای انعطاف پذیری ریختی (Phenotypic plasticity) مانند اویسترها با ارزش می‌باشد. در واقع می‌توان گفت ابزارهای مولکولی در سال‌های اخیر به حل و فصل برخی سوالات در زمینه شناسایی و روابط رده‌بندی اویسترها کمک شایانی کرده است. به عنوان مثال بررسی و شناسایی گونه‌های اویستر با استفاده از آلوژایم توسط Banks و همکاران (۱۹۹۴) انجام پذیرفت، آنالیز فیلوژنی با استفاده از توالی DNA میتوکندریایی از جمعیت‌های *Saccostrea* در استرالیا، حداقل سه گونه مجزا را تشخیص داد (Morton و Lam، ۲۰۰۶). روش DNA بارکدینگ نیز جهت شناسایی و رده‌بندی گونه‌های اویستر توسط محققان دیگر نیز استفاده شده است (Liu و همکاران، ۲۰۱۱؛ Guo و Wang، ۲۰۰۸؛ Lam و Morton، ۲۰۰۶). شناسایی اویسترها از جنبه مدیریت و حفاظت از ذخایر و صنعت آبی پروری حائز اهمیت می‌باشد. بنابراین براساس موارد ذکر شده این تحقیق با هدف شناسایی و تعیین جایگاه فیلوژنی مولکولی گونه غالب اویستر صخره‌ای در سواحل شمالی خلیج فارس با استفاده از ژن میتوکندریایی COI که ژنی متداول در شناسایی مولکولی جانوران است، انجام گرفت.

## مواد و روش‌ها

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

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

اویسترها در سراسر جهان به عنوان گونه شیلاتی و اقتصادی حایز اهمیت هستند. آن‌ها از نظر اکولوژیکی نیز مهم می‌باشند و نقش حیاتی در فرایندهای اکولوژیکی سواحل بازی می‌کنند. اکوسیستم‌هایی که با کاهش جمعیت اویسترها مواجه شده‌اند ممکن است اثرات منفی مانند کاهش کیفیت آب و کاهش تنوع زیستی را تجربه کنند (Dumbauld و همکاران، ۲۰۱۱؛ Quayle، ۱۹۸۸). آن‌ها به این دلیل که بستر متراکم و وسیعی را تشکیل می‌دهند، زیستگاه گسترده‌ای برای انواع موجودات به وجود می‌آورند. هم‌چنین در کاهش پدیده غنی‌شدگی نقش دارند (Kemp و همکاران، ۲۰۰۵). علاوه بر این اویسترها به دلیل توانایی‌شان در تجمع آلاینده‌های مختلف از محیط‌های دریایی، به عنوان پایشگرهای زیستی مطالعه می‌شوند (سرمیدیان، ۱۳۹۳؛ میرزا، ۱۳۹۴؛ میرزا، ۱۳۹۲). اویسترهای واقعی (True oysters) (خانواده Ostreidae) شامل حدود ۷۵ گونه هستند که در امتداد سواحل سراسر دنیا به استثنای قطب جنوب و برخی جزایر اقیانوسی گسترش یافته‌اند (Humber، ۲۰۱۰). ۱۵ گونه از این خانواده در اقیانوس هند و منطقه هند و آرام شناسایی شده است (Huber، ۲۰۱۰؛ WoRMS، <http://www.marinespecies.org>). اویسترها در آب‌های خلیج فارس نیز حضور دارند. رضایی‌مارنانی و همکاران (۱۳۷۴) گونه *Saccostrea cucullata* را غالب‌ترین و با ارزش‌ترین گونه اویستر خوراکی بسترهای صخره‌ای سواحل و جزایر استان هرمزگان معرفی کرده و بیان کردند این گونه از پراکنش وسیعی در سطح آب‌های ساحلی خلیج فارس برخوردار می‌باشد. یوسفی‌سیاه‌کلودی و همکاران (۱۳۸۴) به بررسی مولکولی جمعیت‌های آن در سواحل شمالی خلیج فارس و دریای عمان با استفاده از روش RAPD پرداختند. در استان خوزستان نیز گونه‌ای با نام *Crassostrea gigas* گزارش شد که بعد با مطالعات مولکولی نام آن به *Crassostrea sp.* تغییر یافت (سرمیدیان، ۱۳۹۳). بسیاری از رده‌بندی‌های اویسترها تاکنون براساس ویژگی‌های پوسته بوده، اما به دلیل حساسیت آن‌ها به عوامل زیست محیطی و هم‌چنین طبیعت تغییرپذیر پوسته، شناسایی مورفولوژیکی اویسترهای صخره‌ای مشکل می‌باشد. اثر محیط بر مورفولوژی پوسته اویستر می‌تواند متفاوت باشد (Seilacher و همکاران، ۱۹۸۵) و این امر منجر به بسیاری اشتباهات و سردرگمی‌ها در رده‌بندی اویسترها می‌شود (Guo و Wang، ۲۰۰۸). این مشکل در جنس *Saccostrea* به دلیل تغییرپذیری زیاد پوسته، حادث‌تر بوده و طبقه‌بندی آن‌ها بسیار گیج‌کننده است (Morton و Lam، ۲۰۰۶). این سردرگمی تاکنونی، مانعی جهت تحقیقات بیش‌تر در زمینه‌های دیگر از جمله حفاظت از اویسترها می‌باشد. برخلاف رده‌بندی مورفولوژیکی سنتی، روش‌های مولکولی می‌تواند به شناسایی گونه‌هایی که ویژگی‌های ریخت‌شناسی‌شان از بین رفته یا گمراه کننده هستند کمک کند

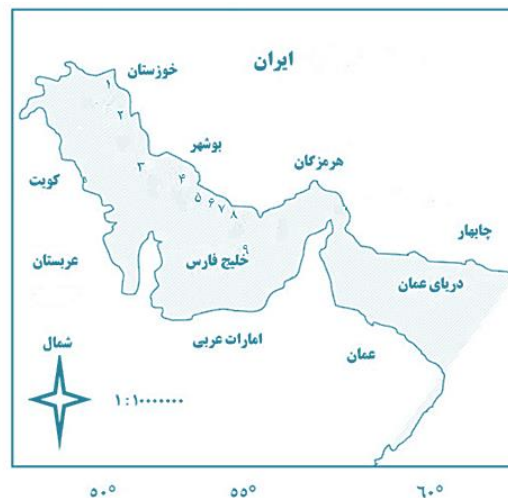


به منظور بررسی کیفیت DNA از الکتروفورز نمونه‌ها بر روی ژل آگارز استفاده شد. پس از آن واکنش زنجیره‌ای پلیمرز انجام شد. در این مرحله، ناحیه‌ای از DNA میتوکندریایی به نام COI با استفاده از آغازگر طراحی شده توسط Folmer (۱۹۹۴) برای COI انتخاب و تکثیر شد. 'GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG3' -۵' LCOI490 و 'TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA3' -۵' HCO2198 جهت اطمینان از تکثیر قطعات مورد نظر، محصولات PCR با استفاده از ژل آگارز، الکتروفورز شد. نواحی تکثیر شده جهت تعیین توالی به شرکت سینا کلون ارسال شد. برای انجام این تحقیق از واکنش PCR استاندارد با حجم ۲۵ میکرولیتر برای هر نمونه استفاده شد (Lavery و همکاران، ۲۰۰۴؛ Saiki و همکاران، ۱۹۸۸). برای هر نمونه، ۲/۵ میکرولیتر ۱۰X PCR Buffer، ۱/۵ میکرولیتر 50Mm MgCl<sub>2</sub>، ۱ میکرولیتر 10Mm dNTPs، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها (با غلظت ۱۰ پیکومول)، ۰/۴ میکرولیتر Taq DNA polymerase، ۶ میکرولیتر از DNA که در نهایت حجم آن با ddH<sub>2</sub>O به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. چرخه‌های واکنش PCR نیز طبق برنامه جدول ۲ انجام شد. جهت اطمینان از تکثیر قطعات مورد نظر، محصولات PCR با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شدند. سپس نمونه‌ها جهت تعیین توالی به شرکت تکاپو زیست فرستاده شد.

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

جدول ۲: برنامه حرارتی برای انجام واکنش PCR

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



شکل ۱: موقعیت ایستگاه‌های نمونه‌برداری در شمال خلیج فارس

جدول ۱: نام و موقعیت جغرافیایی ایستگاه‌های نمونه‌برداری

ردیف	نام ایستگاه	شهر	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی
۱	اسکله ۱۴	بندرامام خمینی	۳۰° ۲۸' ۵۸"	۴۹° ۰۴' ۲۳"
۲	اسکله بحرکان	هندیجان	۳۰° ۰۶' ۳۵"	۴۹° ۴۶' ۱۸"
۳	اسکله مسافربری	خارک	۲۹° ۱۴' ۴۹/۷۳"	۵۰° ۱۹' ۴۶/۳۱"
۴	نفتکش	بوشهر	۲۹° ۴۸' ۵۰"	۵۰° ۱۷' ۵۱"
۵	حرای ملگنزه	بردخون	۲۷° ۵۰' ۵۲/۶۹"	۵۱° ۳۴' ۵۶/۹۳"
۶	اولی جنوبی	دیر	۲۷° ۰۸' ۳۳"	۵۱° ۹۰' ۱۴"
۷	نابیند	عسلویه	۲۷° ۰۲' ۰۲"	۵۲° ۶۷' ۴۱"
۸	اسکله صیادی	بستانه	۲۶° ۵۲' ۹۵"	۵۴° ۴۴' ۸۷"
۹	پارک زیتون	جزیره قشم	۲۵° ۵۵' ۲۸"	۵۶° ۱۶' ۰۴"

پس از هضم بافت به مدت یک شب، به هر میکروتیوپ مقدار ۲۴۰ میکرولیتر NaCl ۵ مولار افزوده شد و نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس مقدار ۲۵۰ میکرولیتر کلروفرم به هر میکروتیوپ افزوده شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. به آرامی فاز بالایی جدا و تیوپ جدیدی انتقال داده شد. مقدار ۷۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول از پیش سرد شده (۲۰°C-) به نمونه‌ها اضافه شد، میکروتیوپ‌ها به وسیله دست به آرامی چندین مرتبه سر و ته شدند و در دور ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. DNA به صورت ته نشین سفید رنگی در میکروتیوپ شکل می‌گرفت. ایزوپروپانول دور ریخته شده و نمونه را با ۵۰۰ میکرولیتر الکل ۷۰ درجه شستشو داده به مدت ۵ دقیقه در دور ۸۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و فاز رویی خالی شد. جهت خشک شدن و تبخیر الکل از ته نشست DNA، نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در هوای اتاق قرار داده شدند. پس از خشک شدن برای محلول نمودن DNA، ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل افزوده شد. جهت تعیین کمیت DNA استخراج شده از دستگاه اسپکتروفتومتر و



(۲) با ۱۰۰۰ تکرار توسط نرم افزار MEGAV رسم شد. از این توالی‌ها و توالی‌های ثبت شده پیشین با روش Neighbour joining و مدل K2P نشان داد گونه مورد نظر در یک کلاد با گونه *S. mordax* قرار گرفته و با ۱۰۰ درصد حمایت Bootstrap، از کلاد دیگر (دیگر گونه‌های جنس *Saccostrea*) جدا است. هم‌چنین گونه خلیج فارس با ۹۷ درصد حمایت Bootstrap، گونه خواهری *S. mordax* موجود در ماداگاسکار است ولی با *S. mordax* های آب‌های چین در کلاد جدا قرار گرفته است. حداقل و حداکثر فاصله ژنتیکی محاسبه شده نمونه‌های این تحقیق در آب‌های خلیج فارس به ترتیب ۰.۲٪ و ۱.۴٪ می‌باشد که اختلاف قابل توجهی نداشت (جدول ۵). هم‌چنین با مقایسه این نمونه‌ها با سایر نقاط، بیش‌ترین فاصله ژنتیکی با گونه *S. cucullata* به مقدار ۲۴/۴٪ و کم‌ترین فاصله ژنتیکی با گونه *S. mordax* به میزان ۳/۵٪ محاسبه شد (جدول ۶).

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

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

جدول ۳: گونه‌های مورد استفاده در آنالیز ژن COI به همراه شماره دسترسی

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

## نتایج

جهت شناسایی مورفولوژی، ابتدا گونه اویستر از سایرین جدا شده و براساس خصوصیات مورفولوژی طبق منابع گفته شده تا حد جنس به عنوان *Saccostrea* شناسایی شد. سپس نمونه‌های این گونه مورد بررسی مولکولی قرار گرفت. در مجموع ۱۵ توالی COI از گونه مورد نظر در ایستگاه‌های مختلف به دست آمد که در بانک ژنی ثبت شد (جدول ۴). این توالی‌ها با توالی این ژن از گونه‌های جنس *Saccostrea* (*S. mordax*، *S. cucullata* و *S. glomerata*) که از بانک جهانی ژن استخراج شد با هم مقایسه شدند. هم‌چنین از دو گونه متعلق به خانواده Gryphaeidae عنوان برون گروه استفاده شد. درخت فیلوژنی (شکل

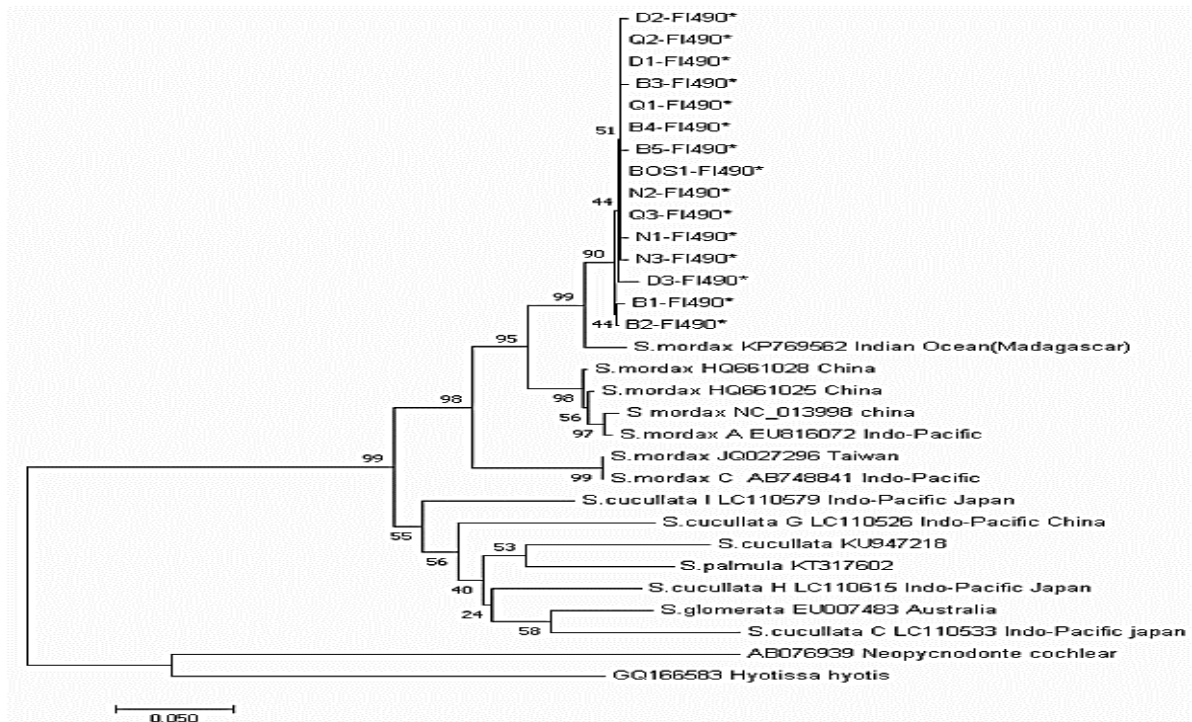
جدول ۵: میزان فاصله ژنتیکی محاسبه شده براساس مقیاس K2P ژن COI نمونه‌های این تحقیق در آب‌های خلیج فارس

Species	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴
۱ B1-FI490														
۲ B2-FI490	۰.۰۰۵													
۳ B4-FI490	۰.۰۰۴	۰.۰۰۵												
۴ B5-FI490	۰.۰۰۷	۰.۰۰۹	۰.۰۰۴											
۵ B3-FI490	۰.۰۰۷	۰.۰۰۹	۰.۰۰۴	۰.۰۰۷										
۶ D1-FI490	۰.۰۰۵	۰.۰۰۷	۰.۰۰۲	۰.۰۰۵	۰.۰۰۵									
۷ D2-FI490	۰.۰۰۵	۰.۰۰۷	۰.۰۰۲	۰.۰۰۵	۰.۰۰۵	۰.۰۰۴								
۸ D3-FI490	۰.۰۱۳	۰.۰۱۴	۰.۰۰۹	۰.۰۰۹	۰.۰۱۳	۰.۰۱۱	۰.۰۱۱							
۹ N1-FI490	۰.۰۰۵	۰.۰۰۷	۰.۰۰۲	۰.۰۰۵	۰.۰۰۵	۰.۰۰۴	۰.۰۰۴	۰.۰۱۱						
۱۰ N2-FI490	۰.۰۰۴	۰.۰۰۵	۰.۰۰۰	۰.۰۰۴	۰.۰۰۴	۰.۰۰۲	۰.۰۰۲	۰.۰۰۹	۰.۰۰۲					
۱۱ N3-FI490	۰.۰۰۵	۰.۰۰۷	۰.۰۰۲	۰.۰۰۵	۰.۰۰۵	۰.۰۰۴	۰.۰۰۴	۰.۰۱۱	۰.۰۰۴	۰.۰۰۲				
۱۲ BOS-FI490	۰.۰۰۵	۰.۰۰۷	۰.۰۰۲	۰.۰۰۵	۰.۰۰۵	۰.۰۰۴	۰.۰۰۴	۰.۰۱۱	۰.۰۰۴	۰.۰۰۲	۰.۰۰۴			
۱۳ Q1-FI490	۰.۰۰۵	۰.۰۰۷	۰.۰۰۲	۰.۰۰۵	۰.۰۰۵	۰.۰۰۴	۰.۰۰۴	۰.۰۱۱	۰.۰۰۴	۰.۰۰۲	۰.۰۰۴	۰.۰۰۴		
۱۴ Q2-FI490	۰.۰۰۵	۰.۰۰۷	۰.۰۰۲	۰.۰۰۵	۰.۰۰۵	۰.۰۰۴	۰.۰۰۴	۰.۰۱۱	۰.۰۰۴	۰.۰۰۲	۰.۰۰۴	۰.۰۰۴	۰.۰۰۴	
۱۵ Q3-FI490	۰.۰۰۵	۰.۰۰۷	۰.۰۰۲	۰.۰۰۵	۰.۰۰۵	۰.۰۰۴	۰.۰۰۴	۰.۰۱۱	۰.۰۰۴	۰.۰۰۲	۰.۰۰۴	۰.۰۰۴	۰.۰۰۰	۰.۰۰۴



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

Species	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵	۱۶
۱ Persian Gulf																
۲ <i>Saccostrea mordax</i> NC013998	۰.۰۸۰															
۳ <i>Saccostrea mordax</i> KP769562	۰.۰۳۵	۰.۰۹۴														
۴ <i>Saccostrea mordax</i> HQ661025	۰.۰۶۹	۰.۰۱۶	۰.۰۷۵													
۵ <i>Saccostrea mordax</i> HQ661028	۰.۰۶۶	۰.۰۱۹	۰.۰۷۲	۰.۰۰۳												
۶ <i>Saccostrea mordax</i> JQ027296	۰.۱۲۲	۰.۰۱۵	۰.۱۲۱	۰.۰۱۶	۰.۰۰۲											
۷ <i>Saccostrea mordax</i> EU816072	۰.۰۷۶	۰.۰۱۰	۰.۰۸۶	۰.۰۱۳	۰.۰۱۶	۰.۰۰۹										
۸ <i>Saccostrea mordax</i> AB748841	۰.۱۲۲	۰.۰۱۵	۰.۱۲۱	۰.۰۱۶	۰.۰۱۲	۰.۰۰۰	۰.۰۰۹									
۹ <i>Saccostrea glomerata</i> EU007483	۰.۲۱۰	۰.۱۸۲	۰.۱۹۶	۰.۱۷۴	۰.۱۷۸	۰.۱۹۲	۰.۱۸۲	۰.۱۹۲								
۱۰ <i>Saccostrea cucullata</i> KU947218	۰.۲۴۴	۰.۲۱۸	۰.۲۱۹	۰.۲۱۴	۰.۲۱۰	۰.۲۰۱	۰.۲۱۸	۰.۲۰۱	۰.۲۰۴							
۱۱ <i>Saccostrea cucullata</i> LC110533	۰.۲۶۲	۰.۲۱۸	۰.۲۴۲	۰.۲۱۴	۰.۲۱۸	۰.۲۱۹	۰.۲۰۹	۰.۲۱۹	۰.۱۲۵	۰.۱۷۰						
۱۲ <i>Saccostrea cucullata</i> LC110526	۰.۲۰۶	۰.۲۱۴	۰.۲۰۹	۰.۲۰۵	۰.۲۰۹	۰.۲۳۶	۰.۲۱۴	۰.۲۳۶	۰.۱۸۵	۰.۱۸۷	۰.۱۵۵					
۱۳ <i>Saccostrea cucullata</i> LC110615	۰.۲۰۳	۰.۱۷۹	۰.۲۰۶	۰.۱۸۴	۰.۱۸۸	۰.۱۸۸	۰.۱۸۸	۰.۱۸۸	۰.۱۳۸	۰.۱۵۸	۰.۱۶۲	۰.۱۶۸				
۱۴ <i>Saccostrea cucullata</i> LC110579	۰.۱۸۳	۰.۱۳۷	۰.۱۵۹	۰.۱۳۴	۰.۱۳۸	۰.۱۶۶	۰.۱۳۷	۰.۱۶۶	۰.۱۶۷	۰.۱۶۸	۰.۲۰۶	۰.۱۶۸	۰.۱۸۸			
۱۵ <i>Saccostrea palmula</i> KT317602	۰.۲۲۸	۰.۱۷۸	۰.۲۲۳	۰.۱۷۴	۰.۱۷۸	۰.۱۹۶	۰.۱۷۸	۰.۱۹۶	۰.۱۵۰	۰.۱۴۲	۰.۱۷۶	۰.۱۸۹	۰.۱۶۳	۰.۱۴۶		
۱۶ <i>Neopycnodonte cochlear</i> AB076939	۰.۵۵۸	۰.۵۴۳	۰.۵۳۷	۰.۵۵۰	۰.۵۴۴	۰.۵۵۷	۰.۵۵۷	۰.۵۵۷	۰.۵۷۰	۰.۵۴۴	۰.۶۱۳	۰.۵۵۷	۰.۵۹۲	۰.۵۵۸	۰.۵۶۴	
۱۷ <i>Hyotissa hyotis</i> GQ166583	۰.۴۱۴	۰.۵۲۷	۰.۵۰۲	۰.۵۴۲	۰.۵۳۵	۰.۴۷۵	۰.۵۳۴	۰.۴۷۵	۰.۵۴۰	۰.۵۱۳	۰.۴۸۱	۰.۴۸۶	۰.۵۱۲	۰.۴۹۵	۰.۵۱۳	۰.۴۲۸



شکل ۲: درخت فیلوژنی رسم شده براساس توالی قسمتی از ژن COI با استفاده از آنالیز NJ. گونه‌های خانواده Gryphaeidae به‌عنوان گروه بیرونی در نظر گرفته شد. (کلاد مربوط به گونه خلیج فارس با علامت \* مشخص شده است)

آن‌ها در این مناطق منحصراً براساس مورفولوژی پوسته بوده است. بر این اساس بیش‌تر منابع گونه غالب اویستر سواحل خلیج فارس را *Saccostrea cucullata* نام‌گذاری می‌کنند. هم‌چنین Bosch و همکاران (۱۹۹۵) حسین‌زاده‌صحافی و همکاران (۱۳۷۹) از *Saccostrea cucullata* به‌عنوان تنها گونه جنس *Saccostrea* در خلیج فارس نام برده‌اند. بررسی‌ها نشان داده با وجود استفاده گسترده از نام *Saccostrea cucullata* برای اویسترهای اقیانوس هند و آرام، در مورد صحت نام‌گذاری آن شک و تردید وجود دارد (Dinamani, ۱۹۷۶). Lam و Morton (۲۰۰۶) هم نشان دادند شباهت‌های بین گونه‌ای و تفاوت‌های درون گونه‌ای در

## بحث

طبقه‌بندی اویسترها براساس ویژگی‌های پوسته به دلیل تغییرپذیر بودن پوسته، مشکل است (Seilacher و همکاران، ۱۹۸۵) و این امر منجر به اشتباهاتی در طبقه‌بندی آن‌ها می‌شود (Guo و Wang, ۲۰۰۸). این مشکل در جنس *Saccostrea* به دلیل تغییرپذیری زیاد پوسته، حادث شده و طبقه‌بندی آن‌ها بسیار گیج‌کننده است (Lam و Morton, ۲۰۰۶). اویسترهای صخره‌ای یکی از زیست‌مندان خلیج فارس است که وضعیت تاکسونومی آن‌ها به خوبی شناخته نشده است و شناسایی



۴. میرزا، ر.؛ عضدی، م.؛ توسل پور، ا. و وزیر زاده، ا.، ۱۳۹۴. ارزیابی نرخ فیلتراسیون دو گونه‌ای *Barbatia hellblingii* و *Saccostrea cucullata* در امکان‌سنجی جهت پایشگر زیستی سواحل خلیج فارس. علوم و فنون دریایی ایران. دوره ۱۴، شماره ۱، صفحات ۱۱ تا ۲۰.
۵. میرزا، ر.؛ فخری، ع.؛ فقیری، ا. و عظیمی، ع.، ۱۳۹۲. بررسی نسبت نیکل و وانادیوم ناشی از آلودگی‌های نفتی در رسوبات و صدف صخره‌ای (*Saccostrea cucullata*) در سواحل استان بوشهر، خلیج فارس. نشریه اقیانوس‌شناسی. دوره ۴، شماره ۴، صفحات ۳۵ تا ۴۳.
۶. یوسفی سیاه‌کلرودی، س.؛ وثوقی، غ. و رضایی، س.، ۱۳۸۴. بررسی مولکولی جمعیت صدف‌های خوراکی *Saccostrea cucullata* در سواحل شمالی خلیج فارس و دریای عمان. پژوهش و سازندگی در امور دام و آبزیان. دوره ۱۷، شماره ۱، صفحات ۲ تا ۷.
۷. Banks, M.A.; McGoldrick, D.J.; Borgeson, W. and Hedgecock, D., 1994. Gametic incompatibility and genetic divergence of Pacific and Kumamoto oysters, *Crassostrea gigas* and *C. sikamea*. Marine Biology. Vol. 121, No. 1, pp. 127-135.
۸. Bosch, D.T.; Dance, S.P.; Moolenbeek, R.G. and Oliver, P.C., 1995. Seashells of eastern Arabia. Dubai Motivate publishing 18735446429781873544648.
۹. Dumbauld, B.R.; Kauffman, B.E.; Trimble, A.C. and Ruesink, J.L., 2011. The Willapa Bay oyster reserves in Washington State: fishery collapse, creating a sustainable replacement and the potential for habitat conservation and restoration. J of Shellfish Research. Vol. 30, No. 1, pp: 71-8۲.
۱۰. Folmer, O.; Black, M.; Hoeh, W.; Lutz, R. and Vrijenhoek, R., 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Molecular Marine Biology and Biotechnology Vol 3, pp: 294-299.
۱۱. Guo, X.; Li, C.; Wang, H. and Xu, Z., 2018. Diversity and Evolution of Living Oysters. Journal of Shellfish Research. Vol. 37, No. 4, pp: 755-771.
۱۲. Huber, M., 2010. Compendium of bivalves. A Full-color Guide to 3,300 of the World's Marine Bivalves. A Status on Bivalvia after 250 Years of Research. ConchBooks, Hackenheim, Germany. 901 p.
۱۳. Kemp, W.M.; Boynton, W.R.; Adolf, J.E.; Boesch, D.F.; Boicourt, W.C.; Brush, G.; Cornwell, J.C.; Fisher, T.R.; Glibert, P.M.; Hagy, J.D. and Harding, L.W., 2005. Eutrophication of Chesapeake Bay: historical trends and ecological interactions. Marine Ecology Progress Series. Vol. 303, pp: 1-29.
۱۴. Kumar, S.; Stecher, G. and Tamura, K., 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Molecular biology & evolution. pp: 1870-1874.
۱۵. Lam, K. and Morton, B., 2006. Morphological and mitochondrial-DNA analysis of the Indo-West Pacific rock oysters. J of Molluscan Studies. Vol. 72, No. 3, pp: 235-2۴۰.
۱۶. Lavery, S.; Chan, T.Y.; Tam, Y.K. and Chu, K.H., 2004. Phylogenetic relationships and evolutionary history of the shrimp genus *Penaeus* s.l. derived from mitochondrial DNA. Molecular phylogenetics & evolution. Vol. 31, No. 1, pp: 39-49.
۱۷. Liu, J.U.N.; Li, Q.I.; Kong, L.; Yu, H. and Zheng, X., 2011. Identifying the true oysters with mitochondrial phylogeny and distance-based DNA barcoding. Molecular ecology resources. Vol. 11, No. 5, pp: 820-830.
۱۸. Porebski, S.; Bailey, L.G.; and Baum, B.R., 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. Plant molecular biology reporter. Vol. 15, No. 1, pp: 8-1۰.
۱۹. Quayle, D.B., 1988. Pacific oyster culture in British Columbia. Canadian Bulletin of Fisheries and Aquatic Science. pp: 218-241.
۲۰. Seilacher, A.; Matyja, B.A. and Wierzbowski, A., 1985. Oyster beds: morphologic response to changing substrate conditions. In sedimentary & evolutionary cycles. pp: 421-4۳۰.
۲۱. Schindel, D.E. and Miller, S.E., 2005. DNA barcoding a useful tool for taxonomists. Nature. Vol. 435, No. 7038, pp: 17-27.
۲۲. Thompson, J.D.; Higgins, D.G. and Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic acids research. Vol. 22, No. 22, pp: 4673-4۶۸۰.
۲۳. Wahlberg, N.; Braby, M. F.; Brower, A. Z.; Jong, R.; Lee, M.; Nylin, S., 2005. Synergistic effects of combining morphological and molecular data in resolving the phylogeny of butterflies and skippers. Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Science. pp: 1577-1586.
۲۴. Wang, H. and Guo, X., 2008. Identification of *Crassostrea ariakensis* and related oysters by multiplex species-specific PCR. J of Shellfish Research. Vol. 27, No. 3, pp: 481-487.
- ویژگی‌های پوسته از دلایل غیرقابل اعتماد بودن طبقه‌بندی مورفولوژی در جنس *Saccostrea* می‌باشد. بنابراین می‌توان گفت بررسی‌های مولکولی و روابط فیلوژنی در موجوداتی که شناسایی آن‌ها براساس مورفولوژی دشوار است، مفید است (Wahlberg و همکاران، ۲۰۰۵). مطالعات Liu و همکاران (۲۰۱۱) نشان داد ژن COI جهت تفکیک گونه‌های گونه‌های اویستر مناسب‌تر است و این ژن گونه‌های نزدیک به هم را بهتر از هم تفکیک می‌کند. در این مطالعه برای شناسایی گونه غالب *Saccostrea* در سواحل شمالی خلیج فارس از توالی‌یابی ژن COI استفاده شد که نتایج نشان داد گونه مذکور، گونه خواهری *S. mordax* ماداگاسکار در اقیانوس هند است و با *S. mordax* دیگر مناطق در دو کلاد جدا قرار گرفته‌اند. هم‌چنین این گروه با ۱۰۰ درصد بوت استرپ با دیگر جنس‌های *Saccostrea* به‌طور مجزا قرار گرفته‌اند. Lam و Morton (۲۰۰۶) نیز با استفاده از آنالیز توالی‌یابی ژن ۱۶S *Saccostrea* هند-آرام، نشان داد در آن منطقه دو ابر گونه (*S. cucullata* superspecies) و *S. mordax* وجود دارد که در کلاد جداگانه قرار دارند. گونه‌های *S. mordax*، *S. glomerata*، *S. kegaki* و *S. cucullata* در یک کلاد و *S. mordax*-A، B در کلاد دیگری قرار دارند که با نتایج این تحقیق هم‌خوانی دارد. از طرفی در گونه‌های اویستر جنس *Saccostrea* بیش‌ترین فاصله ژنتیکی درون گونه‌ای در میان *S. mordax* و به‌میزان ۲/۲٪ مشاهده شد. هم‌چنین K2P بین گونه‌های جنس *Saccostrea* مقدار ۲۱/۴-۱۴/۸٪ می‌باشد (Guo و همکاران، ۲۰۱۸). در تحقیق صورت گرفته توسط Liu و همکاران (۲۰۱۱) بر روی اویسترهای خانواده اوستروویده، فاصله K2P درون گونه‌ای و بین گونه‌ای با استفاده از ژن COI به ترتیب مقدار ۱/۴-۰ و ۲/۶-۳۲/۲ به‌دست آمد. مشاهدات شخصی نشان داد که *S. mordax* تنهادر سواحل صخره‌ای کاملاً دریایی و در معرض امواج وجود دارند در صورتی که گونه‌های دیگر همین جنس در سواحل کم‌تر در معرض امواج یا سواحل پوشیده ساکن بودند که با نتایج Lam و Morton (۲۰۰۶) یکسان است. ایشان نیز گزارش کردند *S. mordax* تنهادر سواحل صخره‌ای کاملاً دریایی و در معرض امواج وجود دارد و دیگر *Saccostrea* طیف گسترده‌ای از زیستگاه‌ها از مانگروهای مناطق لب‌شور تا سواحل دریایی کم‌تر در معرض امواج، قرار دارند. به‌طور کلی نتایج این تحقیق نشان می‌دهد توالی‌یابی ژن COI ابزار مناسبی برای تعیین گونه‌های جنس *Saccostrea* می‌باشد.

## منابع

۱. حسین‌زاده‌صحافی، ه.؛ رامشی، ح. و دقوکی، ب.، ۱۳۹۶. موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور. ۲۴۸ صفحه.
۲. رضایی، ح.، ۱۳۷۴. بررسی پراکنش نرم‌تنان در آب‌های کم‌عمق پیرامون برخی از جزایر ایرانی خلیج فارس. گزارش نهایی موسسه تحقیقات شیلات ایران. ۱۶۲ صفحه.
۳. سردیان، س.، ۱۳۹۳. بررسی بیان ژن متالوتیونین به‌عنوان بیومارکر مواجهه با کادمیوم در صدف *Crassostrea* sp. رساله دکتری تخصصی. دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر. ۱۱۰ صفحه.

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

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

Received: July 2019

Accepted: October 2019

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

### Abstract

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

---

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

