شناسایی گونه *Callista umbonella* (bivalve: Veneridae) با تاکید بر مطالعات مورفولوژیک و مولکولی

- **فریبا قایدی**: گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر
- **حسین ذوالقرنین***: گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر
- **سیدمحمدباقر نبوی**: گروه زیست شناسی‌دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون‌دریایی خرمشهر
- **احمد سواری**: گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر
- **محمد علی سالاری**: گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر

تاریخ دریافت: دی ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: فروردین ۱۳۹۶

چکیده

مطالعه حاضر به بررسی شناسایی دقیق دوکفه‌ای *Callista umbonella* در ساحل نایبند با استفاده از مطالعات ریخت‌شناسی و مولکولی پرداخته است. بدین منظور در اردیبهشت سال ۱۳۹۵ از دوکفه‌ای‌های این گونه نمونه‌برداری صورت گرفت. جهت ثبت ویژگی‌های مورفولوژیک مانند شکل کفه‌ها، تزیینات روی کفه‌ها، شکل آمبو، موقعیت، تعداد و شکل دندان‌های لولایی و رنگ عکس‌برداری انجام شد. جهت مطالعات مولکولی، DNA نمونه‌ها با استفاده از روش CTAB استخراج و قطعه ژنی زیر واحد یک سیتوکروم اکسیداز میتوکندری (COI) تکثیر و توالی‌یابی شد. نتایج شناسایی‌های مورفولوژیک، نشان داد تمامی نمونه‌ها به احتمال قوی متعلق به جنس *Callista* گونه *C.umbonella* از خانواده Veneridae می‌باشند. در مجموع تعداد ۱۷ توالی به‌دست آمد. به‌جز نمونه شماره ۹ (NI9) بلاست توالی‌های نمونه‌های مطالعه حاضر بیش‌ترین درصد شباهت را با گونه (DQ184850) *Turtonia minuta* از خانواده Veneridaeنشان دادند. نمونه شماره ۹ (NI9) بیش‌ترین شباهت را با گونه (DQ184808) *Costacallista impar* نشان داد که این گونه نیز از خانواده Veneridae محسوب می‌شود. ترسیم درختان و هم‌ترازی این توالی‌ها در بانک ژن فقط توانست تعلق آن‌ها را به خانواده Veneridae اثبات کند. نتایج توپولوژی درختان تکاملی برای هرسه آنالیز(Maximum parsimony, Maximum likelihood) در هر ۱۷ توالی نشان دادند، توالی نوکلئوتیدی ژن COI، در تمام نمونه‌ها که به‌عنوان یک گونه معرفی شده‌اند، یکسان نیست. با توجه به این‌که از نظر مورفولوژی شباهت زیادی در میان نمونه‌ها مشاهده شد با این‌حال اختلافات ژنتیکی در درختان ترسیم شده نشان داد احتمال پدید آمدن گونه‌ای جدید را نیز ممکن است وجود داشته باشد و با بررسی‌های بیش‌تر و مطالعات دقیق‌تر مورفولوژی و نشانگرهای مولکولی بیش‌تر نظر قاطعانه‌تری ارائه داد.

کلمات کلیدی: دوکفه‌ای، ژن سیتوکروم اکسیداز (COI)، فیلوژنی، مورفولوژی، نایبند

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

مقدمه

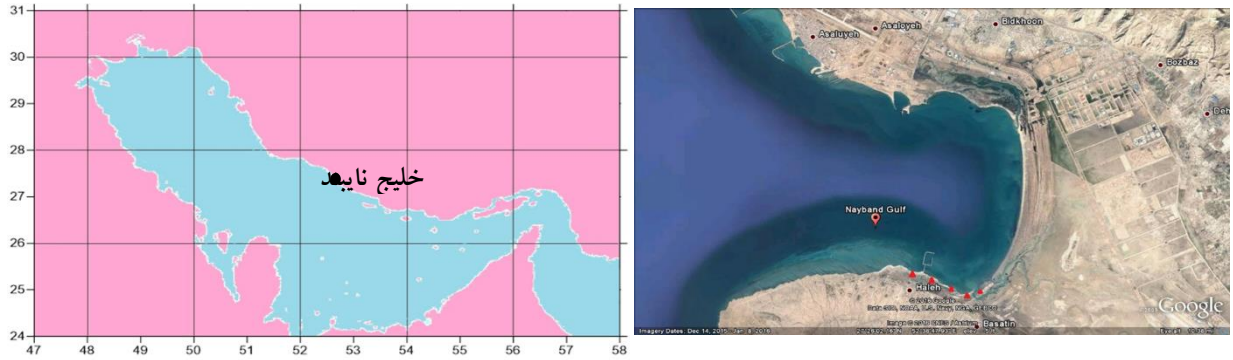
دوکفه‌ای‌ها از قدیم الایام مورد توجه انسان بوده‌اند و روز به روز کاربرد آن‌ها در نقاط مختلف دنیا بیش‌تر می‌گردد. دوکفه‌ای‌ها در کشورهایی مانند آمریکای شمالی، ژاپن، چین، بسیاری از کشورهای اروپایی، استرالیا و نیوزیلند منبع غذایی مهمی را تشکیل می‌دهند. از پوره‌صدف دوکفه‌ای‌ها به‌عنوان مکمل غذای دام و طیور استفاده می‌گردد (اشجع‌اردلان، ۱۳۷۲). دوکفه‌ای‌ها با ۳۰۰۰۰ گونه متنوع‌ترین رده شاخه نرم‌تنان بعد از رده شکم پایان می‌باشند. آن‌ها نقش مهمی را در زنجیره غذایی ماهیان در اکوسیستم‌های آبی به‌عهده دارند (Barnes و همکاران، ۲۰۰۱). دوکفه‌ای‌ها به شکل تزیینی، در صنعت آبزی‌پروری، صنعت ماهیگیری ونیز در صنایع داروسازی مورد استفاده قرار می‌گیرند. هم‌چنین در چرخه غذایی زیست محیطی نقش مهمی را بر عهده دارند (سعیدی و همکاران، ۱۳۸۶). رده دوکفه‌ای‌ها شامل Mussle (ماسل‌ها)، Scallop (اسکالوپ)، Oyster (اویستر) و Clam (کلم) می‌باشند (Gosling، ۲۰۰۳)، که از میان آن‌ها کلم‌ها ارزش غذایی بالاتری را دارامی‌باشند(حسین‌زاده‌صحافی،۱۳۸۳). Veneridae یکی از بزرگ‌ترین و متنوع‌ترین خانواده دوکفه‌ای‌ها و جز کلم‌ها محسوب می‌شوند. این خانواده دارای صدها گونه می‌باشد که تعداد زیادی از آن‌ها خوراکی‌اند. اکثر گونه‌ها در رسوبات فرو می‌روند اما گروهی درمیان صخره‌ها، علف‌های‌دریایی یا مرجان‌هازندگی می‌کنند. در مناطق جزر و مدی تا آب‌های عمیق دیده می‌شوند. نمونه‌های موجود در آب‌های گرم، اکثراً رنگی می‌باشند. گونه‌های این خانواده بخش اعظمی از جمعیت جانوران منطقه بین جزر و مدی و نواحی عمیق را تشکیل می‌دهند (حسین‌زاده‌صحافی و همکاران، ۱۳۷۹). به دلیل این‌که خصوصیات مورفولوژیک برای شناسایی گونه‌ها کافی نمی‌باشد و ویژگی‌هایی مانند مورفولوژی لولا، دندان‌ها، مورفولوژی پوسته و ترکیب پوسته در طول زمان به‌آرامی تغییر می‌کند. بنابراین تاکسونومیست‌ها برای رفع این مشکل به تشخیص گونه‌ها براساس روش‌های سیستماتیک مولکولی پرداخته‌اند تا از سردرگمی و شک در تشخیص گونه‌ها رها شوند (Radulovici و همکاران، ۲۰۱۰). برای غلبه بر چنین مسایلی، درحال حاضر روشی استاندارد مبتنی بر توالی ژن COI میتوکندری که در حدود ۶۵۰bp می‌باشد، به‌عنوان ابزاری سودمند برای شناسایی موجودات و تعیین مرز گونه‌ها به‌کار می‌رود. اختلافات موجود در ناحیه ژن COI میتوکندریایی در میان گونه‌های جانوری به شکلی است که از آن می‌توان به‌عنوان یک شناساگر ژنتیکی برای تشخیص هویت بیولوژیکی، تعیین تنوع ژنتیکی و روابط فیلوژنتیکی بین جمعیت‌ها و گونه‌های نزدیک به‌هم استفاده کرد (Hebert و همکاران، ۲۰۰۳). تاکنون مطالعات زیادی بر روی دوکفه‌ای‌های آب‌های ایران صورت گرفته‌است که از آن‌جمله تحقیقات اشجع‌اردلان بر پراکنش گونه‌های دوکفه‌ای مناطق جزر و مدی چابهار (۱۳۷۹)، دوکفه‌ای‌های جزایر خارک و خارکو (۱۳۸۷) و فراوانی دوکفه‌ای *Amiantis umbonella* در سواحل گلی بندرعباس می‌باشد. از جمله دیگر مطالعات توسط محققان دیگر می‌توان به بررسی فراوانی دوکفه‌ای‌های سواحل صخره‌ای طیس در خلیج چابهار توسط کاظمیان و همکاران (۱۳۸۸) و جمعیت دوکفه‌ای‌های غالب سواحل هندیجان در خلیج فارس، توسط نبوی و همکاران (۱۳۸۸) اشاره کرد. تجلی‌پور (۱۳۷۳) در مطالعات جامعی به بررسی سیستماتیک و انتشار نرم‌تنان سواحل خلیج فارس پرداخت و کتابی در این زمینه منتشر کرد.

بررسی توالی‌ها در پایگاه اطلاعاتی NCBI در ارتباط با جنس *Callista* نشان داد تاکنون تنها ۱۰ توالی برای این جنس ثبت شده است و مطالعات مورفولوژیک در ارتباط با شناسایی این جنس نیز در خلیج فارس معدود می‌باشد. بنابراین در این مطالعه به شناسایی دقیق این جنس براساس روش DNA بارکدینگ پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از سواحل شنی- ماسه‌ای خلیج نایبند (E ۵۲°۴۳′ N ۲۷°۲۷′) در اردیبهشت ماه سال ۱۳۹۵ انجام گرفت (شکل ۱). جهت شناسایی مورفولوژی در محل از نمونه‌ها عکس تهیه شد. شناسایی مورفولوژیک براساس خصوصیات کلیدی مانند شکل صدف، تزیینات روی کفه‌ها، شکل آمبو، موقعیت، تعداد و شکل دندان‌های لولایی، رنگ و... صورت گرفت. شناسایی موفولوژیکی با استفاده از کلید شناسایی FAO (Niam و Carpetner، ۱۹۹۸) و یافته‌های تجلی‌پور (۱۳۷۳) در کتاب نرم‌تنان سواحل ایرانی خلیج فارس انجام شد. سپس از آن‌جایی‌که دوکفه‌ای‌ها دارای صدف هستند و این صدف مانع رسیدن الکل به بافت درونی می‌شود، صدف نمونه‌ها کمی باز شد تا الکل به‌خوبی در آن‌ها نفوذ کند و بافت‌های داخلی به‌طور کامل فیکس شوند. این نمونه‌ها برای شناسایی مولکولی استخراج DNA از۶۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده CTAB ٪۲ (۱۰۰mMTrisHCl, ۲۰mM EDTA,۱,۴ M NaCl, CTAB) استفاده شد (Popa و همکاران، ۲۰۰۷). کیفیت و کمیت DNA با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ تعیین گردید. سپس با استفاده از آغازگر جهانی (Folmer و همکاران، ۱۹۹۴) واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز جهت تکثیر قطعه ژنی سیتوکروم اکسیداز I (COI) انجام شد. هر واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتری شامل بافر (1X)، ۱ میلی‌مولار Mgcl2، ۰/۲ میلی‌مولار dNTP، ۵ پیکومول از هر آغازگر رفت و برگشت، ۱/۵U آنزیم Tag DNA Polymerase و ۳۰-۲۰ نانوگرم

DNA الگو بود. برنامه حرارتی برای واکنش موردنظر شامل: مرحله واسرشته‌سازی اولیه: ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲ دقیقه و مرحله واسرشته‌سازی: ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه، مرحله الحاق: ۴۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، مرحله بسط: ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۹۰ دقیقه و نهایتاً مرحله بسط نهائی: ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۷ دقیقه و تعداد ۳۵ چرخه در نظر گرفته شد. محصولات تکثیر شده به همراه سایز مارکر۱۰۰bp بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز و توسط safe stain رنگ‌آمیزی شدند. محصولات PCR مناسب، جهت تعیین توالی به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال گردیدند. درخت فیلوژنی تجزیه و تحلیل ماتریس داده‌ها براساس روش‌های ماکزیمم پارسیمونی(Maximum Parsimony) با استفاده از نرم‌افزار PAUP(Swofford، ۲۰۰۲)، ماکزیمم احتمال (Maximum Likelihood) با استفاده از نرم‌افزار Mega6 (Tamura و همکاران، ۲۰۱۳) انجام گردید. درخت فیلوژنی با استفاده از توالی‌های به‌دست آمده و چندین توالی از گونه‌های دیگر خانواده Veneridae بر پایه برون گروه Lirophora mariae (DQ458483) ترسیم شد.



شکل۱: موقعیت منطقه نمونه‌برداری

نتایج

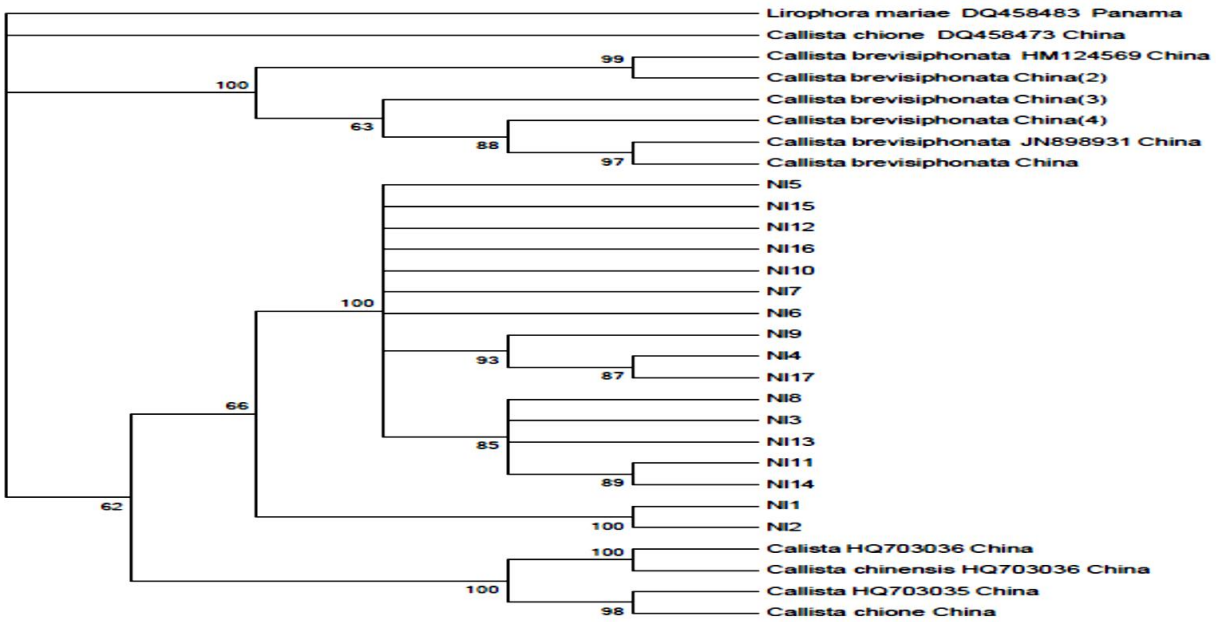
شناسایی مورفولوژی: همه نمونه‌های جمع‌آوری شده، مورد بررسی مورفولوژیک قرار گرفتند و اغلب در حد گونه شناسایی شدند. بررسی‌های به‌عمل آمده و تطبیق خصوصیات کلیدی مانند شکل صدف، تزیینات روی کفه‌ها، شکل آمبو، موقعیت، تعداد و شکل دندان‌های لولایی، رنگ و... که در شناسایی دوکفه‌ای‌ها به‌کار می‌روند نشان‌داد تمامی نمونه‌ها از نظر مورفولوژی متعلق به خانواده Veneridae، جنس *Callista* گونه *C.umbonella* می‌باشند. تمامی نمونه‌ها از نظر مورفولوژی دارای ویژگی‌های یکسانی می‌باشند با این تفاوت که رنگ‌آمیزی کفه‌ها در آن‌ها تا حدودی متفاوت است.

صدف در این گونه به اشکال تخم‌مرغی و یا مثلثی شکل بوده و حاشیه‌های جلویی، شکمی و پشتی در آن به‌صورت گرد دیده می‌شوند. حاشیه‌های پشتی جلویی تا حدودی مقعر و حاشیه عقبی پشتی تا حدودی محدب می‌باشند. لولاها در دوکفه صدف از نظر اندازه و شکل مساوی بوده و زمانی که بسته می‌شوند هیچ‌گونه شکافی بین آن‌ها دیده نمی‌شود. تزیینات روی صدف در آن‌ها شامل خطوط رشدی است که به‌صورت خطوط کم‌عق با شیارهای شکمی هم حاشیه وجود دارند. قسمت هلالی با حالت نیزه‌ای شکل دارای شیاری سطحی و ظریف می‌باشد که به نیمه حاشیه پشتی جلویی ختم می‌شود. این گونه دارای آمبو برجسته‌ای می‌باشد که به سمت جلو متمایل شده و هم‌چنین در قسمت جلو نوک‌دار است. سپر در آن‌ها به‌خوبی رشد یافته نیست. قسمت بیرونی صدف دارای رنگ سفید می‌باشد و ممکن است رنگ قهوه‌ای کم‌رنگ با الگوهای زیکزاکی در قسمت آمبو و الگوهای رنگی ارغوانی در قسمت حاشیه پشتی آن‌ها دیده شود. قسمت هلالی صدف تا حدودی با رنگ‌بندی ارغوانی پوشش داده می‌شود در قسمت چپ لولا سه دندان کاردینال وجود دارد، هیچ‌کدام از آن‌ها حالت گسستگی ندارند. دندان‌های مرکزی و جلویی به‌صورت پشتی به‌هم متصل و حالت Vشکلی را تشکیل می‌دهند. (شکل۲).

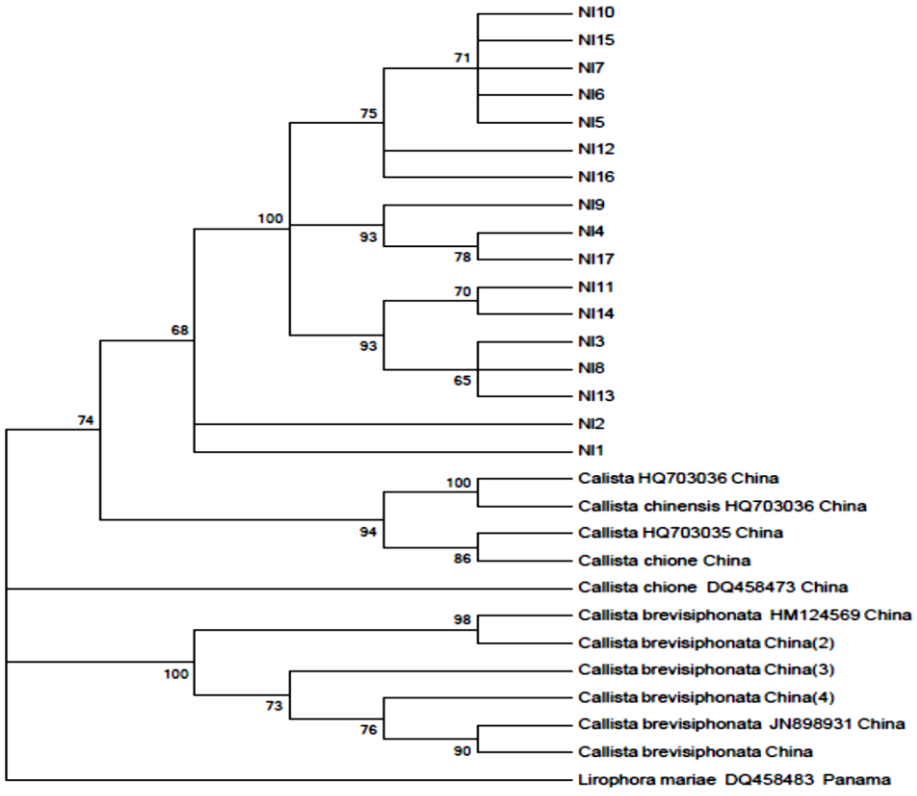
شناسایی ژنتیکی: تطبیق توالی‌های به‌دست آمده با توالی‌های موجود در ژن بانک جهانی NCBI نشان داد تاکنون هیچ توالی از این گونه برای ژن COI ثبت نشده است. مقایسه توالی‌های به‌دست آمده از نمونه‌ها با یکدیگرنشان داد بعضی از این توالی‌ها کاملاً بر هم منطبق نیستند و می‌توانند متعلق به گونه‌های جداگانه باشند. نتایج حاصل از Blast، شباهت ۸۰ درصدی را برای تمامی نمونه‌ها به‌جز نمونه ۹ (NI9) با توالی‌های مربوط به *Turtonia minuta*، نشان دادند.

شکل ۲: نمونه‌های جمع‌آوری شده *C.ambunella* (A-R)

توپولوژی درختان تکاملی نشان داد تمامی نمونه‌های مطالعه حاضر منشا مونوفیلتیک داشته و با ارزش بوت استراپ ۱۰۰ در یک کلاد مشترک قرار گرفته‌اند. با این‌حال نمونه‌های NI1 و NI2 از این شاخه جدا شده و در یک کلاد مجزا قرار گرفتند. نتایج هم‌چنین نشان داد نمونه‌های NI5، NI6، NI7، NI10، NI16، NI12، NI15، با یکدیگر رابطه خواهری دارند و این روابط مونوفیلتیک با ارزش بوت استراپ نسبتاً متوسط (ML=۷۵, MP= ۱۰۰) حمایت شده‌اند. نمونه ۹ (NI9) با ارزش بوت استرپ بالا (MP=۹۳، ML=۹۳) از دو نمونه خواهری خود (نمونه‌های NI4 و NI7) جدا شد و در کلادی جداگانه قرار گرفت. نمونه‌های NI3، NI8، NI11، NI14 نیز خوشه‌ای جداگانه را با ارزش بوت‌استراپ نسبتاً بالای (MP=۸۵، ML=۹۳) تشکیل دادند. توپولوژی درختان تکامل نشان داد کلاد مورفولوژیک ۱۷نمونه مطالعه حاضر با دیگر گونه‌های این جنس شامل *Callista chinensis* (HQ703036) *Callista chione*، *Callista* (HQ703035) روابط مونوفیلتیک نشان می‌دهند و با ضریب بوت استراپ نسبتاً خوب (MP=۶۲، ML=۷۴) حمایت می‌شوند (شکل‌های ۳ و ۴).



شکل ۳: درخت Maximum Parsimony جنس *Callista* براساس ژن COI حاصل از نرم‌افزار paup (درصدهای بوت استراپ از ۱۰۰۰ درخت روی گره‌ها نشان داده شده است)



شکل ۴: درخت Maximum Likelihood جنس *Callista* براساس ژن COI حاصل از نرم‌افزار Mega7 (درصد بوت استراپ از ۱۰۰۰ درخت روی گره‌ها نشان داده شده است)

بحث

تنوع بالا، کمبود اطلاعات سیستماتیک و تاکسونومی پیچیده خانواده Veneridae از دلایل ناشناخته‌ماندن روابط تکاملی در جنس‌های مختلف این خانواده می‌باشد (Chen و همکاران، ۲۰۱۳). سازگاری با شرایط متفاوت محیط و چرخه زندگی ممکن است سبب شباهت‌های مورفولوژیکی در گونه‌های متفاوت شود بنابراین ویژگی‌های مورفولوژیک لزوماً ارتباطات ژنتیکی را در این خانواده منعکس نمی‌کند (Canapa و همکاران، ۱۹۹۶؛ Harte، ۱۹۹۲) مطالعات مورفولوژیک نشان داد تمامی نمونه‌ها متعلق به گونه *Callista umbonella* از خانواده Veneridae می‌باشند. اشجع‌اردلان و همکاران (۱۳۸۷) فراوانی این گونه را در سواحل گلی بندرعباس مورد مطالعه قرار دادند و بیان کردند این گونه تنها گونه ثبت شده از جنس *Callista* در سواحل خلیج فارس می باشد. هیچ توالی از این گونه در بانک ژن وجود نداشت تا بتوان برای مقایسه نمونه‌ها که بررسی‌های مورفولوژی آن‌ها را متعلق به این گونه می‌دانست استفاده کرد. مطالعات رده‌بندی برای گونه نشان داد تاکنون چندین نام برای این گونه در مقالات متعدد استفاده شده است که از پرکاربردترین آن‌ها *Amiantis umbonella* می‌باشد. با این‌حال نتایج بررسی توالی تحت نام‌های دیگر در بانک ژن برای مقایسه مولکولی یافت نشد. به‌همین دلیل از سایر گونه‌های جنس *Callista* در ترسیم درختان فیلوژنی استفاده شد که همگی متعلق به کشور چین (اقیانوس آرام) بودند. ترسیم درختان و هم‌ترازی این توالی‌ها در بانک ژن فقط توانست تعلق آن‌ها را به خانواده Veneridae اثبات کند. عدم وجود توالی برای بررسی‌های مولکولی به علت نبود اطلاعات مولکولی کافی در مورد این گونه در منطقه اقیانوس هند و خلیج فارس می‌باشد. سایر توالی‌های به‌دست آمده از این جنس متعلق به کشور چین و اقیانوس آرام می‌باشد بنابراین امری بدیهی است که به‌علت تفاوت در نقاط جغرافیایی شکاف زیادی در درختان فیلوژنی رسم شده مشهود باشد و این توالی‌ها را در کلادی کاملاً مجزا قرار دهد. محققان حوزه پراکنش این گونه را مربوط به منطقه هند-آرام، خلیج فارس و غرب آفریقا می‌دانند (FischerPiette، ۱۹۷۳). بنابراین این احتمال وجود داشت که در صورت وجود توالی از این جنس و گونه از این نقاط جغرافیایی درصد شباهت بالایی با نمونه‌های مورد مطالعه نشان دهند. تحقیقات گسترده اخیر در ارتباط با این خانواده نشان داد گونه‌هایی که در درخت ژنتیکی براساس ژن COI در خوشه‌های مجزا قرار می‌گیرند از نظر تولیدمثلی جدا بوده و هر کدام گونه‌های جداگانه‌ای را تشکیل می‌دهند. از این‌رو این رویکرد مولکولی جدید قدرت بالایی در شناسایی مرز گونه‌ها در خانواده Veneridae داشته است (Tan و همکاران، ۲۰۱۰؛ De Leon، ۲۰۰۶).

Kappner و Bieler (۲۰۰۸) با مطالعه‌ای که در ارتباط با این خانواده براساس مورفولوژی و مولکولی (ژن‌های هسته‌ای و میتوکندریایی) انجام دادند بیان کردند این خانواده گروهی مونوفیلتیک می‌باشند با این حال در تمامی جنس‌های آن روابط مونوفیلتیک وجود ندارد. نتایج مورفولوژی آن‌ها نشان داد در بسیاری از جنس‌های آن‌ها تشابهاتی در شکل کفه‌ها و سایر ویژگی‌ها وجود دارد. بنابراین استفاده از خصوصیات ظاهری برای تشخیص آن‌ها مشکل است. ارتباطات فیلوژنی بین این خانواده و جنس‌های آن از مدت‌های طولانی در میان محققان مورد بحث بوده است (Coan و Scott، ۱۹۹۸). دستیابی به ارتباطات تکامل مولکولی براساس مطالعات مورفولوژی مسئله‌ساز خواهد بود. در بعضی موارد بررسی‌های مورفولوژی و مولکولی هم‌راستا نبوده و سبب بازنگری و ایجاد طبقه‌بندی جدید می‌شود (Campbell، ۲۰۰۰).

خصوصیات مورفولوژی نمونه‌های مطالعه حاضر نشان داد با این که اکثر کفه‌های صدف سفید رنگ می‌باشند، الگوی رنگ‌آمیزی در بعضی از آن‌ها متفاوت می‌باشد که این ویژگی در این گونه امری طبیعی است. Saeedi و همکاران (۲۰۱۰) با مطالعاتی که در ارتباط با بیولوژی این گونه از سواحل بندرعباس انجام دادند به این نتیجه رسیدند رنگ پوسته و قسمت آمبو آن‌ها از سفید تا رنگ بنفش متغیر است. شکل ظاهری صدف دوکفه‌ای‌ها در نمونه‌های مطالعه حاضر یکسان به‌نظر می‌رسید. سازگاری به انواع سوبستراهای محیطی و رفتارهای نقب زدن، سبب شباهت‌های مورفولوژیک درون‌گونه‌ای و بین‌گونه‌ای در دوکفه‌ای‌های خانواده Veneridae شده است. در نتیجه تغییرات فنوتیپی درون‌گونه‌ای و بین گونه‌ای در تشخیص مرز گونه‌ها در بسیاری از آن‌ها بسیار نامشخص است و اکثر مواقع هم‌پوشانی دارد بنابراین محققان پیشنهاد می‌کنند به‌دلیل محدودیت‌های مورفولوژیک سایر خصوصیات اکولوژی، تولیدمثلی و دیگر اطلاعات بیولوژی نیز برای تشخیص گونه‌ها درنظر گرفته شود. اعضای دوکفه‌ای‌های خانواده Veneridae از نظر مورفولوژی بسیار متنوع هستند(Frizzell، ۱۹۳۶؛ Canapa و همکاران، ۱۹۹۶، ۲۰۰۳). در تمامی درختان فیلوژنی ترسیم شده این نمونه‌ها در کلادی مجزا از توالی‌های جنس *Callista* از کشور چین قرار گرفتند. در درخت‌های فیلوژنی ترسیم شده برای هر دو آنالیز (ML,MP) نمونه‌های NI1 و NI2 با این‌که منشا مونوفیلتیک با سایر نمونه‌ها نشان دادند در شاخه ای مجزا نسبت به بقیه نمونه‌ها قرار گرفتند (شکل‌های ۳و ۴).

با این‌که نمونه‌ها از نظر مورفولوژی مطابقت زیادی با یکدیگر داشتند ولی اختلافات ژنتیکی در درختان ترسیم شده بین آن‌ها نشان داد باید احتمال پدید آمدن گونه‌ای جدید را نیز درنظر گرفت و با

بررسی‌ها و مطالعات دقیق‌تر مورفولوژی و نشانگرهای مولکولی بیش‌تر نظر قاطع‌تری ارائه داد.

منابع

۱. **اشجع‌اردلان، ا.، ۱۳۷۲.** شناسایی و بررسی پراکنش دوکفه‌ای‌های مناطق جزر و مدی خلیج چابهار و سواحل اطراف آن. پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال. ۱۳۵ صفحه.

۲. **اشجع‌اردلان، ا.؛ عمادی، ح. و رابط، ل.، ۱۳۸۷.** بررسی فراوانی دوکفه‌ای *Amiantis umbonella* در ساحل گلی بندرعباس، خلیج فارس. مجله پژوهش‌های علوم و فنون دریایی. دوره ۱، شماره ۳، صفحات ۲۳ تا ۳۳.

۳. **اشجع‌اردلان، ا.؛ نجات‌خواه‌معنوی، پ. و عزیزی، ن.، ۱۳۸۷.** شناسایی دوکفه‌ای‌های جزایر خارک و خارکو. مجله پژوهش‌های علوم و فنون دریایی. دوره ۳، شماره ۱، صفحات ۶۶ تا ۷۷.

۴. **تجلی‌پور، م.، ۱۳۷۳.** بررسی تکمیلی سیستماتیک و انتشار نرم‌تنان سواحل ایرانی خلیج فارس. انتشارات خیبر، چاپ اول، تهران، ایران.

۵. **حسین‌زاده‌صحافی،ه.؛ دقوقی، ب. و رامشی، ح.، ۱۳۷۹.** اطلس نرمتنان خلیج فارس. موسسه تحقیقات شیلاتی ایران. تهران، چاپ اول. ۲۴۸ صفحه.

۶. **حسین‌زاده‌صحافی، ه.، ۱۳۸۳.** زیست‌شناسی تولیدمثل صدف دسته چاقویی (*Solen rosemaculatus*) در سواحل شمالی خلیج فارس. مجله پژوهش و سازندگی در امور دام و آبزیان. دوره ۶۲ صفحات ۱۴ تا ۲۰.

۷. **سعیدی، ه.؛ پاشایی‌راد، ش.؛ اشجع‌اردلان، ا.؛ کامرانی، ا. و حسن‌زاده‌کیابی، ب.، ۱۳۸۱.** مورفومتری و بررسی ارتباط طول وزن، طول- عمق و قطر طولی سوراخ حفر شده توسط دوکفه‌ای دسته چاقویی (Solen dactylus) در آب‌های ساحلی بندرعباس، خلیج فارس. مجله پژوهش‌های علوم و فنون دریایی. دوره ۱۸، شماره ۴، صفحات ۷۹ تا ۸۸.

۸. **کاظمیان، م.؛ دلفیه، پ. و خدادادی، م.،** ۱۳۸۸. بررسی فراوانی دوکفه‌ای‌ها و شکم‌پایان در سواحل صخره‌ای طیس، واقع در خلیج فارس. مجله بیولوژی دریا. دوره ۱، شماره ۳، صفحات ۶۳ تا ۷۷.

۹. **کامرانی، ا.؛ بهزادی، س. و هاشمی‌پور، ف.، ۱۳۹۲.** بررسی تنوع و شناسایی دوکفه‌ای‌ها و شکم‌پایان سواحل شهر بندرعباس. مجله اقیانوس شناسی. دوره ۴، شماره ۱۳، صفحات ۵۳ تا ۶۰.

۱۰. **نبوی، س.م.ب.؛ قطب‌الدین، ن.؛ کوچنین، پ. و دهقان مدیسه، س.، ۱۳۸۸** . مطالعه جمعیت دوکفه‌ای‌های غالب سواحل هندیجان خلیج فارس. مجله بیولوژی دریا، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز. دوره ۱، شماره ۲، صفحات ۱ تا ۱۳.

۱۱. **نیامیمندی، ن.، ۱۳۸۹.** شناسایی، پراکنش و برآورد ذخیره صدف‌های خوراکی در آب‌های ساحلی استان بوشهر (۸۷-۸۸) گزارش نهایی پروژه، موسسه تحقیقات شیلات ایران. تهران.

۱۲. **Barnes, R.S.K.; Calow, P.J.W.; Golding, D.W.; Spicer, S.I., 2001.**The invertebrates. BlackWell Science Ltd. USA.

۱۳. **Campbell, D.C., 2000.** Molecular evidence on the evolution of the Bivalvia. In: Harper EM, Taylor JD, Crame JA, editors. The evolutionary biology of the Bivalvia. Vol. 177, pp: 31-46.

۱۴. **Canapa, A.; Marota, I.; Rollo, F. and Olmo, E., 1996.** Phylogenetic analysis of Veneridae (Bivalvia): comparison of molecular and palaeontological data. Journal of Molecular Evolution. Vol. 43, pp: 517-522.

۱۵. **Canapa, A.: Schiaparelli, S.: Marota, I. and Barucca, M., 2003.** Molecular data from the 16S rRNA gene for the phylogeny of Veneridae (Mollusca: Bivalvia). Marine Biology. Vol. 142, pp: 1125-1130.

۱۶. **Carpenter, K.E. and Niem, V.H., 1998.** FAO speices identification guide for fishery purpose. The living marine resources of the Western Central Pacific. Volume 2. Cephalopods, crustaceans, holothurians and sharks. Rome, FAO.

۱۷. **Chen, J.; Li, Q.; Kong, L. and Yu, X., 2013.** Additional lines of evidence provide new insights into species diversity of the Paphia subgenus Protapes (Mollusca, Bivalvia, Veneridae) in seas of south China. Marine Biodiversity. Vol. 44, pp: 55-61.

۱۸. **Coan, E.V. and Scott, P.H., 1997.** Checklist of the marine bivalves of the northeastern Pacific Ocean.Santa Barbara Museum of Natural History. Science. Vol. 1, pp: 1-28.

۱۹. **De Leon, J.H.; Jones, W.A.; Samou, M. and Morgan, D.J.W., 2006.** Genetic and hybridization evidence confirms that a geographic population of *Gonatocerus morrilli* (Hymenoptera: Mymaridae) from California is a new species: egg parasitoids of the glassy-winged sharpshooter Homalodisca coagulata (Homoptera: Cicadellidae). Biological Control. Vol. 38, pp: 282-293.

۲۰. **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.

۲۱. **Frizzell, D.L., 1936.** Preliminary reclassiWcation of veneracean pelecypods. Bull. Mus. Roy. Hist. Nat. Belgique. Vol. 12, pp: 1-84.

۲۲. **Gosling, E., 2003.** Bivalve molluscs biology, ecology and culture. Fishing News Books, a division of Blackwell Publishing. UK.

۲۳. **Harte, M.E., 1992.** A new approach to the study of bivalve evolution. American malacological Bulletin, Vol, 9, pp:199-206.

۲۴. **Hebert, P.D.N.; Cywinska, A.; Ball, S.L. and deWaard, J.R., 2003.** Biological identifications through DNA barcodes. Philosophical Transactions of the Royal Society B. Vol. 270, pp: 313-321.

۲۵. **Kappner, I. and Bieler, R., 2008.** Phylogeny of *Venus clams* (Bivalvia: Venerinae) as inferred from nuclear and mitochondrial gene sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution. Vol. 40, pp: 317-331.

۲۶. **Popa, O.P.; Murariu, D. and Popa, L.O., 2007.** Comparison of four DNA extraction methods from invasive freshwater bivalve species (Mollusca: Bivalvia) in Romanian fauna. Travaux du Muséum National d'Histoire Naturelle Grigore Antipa. Vol. 6, pp: 527-536.

۲۷. **Radulovici, A.; Archambault, P. and Dufresne, F., 2010.** DNA Barcodes for marine Biodiversity: Moving Fast Forward. Journal Diversity. Vol. 2, pp: 450-472.

۲۸. **Saeedi, H.; Ardalan, A.; Kamrani, E. and Kiabi, H.B., 2010.** Reproduction, growth and production of *Amiantis umbonella* (Bivalvia: Veneridae) on northern coast of the Persian Gulf, Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom. Vol. 90, pp: 711-718.

۲۹. **Swofford, D., 2002.** phylogenetic analysis using parsimony, version 4.0 b10. Sunderland, MA: Sinauer Associates.

۳۰. **Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipski, A. and Kumar, S., 2013.** MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0.

۳۱. **Tan, D.S.H.; Ang, Y.; Lim, G.S.; Ismail, M.R.B. and Meier, R. 2010.** From 'cryptic species'to integrative taxonomy: an iterative process involving DNA sequences, morphology, and behaviour leads to the resurrection of *Sepsis pyrrhosoma* (Sepsidae: Diptera). Zoologica Scripta. Vol. 39, pp: 51-61.