

شناسایی مولکولی و آنالیز فیلوژنی شکم‌پایان جزیره خارگ، خلیج فارس

آبرانه ملک پور^۱، مریم عیدی^{*}، آتوسا نوری کوپائی^۲

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین - پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران
۲. گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران

* مسئول مکاتبات: آدرس الکترونیکی: maryameidi@gmail.com

محل انجام پژوهش: گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین - پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران

تاریخ دریافت: ۹۵/۹/۱۵

تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۱/۲۴

چکیده

نرم‌تنان از نظر تنوع گونه‌ای دومین شاخه از بی‌مهرگان محسوب می‌شوند. شکم‌پایان بزرگترین رده این شاخه می‌باشند که پراکنش گسترده‌ای در خلیج فارس دارند، با این وجود شناسایی مولکولی و فیلوژنی این رده‌ی گسترده از نرم‌تنان پیشینه‌چندان طولانی در این منطقه ندارد. این مطالعه با هدف شناسایی مولکولی و آنالیز فیلوژنی شکم‌پایان در منطقه جزر و مدی جزیره خارگ انجام گرفت. بدین منظور پنج نمونه شکم‌پا جمع‌آوری شد. پس از نمونه برداری ویژگی‌های مورفولوژیک هر نمونه ثبت گردید. سپس در آزمایشگاه DNA نمونه‌ها با استفاده از کیت، استخراج و قطعه‌زنی میتوکندریایی COI تکثیر و توالی‌یابی شد. شناسایی مولکولی و آنالیز فیلوژنی نشان داد که این توالی‌ها بیشترین شباهت را با دو توالی از خانواده Planaxidae در خلیج فارس دارند. از یافته‌های این مطالعه می‌توان چنین نتیجه گرفت که بررسی‌های مولکولی می‌تواند روش بسیار جدید و قدرتمندی برای شناسایی و دسته‌بندی موجودات باشد.

واژه‌های کلیدی: شکم‌پایان، *Planaxis sulcatus*، جزیره خارگ، COI، آنالیز فیلوژنی

مقدمه

پراکنش گسترده‌ای در خلیج فارس دارند، لیکن شناسایی مولکولی و فیلوژنی این رده گسترده از نرم‌تنان، پیشینه‌چندان طولانی در این منطقه ندارد. به ویژه شناسایی شکم‌پایان که به علت حضور در بستر و قدرت اندک در تغییر مکان می‌توانند به عنوان شاخصی مهم به منظور تعیین تأثیر مخرب فعالیت‌های انسان بر سواحل به کار روند. بی‌شک شناسایی گونه‌های هر منطقه اساس تمامی مطالعاتی است که روی آن‌ها انجام خواهد گرفت. جزیره خارگ یکی از جزایر ایرانی خلیج

خلیج فارس یک دریای نیمه بسته است که تنها از طریق تنگه باریک هریمز با آب‌های آزاد در ارتباط است. نوسانات فصلی دما و شوری بسیار بالای این دریای نیمه بسته شرایط اکولوژیک آن را خاص و منحصر به فرد کرده است، شرایط سختی که حیات موجودات زنده را در آن دشوار ساخته و بر تنوع زیستی این پیکره‌ی آبی تأثیر گذارده است. همین امر اهمیت مطالعه روی تنوع زیستی این منطقه را دوچندان می‌کند (۱). شکم‌پایان

فارس واقع در ۷۶ کیلومتری شمال غربی بوشهر می باشد که پیش از این مطالعه ای در زمینه شناسایی شکم‌پایان در این منطقه صورت نگرفته است. در مطالعه حاضر از قطعه ژنی COI جهت مطالعه فیلوژنیک استفاده شد. امروز توالی این ژن به عنوان یک نشانگر ژنتیکی مورد استفاده قرار می گیرد (۵).

مواد و روش ها

جدول ۱ - مختصات ۵ ایستگاه نمونه برداری در ناحیه بین جزر و مدی جزیره خارگ.

شماره ایستگاه	نام ایستگاه	طول جغرافیایی (E°)	عرض جغرافیایی (N°)
۱	پلاژ کارمندی	۵۰°۱۷.۲۹۲' E	۲۹°۱۶.۳۸۳' N
۲	جاده ارتیک	۵۰°۱۷.۵۰۴' E	۲۹°۱۵.۴۸۵' N
۳	جاده سننافی	۵۰°۱۷.۷۱۰' E	۲۹°۱۵.۱۹۶' N
۴	اسکله دایبو	۵۰°۱۷.۷۵۵' E	۲۹°۱۴.۵۲۶' N
۵	پارک فرفره	۵۰°۱۹.۵۷۹' E	۲۹°۱۴.۳۰۱' N

آنلاین (BLAST Local Alignment Search) مورد بررسی قرار گرفته سپس با استفاده از توالی های مطالعه حاضر و توالی های ثبت شده از خانو Planaxidae در بانک ژن جهانی به عنوان توالی مرجع، درخت فیلوژنی ترسیم شد (شکل ۱). آن فیلوژنی توالی ها پس از تشکیل ماتریس داده‌ها، با استفاده از روش های حداکثر احتمال (maximum likelihood) حداکثر پارسیمونی (maximum parsimony) و روش Bayesian انجام شد. پیش از انجام آنالیزهای ML (Bayesian با استفاده از نسخه ۲/۳ برنامه Modeltest) (۸) و بر اساس معیار اطلاعاتی AIC (aike) (Information Criterion) مدل های مناسب برای داده های مورد نظر، انتخاب شدند (۸). طبق این آزمون حداکثر پارسیمونی (HKY = Hasegawa-Kishino-Yano) انتخاب شد (آنالیزهای MP و ML برای داده های به دست آمده هم با توالی مرجع با استفاده از نرم افزار MEGA6 انجام گرفت (۱۰). در این روش تعداد بوت استرپ ۱۰۰۰ نظر گرفته شد. آنالیز Bayesian با نرم افزار Bayes نسخه ۳/۲ (۱۱) انجام شد. تمام درخت های ترسیم شده طی آنالیزهای فیلوژنی با استفاده از نرم افزار

جهت انجام مطالعات مولکولی، استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA انجام گرفت. سپس واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) با استفاده از پرایمر جهانی Folmer (۶) جهت تکثیر قطعه ژنی COI انجام گرفت. برنامه حرارتی برای واکنش مورد نظر شامل: مرحله واسرشته سازی اولیه: ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۲ دقیقه و مرحله واسرشته سازی: ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، مرحله ی الحاق: ۴۰ درجه سلسیوس به مدت ۴۰ ثانیه، مرحله ی بسط: ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه و نهایتاً مرحله ی بسط نهایی: ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه و تعداد چرخه ها ۳۵ چرخه در نظر گرفته شد. محصولات تکثیر شده روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شدند. پس از ثبت تصاویر ژل ها توسط دستگاه Gel Documentation، اندازه و کیفیت نمونه ها مشخص گردید. نهایتاً محصولات PCR مناسب جهت توالی یابی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شدند. توالی های به دست آمده مورد آنالیز فیلوژنی قرار گرفتند. برای این کار ابتدا توالی های به دست آمده با استفاده از نرم افزار Clustal W (۷) با یکدیگر هم‌مدیر شدند. جهت شناسایی، نمونه ها با استفاده از نرم افزار

آنالیز فیلوژنی

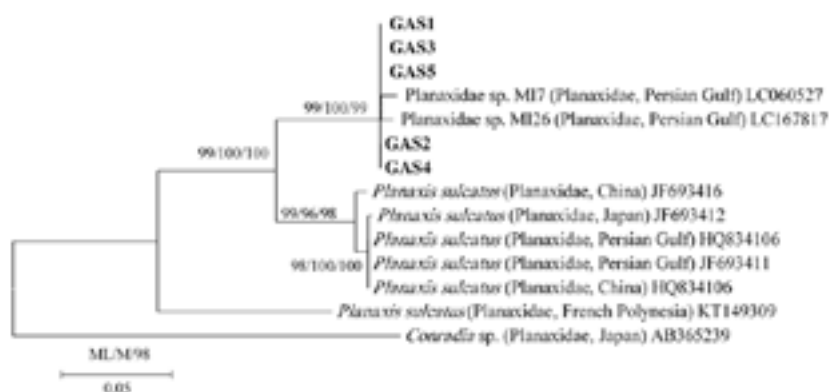
از تکثیر قطعه ژنی COI طی واکنش زنجیره پلیمرز باندهائی با طول ۷۱۰ bp حاصل شد. پس از یابی پنج محصول PCR به دست آمده، این توالی یکدیگر و با توالی های مرجع در بانک ژن جهانی ردیف شدند. هم ردیفی این توالی ها نشان داد که ژنی COI در هر پنج نمونه مطالعه شده (LC060527, LC167817 و GAS2, GAS3, GAS4, GAS5) با یکدیگر و با توالی های مرجع LC167817 و LC060527 گزارش شده از خانواده Planaxidae در خلیج فارس مشابه است (شکل). حاصل از نمونه های این مطالعه با کلاد *Planaxis sulcatus* رابطه خوهری داشته و هر دو کلاد ذکر شده اعتبار حداکثر احتمال ۹۹٪، اعتبار حداکثر پارسیب ۱۰۰٪ و احتمال پسین ۱۰۰٪ پشتیبانی شدند. تر درخت فیلوژنی حاصل از توالی های مطالعه حاضر توالی های ثبت شده برخی دیگر از خانواده های شکم پایان در بانک ژن جهانی نیز انجام شد که از خانواده Planaxidae یک کلاد کاملاً مجزا را تشکیل می دهند که این کلاد با اعتبار ۸۳٪ پشتیبانی شد اعتبار بالا نشان می دهد که این خانواده از لحاظ ژنتیک کاملاً از سایر خانواده های این رده تفکیک شده است با برخی خانواده ها مانند خانواده Cerithiidae را خوهری دارد (شکل).

Tree View قابل مشاهده بود (۱۲). درخت فیلوژنی دیگری نیز با استفاده از توالی های مطالعه حاضر و توالی های ثبت شده ی برخی دیگر از خانواده های رده شکم- پایان در بانک ژن جهانی ترسیم شد. این درخت با روش حداکثر احتمال (maximum likelihood) و با استفاده از نرم افزار MEGA6 (۱۰) ترسیم شد و تعداد بوت استرپ از ۱۰۰۰ در نظر گرفته شد (شکل ۲).

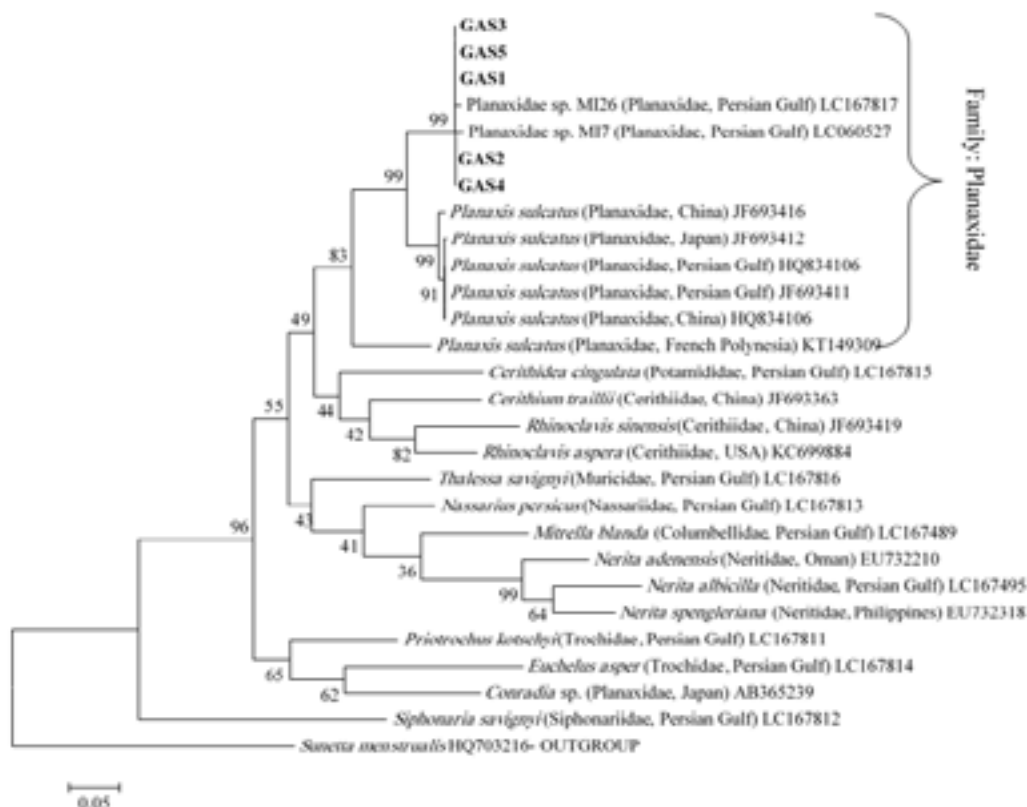
نتایج

ویژگی های مورفولوژیک

پنج نمونه مطالعه حاضر بر اساس ویژگی های مورفولوژیک به گونه *Planaxis sulcatus* شباهت دارند. اندازه این گونه در حدود ۱۸ تا ۲۸ میلی متر و رنگ آن خاکستری سیاه بود. لب خارجی دنداندار و پیچ های همراه با نوارهای مارپیچی داشته و داخل دهانه مخروطی بود. صدف ضخیم، مخروطی و بدون ناف بود. در این گونه پیچ بدنی بزرگ بوده و نوارهای مارپیچی برجسته ای تزئینات سطح صدف را تشکیل می داد. اغلب پیچه فرسوده شده بود. درون دهانه شفاف و ارغوانی تا قهوه ای رنگ بود و سطح صدف دارای نوارهای مارپیچی خاکستری تیره با خاکستری مایل به قرمز بود. در ناحیه آهیانه توده آهکی ضخیم و برجسته قرار داشت. درپوش آن شاخی و قهوه ای رنگ و لایه خارجی صدف رشته ای بود.



شکل ۱- درخت Maximum Likelihood از قطعه ژنی COI. نام نمونه های مطالعه حاضر به صورت پر رنگ و نام گونه کنترل به صورت ایتالیک همراه با شماره مسلسل آن ها در بانک ژنی مشخص گردیده است. درصد های بوت استرپ حداکثر احتمال از ۱۰۰۰ درخت/ حداکثر پارسیمونی از ۱۰۰۰ درخت/ احتمال پسین روی یا زیر گره ها نشان داده شد



شکل ۲- درخت Maximum Likelihood از قطعه ژنی COI. نام نمونه های مطالعه حاضر به صورت پر رنگ و نام گونه های کنترل به صورت ایتالیک همراه با شماره مسلسل آن ها در بانک ژنی مشخص گردیده است. درصدهای بوت استرپ حداکثر احتمال از ۱۰۰۰ درخت روی یا زیر گره ها نشان داده شد.

گردید. نتایج حاصل از شناسایی مولکولی ۲ گونه از سه گونه با شناسایی مورفولوژیک مطابق بود، ولی در یک گونه تفاوتی میان آنها مشاهده شد (۳). مقایسه این مطالعه با مطالعه انجام شده در تحقیق حاضر نشان می دهد که همیشه بین شناسایی مورفولوژیک و شناسایی مولکولی مطابقت کامل وجود ندارد و بررسی مولکولی و فیلوژنی بعد جدیدی در شناسایی و قرابت گونه ها ارائه می دهد.

در مطالعه دیگری توسط ایزدیان و همکاران، شناسایی مولکولی و مورفولوژیک گونه های خانواده Cerithiidae در سواحل صخره ای شمال خلیج فارس صورت گرفت. نتایج نشان داد که دو گونه *Cerithium caeruleum* و *Cerithium sargoyi* که از نظر مورفولوژیک دو گونه مجزا می باشند، از نظر مولکولی بسیار شبیه به هم هستند (۴).

بحث

اغلب مطالعات شناسایی شکم‌پایان در ایران بر اساس بررسی های مورفولوژیک صورت گرفته است، ولی امروزه بررسی های مولکولی و فیلوژنیک در شناسایی خانواده ها و گونه های شکم‌پایان و یافتن ارتباط تکاملی آنها توسعه یافته است (۱۳). ژن میتوکندریایی COI کاربرد به سزایی در مطالعات فیلوژنیک دارد. امروز توالی این ژن به طور گسترده ای به عنوان یک نشانگر ژنتیکی مورد استفاده قرار می گیرد.

ایزدیان و همکاران (۱۳۹۴) تحقیقی به منظور شناسایی گونه های جنس *Nerita* در سواحل شمالی خلیج فارس انجام دادند. نمونه ها مورد شناسایی مورفولوژیک و مولکولی قرار گرفت. در مجموع ۶ توالی متعلق به ۳ گونه *Nerita* به دست آمد که این توالی ها برای اولین بار از منطقه شمالی خلیج فارس گزارش

مطالعه حاضر این تفاوت مشهود است. از این رو می توان چنین نتیجه گرفت که بررسی های مولکولی روش کارآمدی برای شناسایی و دسته بندی جانوران بوده بایستی همزمان و در کنار بررسی های مورفولوژیک مور استفاده قرار گیرند. همچنین برای بررسی های فیلوژنیک مولکولی از ژن های متفاوتی استفاده می شود، که نتایج حاصل شده از این مطالعه می توان چنین نتیجه گیری کرد که ژن COI می تواند نشانگر مناسبی جهت بررسی های فیلوژنیک مولکولی باشد.

تقدیر و تشکر

این تحقیق مستخرج از پایان نامه ارشد رشته بیوسیستماتیک دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین پیشوا می باشد.

توالی های بدست آمده در این تحقیق در مورد خانواده Planaxidae برای اولین بار در خلیج فارس و جزیره خارگ گزارش شد.

در این مطالعه بر خلاف آنچه از شناسایی های مورفولوژیک به دست آمد، نمونه های GAS1، GAS2، GAS3، GAS4 و GAS5 از لحاظ ژنتیکی به گونه *Planaxis sulcatus* شباهت نداشته بلکه کلاد حاصل از نمونه های این مطالعه با کلاد *Planaxis sulcatus* رابطه خواهری داشت. به طور کلی بررسی های انجام شده در مورد گونه های مختلف در پژوهش های مختلف نشان داده اند که در اکثر موارد شناسایی های مورفولوژیک انجام شده در گذشته با نتایج مطالعات مولکولی یکسان هستند، ولی در مواردی نیز اختلافاتی بین آنها مشاهده می شود که نشان دهنده لزوم مطالعه همزمان بررسی های مولکولی و مورفولوژیک می باشد، همچنان که در

منابع مورد استفاده

- وزیری زاده، ا.، محمدی، م. و فخری، ع.، ۱۳۹۱. ارزیابی بوم‌شناختی جوامع نرم‌تن در سواحل صخره‌ای استان بوشهر. مجله اقیانوس شناسی، سال ۳، شماره ۹، صفحات ۶۱-۵۵.
- حسین زاده صحافی، ه.، دقوقی، ب.، رامشی، ح.، ۱۳۷۹. اطلس نرم‌تنان خلیج فارس. موبسه تحقیقات شیلات ایران. ص ۲۴۸.
- ایزدیان، م.، ذوالقرنین، ح.، نبوی، س.، اشجع اردلان، آ.، یوسفی سیاهکلرودی، س.، ۱۳۹۵. بررسی فیلوژنی و زمان اشتقاق گونه ها؛ کلاد Neogastropoda در آبهای خلیج فارس. سا ۸، شماره ۱، صفحات ۱۱۳-۱۲۰.
- ایزدیان، م.، ذوالقرنین، ح.، نبوی، س. م. ب.، اشجع اردلان، آ.، یوسفی سیاهکلرودی، س.، ۳۹۵. شناسایی مولکولی و مورفولوژیک گونه های خانواده Cerithiidae در سواحل صخره ای شما خلیج فارس. مجله علمی پژوهشی زیست شناس دریای. سال ۸، شماره ۲، صفحات ۲۹-۲۵.
- Ptaszyńska, A. A., Letowski, J., Malek, W. 2012. Application of COI sequences in studies of phylogenetic relationships among 40 Apionidae species. Journal of Insect Science 12: 1-16.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R., 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Molecular Marine Biotechnology 3: 294-297.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research 22: 4673-4680.
- Nylander, J., 2004. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Hasegawa, M., Kishino, H., Yano, T. A., 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. Journal of Molecular Evolution 22: 160-174.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Molecular Biology and Evolution 30: 2725-2729.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J. P., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics 19: 1572-1574.
- Page, R. D., 2001. Tree View. Glasgow University, Glasgow, UK.

ldauf, S. L., 2003. Phylogeny for the faint
heart: a tutorial. Trends in Genetics 19: 345-