فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۳۵، جلد ۹، شماره ۴، پائیز۹۵، صفحه ۷۷ تا ۹۲

بررسی فیلوژنی ۱۶ گونه ازدوکفه ای ها در سواحل خلیج فارس(جزایر هنگام، لارک، قشم و لنگه)با استفاده از ژن 16srRNA

شهره مسائلی[۱]، **پرگل قوام مصطفوی**[۱]، همایون حسین زاده صحافی[۲]، سعید تمدنی[۳]، عبدالرضا نبی نژاد[۴]، وحید نعمان[۴]

۱- گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی ،دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران.ایران. **Mostafavi_pa@srbiau.ac.ir**

۲- موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات ،آموزش و ترویج کشاورزی، تهران. ایران.

۳-موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، سازمان تحقیقات ،آموزش و ترویج کشاورزی، بندرعباس. ایران.

٤- بخش تحقیقات دامپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، اصفهان. ایران.

تاریخ دریافت: ۹٤/٦/۲٤ تاریخ پذیرش: ۹۵/۸/۱۵

چکیده

زمینه و هدف: رده دوکفه ای ها ازبزرگ ترین رده های شاخه نرم‌تنان می‌باشد. بسیاری از گونه های نرم تنان خلیج فارس شاخص و از نظر تجاری حائز اهمیت اند و برخی از نظر تنوع زیستی، چرخه غذایی و مطالعات تکاملی اهمیت دارند. مطالعات بسیاری برای شناسایی و رده بندی دوکفه ای های ایران صورت گرفته است که منجر به شناسایی آن ها شده است. هدف از مطالعه حاضر بررسی فیلوژنتیکی و مورفولوژیک دوکفه ای ها در خلیج فارس می باشد.

روش کار: نمونه برداری در سواحل بندر عباس، قشم، لارک، هنگام و لنگه در خلیج‌فارس انجام گردید و پس از بررسی ویژگی-های مورفولوژیک ، سپس استخراج DNA با روش فنل کلروفرم ایزوآمیل الکل و روش تکثیر ۱٦s rRNA و سپس توالی‌یابی انجام شد. در این مطالعه توالی‌ها برای اولین بار ازخلیج‌فارس گزارش شده است. داده ها با نرم افزارهای فیلوژنی تحلیل شد.

یافته ها: مقایسه توالی ژن 16s این گونه ها با گونه های مطالعه شده از سایر مناطق کره زمین که اطلاعات مولکولی آن ها در دسترس بود، نشان داد که برخی از گونه های دوکفه ای در ایران تشابه ژنتیکی قابل توجه ای با سایر گونه های مطالعه شده ندارند و در ایران ایزوله شده اند و تعدادی تشابه ژنتیکی بالایی با گونه های مطالعه شده دارند و در یک کلاد با بوت استرپ بالا با گونه های سایر دنیا قرار می گیرند

نتیجه گیری: نتایج نشان داد رده بندی صورت گرفته بر اساس تعیین توالی ژن 16s کاملاً مطابق با رده بندی های انجام شده بر اساس صفات ریختی است و این دو تایید کننده هم دیگر هستند.

واژه های کلیدی: دوکفه ای ها، فیلوژنی، 16srRNA، خلیج‌فارس.

مقدمه

دوکفه ای ها Bivalvies) گروه شاخصی از جانوران هستند که با طیف وسیعی از تطابق، انواع زیستگاه های موجود در اقیانوس ها را اشغال کرده اند و دارای بیشترین تنوع گونه ای در میان جانوران دریایی می باشند غالباً دو کفه ای ها در اعماق کف دریا زندگی می کنند. برخی از آن ها توانایی شنا کردن، برخی خزیدن و عده ای دیگر جهیدن را دارند. عده ای دیگر که ثابت هستند یا در گل و ماسه کف دریا سوراخ ایجاد نموده اند ودر آن زندگی می کنند و یا یک کفه بر روی سنگ یا کف دریا سیمانی شده و یا به وسیله رشته های Byssus ثابت شده اند(۴۴). اکثر مطالعات فیلوژنیک دوکفه ای ها بر اساس نشان گرهای میتوکندریایی و هسته ای DNA است. یکی از روش های بررسی تنوع ژنتیکی که مبتنی بر PCR می باشد و جهت بررسی تنوع ژنتیکی میان جمعیت‌ها به کار می‌رود روش استفاده از نشان گر mt DNA است که به طور گسترده‌ای برای مطالعات ژنتیکی کاربرد دارد(۱۱).یکی از برنامه های اساسی در صنایع آبزی پروری، جلوگیری از کاهش تنوع ژنتیکی در طی

نسل های متمادی است، زیرا در جمعیت های بسته، فرآیندهای کاهش دهنده جریان ژنتیکی شدت می یابند و اختلافات ژنتیکی نسل ها به تدریج کم می شود و در نتیجه فاصله ژنتیکی بین زاده هاو والدین کاهش می یابد و هتروزیگوسیتی کافی حاصل نمی شود(۹). هم چنین بررسی تنوع ژنتیکی یک جمعیت جهت برآورد اندازه موثر جمعیت، بررسی گذشته جمعیت(مهاجرت، اثر تنگنای ژنتیکی)، ساختار جمعیت، چگونگی اثر انتخاب بر ژن ها و تعیین جایگاه ژنی صفات کمی، ضروری می-باشد(۴۶). در سال های اخیر روند آسیب پذیری آبزیان خلیج فارس و دریای عمان به علت برداشت بی رویه، ورود آلودگی های گوناگون و غیره افزایش یافته است که اجرای مطالعات بنیادی و کاربردی را جهت مدیریت ذخایر و جهت حصول اطمینان از تنوع زیستی و حفظ عملکرد اکولوژیک اکوسیستم های دریایی ضروری نموده است(۱۵). کلیه مطالعاتی که تاکنون بر روی گونه‌های مختلف دوکفه ای ها در خلیج فارس صورت گرفته است، در زمینه ریخت شناسی، پراکنش و بوم شناسی آن‌ها بوده است، مانند مطالعاتی که بیرامی و همکاران(۱۳۹۴) برای شناسایی ریختی شکم پایان در ناحیه جزر و مدی بندر لنگه انجام دادند. در ایران تنها یک جنس از دوکفه ای ها از Crassostrea ها با شناسایی مولکولی در سایت NCBI با شماره HF549058.1 ثبت گردیده است. اما در خارج از ایران مطالعات مولکولی فراوانی بر روی دوکفه ای ها انجام شده است؛ که از آن جمله می‌توان به مطالعات Lam و همکاران در سال ۲۰۰۳ که برای اولین بار گونه-ی Crassostrea را از طریق مقایسه ی فاصله ی ژنتیکی توالی های مربوط به ژن های 16SrRNA , COI ، مورد شناسایی قرار دادند. نتایج حاصله نشان داد که گونه ی جدید از لحاظ ژنتیکی از گونه *Crassostrea hongkongensis* متمایز می باشد. Tianfeng و همکاران در سال ۲۰۰۴ تنوع ژنتیکی اویستر *Crassostrea rivularis* را در خلیج Zhenhai از طریق ژن 16SrRNA مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصله نشان داد که تنوع ژنتیکی *Crassostrea rivularis* در این منطقه بسیار پایین است و مورد نیاز است که این گونه از مناطق دیگر به این محل جهت بالا بردن تنوع ژنتیکی معرفی و انتقال گردد. Wang و همکاران در سال ۲۰۰۴ به دسته بندی اویسترهای *Crassostrea rivularis* سواحل چین، بر اساس مورفولوژی و فیلوژنتیکی پرداختند. آن ها نمونه ها را از طریق COI,28S , 16S مورد آنالیز قرار دادند. Li و همکاران در سال ۲۰۰۶ برای تعیین تنوع ژنتیکی در داخل پنج جمعیت از اویسترهای اقیانوس آرام، از هفت نشان گر میکروساتلیت استفاده کردند و تنوع ژنتیکی بین آن ها را مورد مقایسه قرار دادند. نتایج حاصله تنوع ژنتیکی بالایی را در هر هفت جایگاه برای تمام جمعیت-ها نشان داد. Wang و همکاران در سال ۲۰۰۸ به دسته بندی اویسترهای مربوط به ۹ منطقه از سواحل شمالی چین از طریق توالی های COI, 16SrRNA میتوکندریایی و 28SrRNA پرداختند. نتایج حاصله نشان داد که اویسترهای کوچک روی صخره های بین جزر و مدی شمال چین *Crassostrea gigas* می باشند و هم چنین اویسترهای موجود در welfang، *C.ariakensis* می باشند. هم چنین اثبات کردند که *C.talienwhanensis* و دیگر گونه های Crassostrea در شمال چین موجود نمی باشند. Feng و همکاران در سال ۲۰۱۰، از طریق توالی یابی ژن های 16SrRNA COI به بررسی تنوع ژنتیکی هشت گونه از خانواده Pectinidae پرداختند. Melo و همکاران در سال ۲۰۱۰ از طریق توالی های COI، به شناسایی مولکولی گونه‌های اویستر مانگرو در سواحل برزیل پرداختند. آن ها هم چنین رابطه ی فیلوژنتیکی این گونه ها را با گونه های

Crassostrea مربوط به دیگر نقاط جهان مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصله سه گونه Crassostrea شامل *C.gasar*، *C.rhizophorae* و یک گونه ناشناخته Crassostrea را در ۱۶ منطقه از سواحل برزیل نشان داد. Thomas و همکاران در سال ۲۰۱۱ از طریق ژن 16SrRNA به بررسی لاروهای اویستر *pinctada margaritifera* در میان نمونه های پلانکتونی پرداختند. در این مطالعه آن ها توانستند لاروهای *pinctada margaritifera* و *pinctada maculate* را از طریق توالی های 16SrRNA در خصوص کشت و پرورش گونه ها از هم دیگر تفکیک کنند. هدف از مطالعه حاضر بررسی فیلوژنتیکی و مورفولوژیک دوکفه ای ها در خلیج فارس می باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

طی سال ۹۳ نمونه‌برداری از بسترهای صخره‌ای سواحل شمالی خلیج‌فارس مطابق شکل شماره ۱ در زمان حداکثر جزر انجام گرفت. مشخصات ایستگاه‌های نمونه-برداری در جدول شماره۱ آورده شده است. در مجموع تعداد ۸۰ نمونه از ایستگاه‌های بندر عباس، لارک، هنگام، لنگه و قشم به صورت تصادفی و با ابزار مخصوص صید جمع آوری شد. و اغلب نمونه ها به صورت زنده تا مرحله استخراج نگه داشته گردید. تعدادی از نمونه ها بلافاصله در اتانول مطلق و تعدادی از آن ها به صورت زنده نگه داشته و در کیسه های نایلونی همراه با اکسیژن به محل آزمایشگاه مولکولی بخش دامپزشکی مرکز تحقیقات کشاورزی استان اصفهان انتقال داده شد. طی چند مرحله استخراج از نمونه های زنده، نمونه های فریز شده و نمونه های نگه داشته شده در الکل، در مرحله استخراج DNA های موجودات زنده بهتر باند داشتند.

شناسایی مورفولوژیکی

شناسایی ابتدایی و مورفولوژیکی بر اساس ویژگی-های ریختی ثبت شده و تطابق با منابع پیشین شناسایی و با استفاده از کلیدهای شناسایی صورت گرفت.هم اکنون به صورت منجمد و بعضی از گونه ها در الکل در آزمایشگاه مرکز تحقیقات کشاورزی اصفهان نگهداری می شوند.تلاش بر این بود که از هر گونه حداقل ۵ نمونه برداشته شود. شناسایی تاکسونومیک نمونه ها به کمک کلید شناسایی منطقه ۵۱ FAO و کلیدهای شناسایی معتبر جهانی نظیر Sea shells of EASTERN ARABIA SEA SHELLS انجام گرفت(۱۹). در تمام موارد با متخصصان تاکسون های مربوط تماس برقرار شد. از همه نمونه ها، به کمک ابزارهای استریل شده، تکه بافتی به اندازه ۱-۳ میلی متر مکعب(حدود ۱۵۰ میلی گرم) از بافت ماهیچه ای موجود جدا شد. بافت در لوله اپندرف ۲ میلی لیتری با بافر استخراج مخلوط گردید و با قیچی به صورت خیلی خیلی ریز قطعه قطعه شد.

استخراج DNA با روش فنل کلروفرم(۲۰)

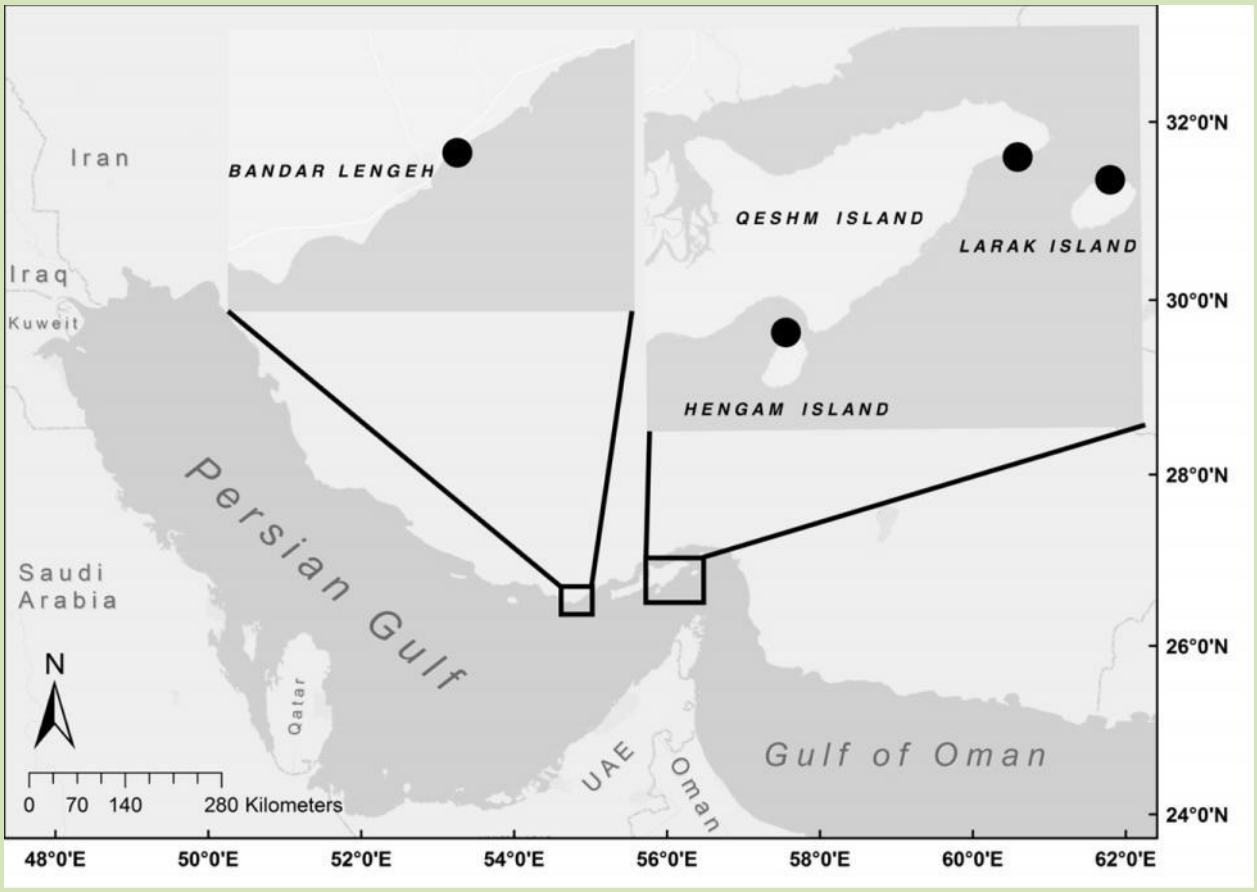
بافر استخراج به هریک از لوله های حاوی نمونه که نام گونه با برچسب بر روی لوله مشخص شده و نمونه به صورت کاملاً خرد و تقریباً پودر به میزان ۸۵۰ میکروگرم شامل Tris-Hcl ,SDS,Nacl,EDTA ,Proteinaz K اضافه گردید.

بافر استخراج شامل(PH:8) ۵۰ mM Tris – Hcl جهت بافری کردن محیط، SDS 1% جهت لیز کردن دیواره سلولی و ۱۰۰ mM EDTA جهت غیر فعال کردن DNAase و Nacl 100mM. سپس برای خرد شدن هرچه بهتر بافت و مخلوط شدن آن با بافر نمونه ها به مدت ۱۰ ثانیه به شدت هم زده شدند(Vortex) .در مرحله بعد آنزیم پروتئیناز K به میزان ۵-۱۰ میکرولیتر در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به آن اضافه نموده، این عمل جهت حذف پروتئین های سلولی صورت پذیرفت. سپس در بن باری ۵۵ درجه سانتی گراد در زمان ۲۴ ساعت

قرار گرفت.این مدت زمان تا حصول محلول کاملاً همگن ادامه یافت و در این زمان هر ده دقیقه یک بار محلول تکان داده شد. روز بعد به روش کلروفرم ایزو آمیل الکل فنل به نسبت ۲۴:۱:۲۵ اضافه و سانتریفوژ و مایع رویی جدا گردید. این عملیات طی دو مرحله صورت پذیرفت و سپس دو برابر حجم آن اتانل خالص سرد و یک دهم حجم آن نمک ۴ مولار به آن طبق پروتوکول اضافه و در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگه داشته شد. بعد از ۲۴ ساعت پس از سانتریفیوژ مایع رویی دور ریخته شد که پلت DNA ته میکروتیوب چسبیده بود و دو بار با الکل شستشو و در هوای آزاد خشک گردید. سپس به آن آب دی یونیزه اضافه گردید و بر روی ژل برده شد.

جدول ۱-موقعیت جغرافیایی و تعداد نمونه های برداشت شده

نام رده	نام علمی گونه	تعداد نمونه برداری شده	زمان نمونه برداری	مکان نمونه برداری	موقعیت جغرافیایی
Veneroidae	*Paphia amabilis*	۵	۹۴/۴/۳ ۹۴/۵/۲۳	جزیره هنگام بندر لنگه	55°51′42.16°E 26°40′19.67°N 54°54′11.83°E 26°33′26.95°N
	Gafrarium tumidum	۵	۹۴/۴/۳ ۹۴/۴/۲۴	جزیره هنگام جزیره لارک	55°51′42.16°E 26°40′19.67°N 56°22′11.25°E 26°53′16.36°N
	Paphia undulata	۵	۹۴/۴/۳ ۹۴/۵/۳	جزیره هنگام جزیره قشم	55°51′42.16°E 26°40′19.67°N 56°13′44.08°E 26°54′38.85°N
Pinnidae	*Pinna bicolor*	۵	۹۴/۴/۳ ۹۴/۵/۲۳	جزیره هنگام بندر لنگه	55°51′42.16°E 26°40′19.67°N 54°54′11.83°E 26°33′26.95°N
Pteroidae	*Pinctada albina*	۵	۹۴/۵/۲۳ ۹۴/۵/۳	بندر لنگه جزیره قشم	54°54′11.83°E 26°33′26.95°N 56°13′44.08°E 26°54′38.85°N
	Pinctada nigra	۵	۹۴/۵/۲۳ ۹۴/۴/۲۴	بندر لنگه جزیره لارک	54°54′11.83°E 26°33′26.95°N 56°22′11.25°E 26°53′16.36°N
	Pinctada fucuta	۵	۹۴/۵/۲۳ ۹۴/۵/۳	بندر لنگه جزیره قشم	54°54′11.83°E 26°33′26.95°N 56°13′44.08°E 26°54′38.85°N
	Pinctada radiata	۵	۹۴/۵/۲۳ ۹۴/۵/۳	بندر لنگه جزیره قشم	54°54′11.83°E 26°33′26.95°N 56°13′44.08°E 26°54′38.85°N
Malleidae	*Malleus regula*	۵	۹۴/۵/۲۳ ۹۴/۵/۳	بندر لنگه جزیره قشم	54°54′11.83°E 26°33′26.95°N 56°13′44.08°E 26°54′38.85°N
Gryphaeidae	*Hyotissa hyotisa*	۵	۹۴/۴/۲۴ ۹۴/۵/۳	جزیره لارک جزیره قشم	56°22′11.25°E 26°53′16.36°N 56°13′44.08°E 26°54′38.85°N
Arcidae	*Barbatia obliquta*	۵	۹۴/۵/۲۳ ۹۴/۵/۳	بندر لنگه جزیره قشم	54°54′11.83°E 26°33′26.95°N 56°13′44.08°E 26°54′38.85°N
Chamidae	*Chama pacifica*	۵	۹۴/۴/۳ ۹۴/۵/۲۳	جزیره هنگام بندر لنگه	55°51′42.16°E 26°40′19.67°N 54°54′11.83°E 26°33′26.95°N
	Chama sp.	۵	۹۴/۴/۲۴ ۹۴/۵/۳	جزیره لارک جزیره قشم	56°22′11.25°E 26°53′16.36°N 56°13′44.08°E 26°54′38.85°N
Osteroidae	*Saccostrea mordex*	۵	۹۴/۴/۳ ۹۴/۵/۳	جزیره هنگام جزیره قشم	55°51′42.16°E 26°40′19.67°N 56°13′44.08°E 26°54′38.85°N
	Saccostrea cuculata	۵	۹۴/۴/۳ ۹۴/۴/۲۴	جزیره هنگام جزیره لارک	55°51′42.16°E 26°40′19.67°N 56°22′11.25°E 26°53′16.36°N
	Crassostrea sp.	۵	۹۴/۵/۲۳ ۹۴/۴/۲۴	بندر لنگه جزیره لارک	54°54′11.83°E 26°33′26.95°N 56°22′11.25°E 26°53′16.36°N



شکل ۱- موقعیت ایستگاه‌های نمونه‌برداری

شناسایی مورفولوژیک

نمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه جهت شناسایی مورفولوژیک بررسی و با استفاده از کلیدهای شناسایی شامل:

Sea Shells of Eastern Arabi(۹)

Sea Shore of Kuwait Persian Gulf (۲۶)

(۲۴) Encyclopedia of Marine Gastropods

اطلس نرم‌تنان خلیج فارس (۱۹) و سایت conchology در حد گونه شناسایی شدند.

مطالعات مولکولی

پس از شناسایی مورفولوژیک نمونه‌ها، از هر گونه شناسایی شده دو نمونه انتخاب و استخراج DNA با استفاده از روش فنل کلروفرم و پروتئیناز K انجام گردید. پس از ارزیابی کمی و کیفی DNA استخراج شده به‌وسیله الکتروفورز و اسپکتروفوتومتر، تکثیر قطعه ژنی S ۱۶rRNA انجام گرفت. برای این منظور از پرایمر Palumbi(۱۹۹۱) برای تکثیر ژن ۱۶S استفاده شد(جدول ۲). جهت تهیه محلول PCR، یک میکرولیتر(۱۰ نانوگرم) از DNA استخراجی، یک میکرولیتر از هر یک از پرایمرها(۱۰ پیکومول)، ۰/۵ میکرولیتر dNTP(۱۰ میلی‌مولار)، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq پلیمراز(۵u/µ)، ۲/۵ میکرولیتر بافر(۱۰X) PCR و یک میکرولیتر $MgCl_2$(۵۰ میلی‌مولار) استفاده شد که در نهایت حجم آن با آب مقطر به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد(۳۶). برنامه مورد استفاده جهت تکثیر قطعات ژنی در جدول ۳ نشان داده شده است. در مواردی که نمونه‌ها از کیفیت مناسبی برخوردار نبودند، از روش و مواد دیگری در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده شد، مثلاً از BSA، که در تکثیر ژن‌های نرم‌تنان کاربرد دارد، برای رفع عمل محدودکننده‌ها استفاده گردید. محصول PCR مورد خالص‌سازی قرار گرفت و جهت توالی یابی به شرکت ماکروژن کره ارسال شد.

جدول ۲ - نام و توالی پرایمرهای مورد استفاده

Primer Name (F/R)	Nucleotide Sequence (5' to 3')	منبع
16Sar	CGCCTGTTTAACAAAAACAT	Palumbi 1991
16Sbr	CCGGTCTGAACTCAGATCACGT	

جدول ۳- برنامه دمایی زنجیره‌ای واکنش‌های پلیمراز به‌کار رفته در تکثیر قطعات ژنی

سیکل حرارتی PCR

	۹۴درجه	۴۵ ثانیه	First denaturation
۵ سیکل	۹۵درجه	۱۰ ثانیه	Denaturation
	۴۵درجه	۴۵ثانیه	Anneling
	۷۲درجه	۴۵ ثانیه	Extension
۴۰ سیکل	۹۴درجه	۴۵ثانیه	Denaturation
	۵۱ درجه	۴۵ثانیه	Anneling
	۷۲درجه	۴۵ثانیه	Extension
	۷۲ درجه	۱۰ دقیقه	Final extension
	۱۲درجه	بی نهایت	Final

رسم درخت فیلوژنی

آنالیز فیلوژنی با استفاده از روش‌های بیشینه احتمال (Maximum Likelihood) و Maximum parsimony و Neighborjoining انجام شد. پیش از انجام آنالیزهای ML و MP و NJ، با استفاده از برنامه MrModeltest v2.3 (۲۶) و براساس معیار اطلاعاتی AIC(Akaike Information Criterion) و AICc مدل‌های مناسب برای داده‌های مورد نظر، انتخاب شدند(۳۷). کلیه توالی-ها در فرمت FASTA، جهت استفاده در نرم‌افزار MEGA6(Molecular Evolutionary Genetics Analysis)(۴۲)آماده و جهت هم‌ردیف کردن توالی‌ها از نرم‌افزارهای Clustal W(۴۴) استفاده شد. آنالیز ML برای تمامی توالی‌های به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار MEGA6 و تکرار بوت استراپ ۱۰۰۰ انجام گردید.

نتایج

در این تحقیق ۸ خانواده از دوکفه ای های ایران بررسی شد که شامل خانواده های زیر:

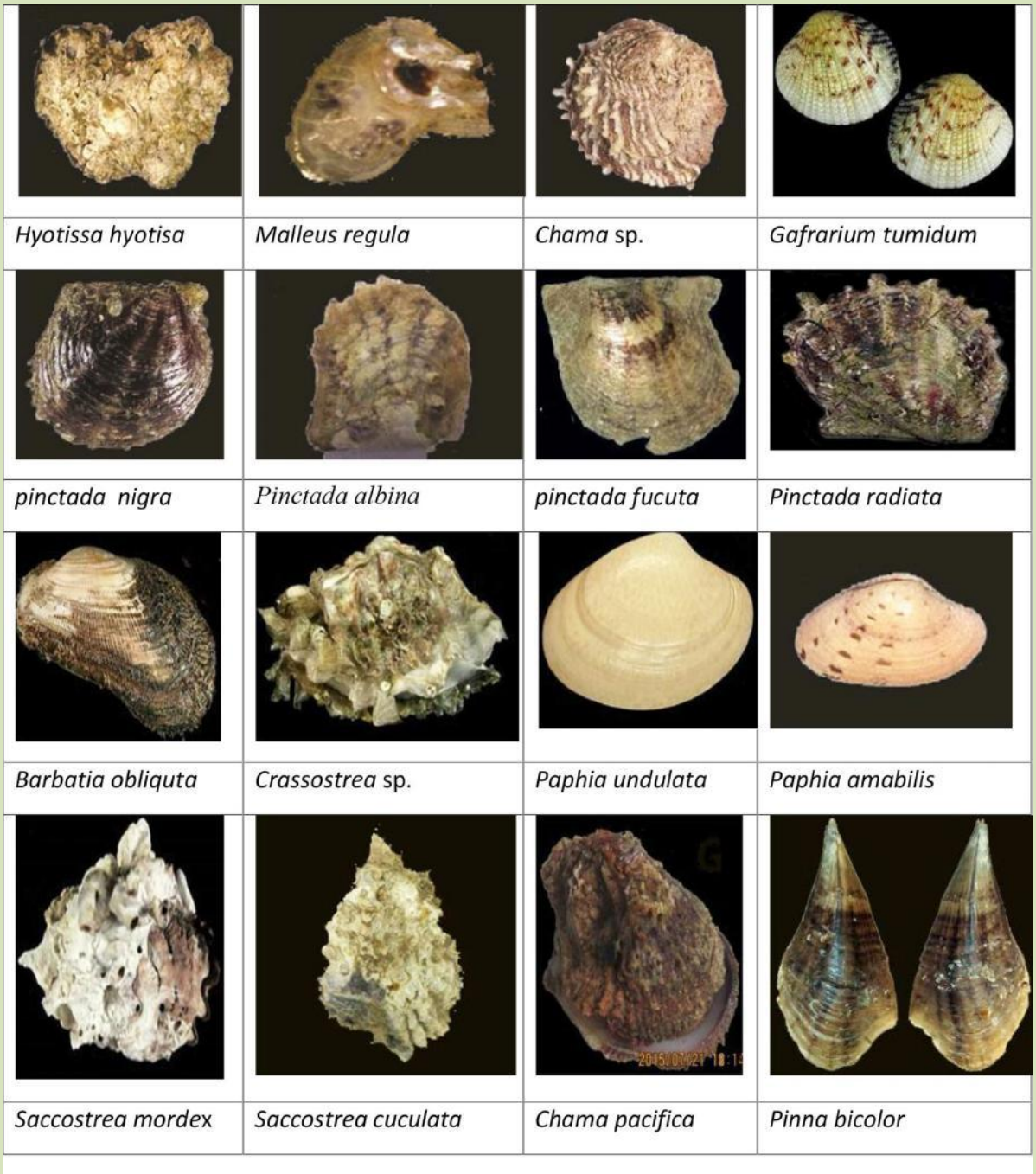
Pterioidae, Malleidae ,Pinnidae, veneroidae, Chamidae,Gryphaeidae, Arcidae,Osteroidae

بوده است. از این ۸ خانواده تعداد ۱۶ جنس و گونه به شرح زیر نمونه برداری و انتخاب شد:

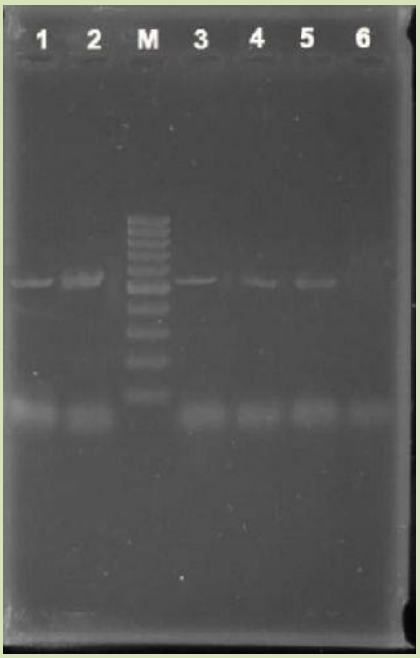
Pinctada nigra, pinctada albina, pinctada fucuta, pinctada radiata, Barbatia obliquta, paphia undulata, Saccostrea cuculata, Saccostrea mordex, crassostrea sp., Malleus regula, Pinna bicolor, Paphia amabilis, Gafrarium tumidum, Chama pacifica, Hyotissa hyotis, Chama sp.

این گونه ها در ابتدا با خصوصیات مورفولوژیک شناسایی و با کلید های شناسایی ذکر شده در حد گونه شناسایی شدندکه تصویر نمونه ها با نام علمی در جدول ۱ بیان شده است. محصول PCR به دست آمده برای تمام نمونه ها حدود ۵۵۰ جفت باز بود که در شکل ۲و ۳ نشان داده شده است. جفت پرایمرهای استفاده شده برای تمام گونه ها باعث تکثیر قطعه ژن ۱۶s مورد نظر گردید. سپس محصول PCR جهت تعیین توالی به ماکروژن کره فرستاده و توالی های به دست آمده با استفاده از نرم افزار Clustal W(۵۷) با یک دیگر تنظیم گردیدند. جهت شناسایی نمونه ها از توالی های ثبت شده در بانک ژن جهانی استفاده شد. آنالیز فیلوژنتیکی پس از تشکیل ماتریس داده ها، با استفاده از روش های بیشینه صرفه جویی(Maximum parsimony) و بیشینه ی احتمال(Maximum likelihood) و روش های Bayesian انجام و آنالیزهای ML و MP برای داده های

ایران با توالی مرجع با استفاده از نرم افزار PAUP نسخه ۴B۱۰ انجام شد. در روش Maximum Liklihood تعداد بوت استراپ ۱۰۰ در نظر گرفته شد،کلادهای MP با ۱۰۰۰ تکرار بوت استراپ بررسی گردیدند. درخت-های تبارزایی بر اساس روش پیوند هم جواری(NJ) و روش حداکثر ایجاز(MP) رسم شدند(شکل۴). توالی 16s مربوط به *Spondylus ictericus* به منظور بررسی میزان صحت نتایج آنالیزهای فیلوژنتیکی به عنوان برون گروه مورد استفاده قرار گرفته و با استفاده از نرم افزار Mega5(۵۷) و تکرار بوت استراپ ۱۰۰۰ انجام شد.



شکل ۱- گونه های شناسایی شده و نام علمی آن ها



شکل ۲– نمایش باند حاصل از PCR روی ژل آگارز ۱.۵٪

در تصویر فوق باند شماره ۱ مربوط به *Pinctada fucut* و باند شماره ۲ مربوط به *Chama* sp. و چاهک شماره Mمربوط مارکر، و باند شماره ۳ مربوط به *Saccostrea cuculata*، باند شماره ۴ مربوط به *Gafrarium tumidum*، باند شماره ۵ مربوط به *Pinctada nigra* و باند شماره ۶ مربوط به Negative Control می باشد.

شکل ۳ – نمایش باند حاصل از PCR روی ژل آگارز ۱/۵٪

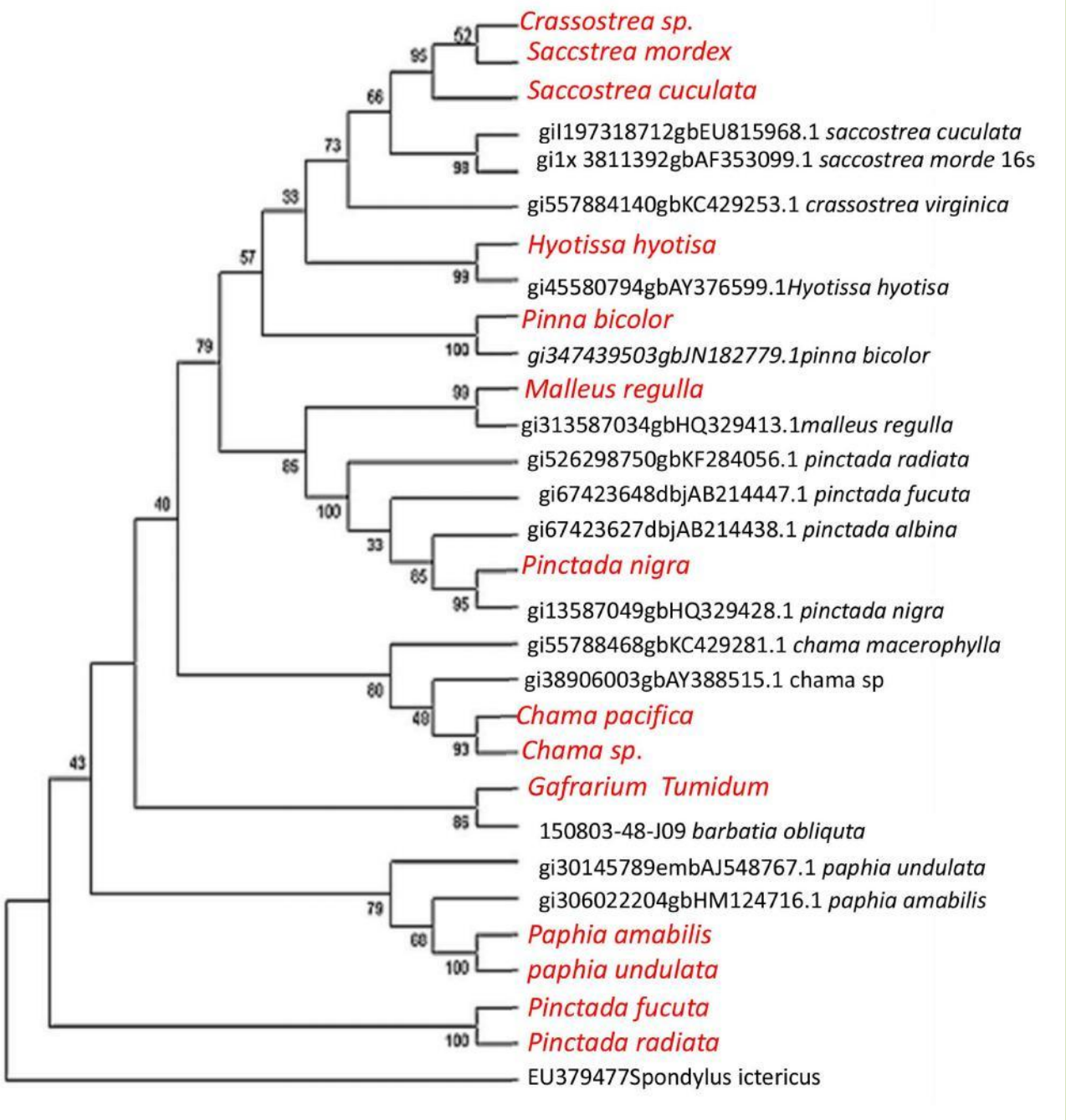
در تصویر حاصل از ژل داک(شکل فوق)، باندی که مقابل چاهک اول مشاهده می شود مربوط به *Paphia amabilis* و باندی که مقابل چاهک دوم مشاهده می شود مربوط به *Malleus regula* و باندی که مقابل چاهک سوم مشاهده می شود مربوط به*Pinctada albina* و چاهک چهارم مربوط به مارکر و باندی که مقابل چاهک پنجم مشاهده می شود مربوط به *Chama pacifica* و باندی که مقابل چاهک ششم مشاهده می شود مربوط به *Pinna bicolor* و باندی که مقابل چاهک هفتم مشاهده می شود مربوط به *Pinctada radiate* و باندی که مقابل چاهک هشتم مشاهده می شود مربوط به *Barbatia obliquta* و باندی که مقابل چاهک نهم مشاهده می شود مربوط به*Paphia undulata* و باندی که مقابل چاهک دهم مشاهده می شود مربوط به *Saccostrea mordex* می باشد.

نتایج نشان می دهد که توالی ژن rRNA ۱۶s به خوبی قادر است گونه های مورد مطالعه را از هم تفکیک دهد. بررسی این تنوعات برای حفاظت از گونه ها اهمیت زیادی دارند. در بین گونه های کار شده Chama از خلیج فارس در حد جنس شناسایی و گونه آن نیز بررسی شد، ولی با کلیدهای موجود هنوز شناسایی نشده و هم چنین در سایت NCBI نیز توالی مزبور در حد گونه معرفی نگردیده و پس از تعیین توالی ژن مورد نظر و Blast کردن در سایت بانک ژن با گونه *Chama macerophylla* که توسط Sharma ,P و همکارانش در سال ۲۰۱۳ گزارش شده است ۸۰٪ همپوشانی داشته و در درخت فیلوژنی رسم شده بیشترین قرابت را با گونه*Chama macerophylla* داشت و با گونه های دریای خلیج فارس در یک کلاد خواهری قرار گرفت.

گونه*Paphia undulate* و *Paphi amabilis* از خلیج فارس بررسی مورفولوژیک صورت گرفت و با استفاده از کلید شناسایی مورد تایید قرار گرفت. پس از تعیین توالی ژن مورد نظر و Blast کردن در سایت بانک ژن به درستی باگونه *Paphia undulata* گزارش شده توسط Canapa در سال ۲۰۰۳ که مربوط به اقیانوس اطلس شمالی بوده و گونه *Paphia amabilis* که توسط Cheng در سال ۲۰۱۱ از سواحل Mainland چین گزارش صورت گرفته ۷۰٪ همپوشانی داشته و در درخت فیلوژنی رسم شده گونه های ایران در یک کلاد و گونه های چین و اقیانوس اطلس نیز در یک کلاد قرار گرفته و هر دو کلاد با هم بیشترین قرابت را داشتند و با گونه های دریای خلیج فارس در یک کلاد خواهری قرار گرفتند.

Barbatia Obliquta سکانسی از آن در بانک ژن ثبت نشده بود که در نتیجه بلاست با این گونه همپوشانی داشته باشد و برای اولین بار این توالی ثبت خواهد شد. این گونه برای اولین بار از ایران از خلیج فارس گزارش شد. و هیچ گزارش و یا ثبت ژنی در بانک ژن جهانی در مورد ژن 16s rRNA این گونه ثبت نشده است. بررسی ژن COI میتوکندریایی و ژن 16s rRNA این گونه اثبات می کند که این گونه به لحاظ ژنتیکی کاملاً از دیگر گونه های ایران مجزا هست. این شاخه با ارزش ۸۸ در یک کلاد قرار گرفته است. این امر موید این مطلب است که گونه کاملاً مجزا چه از لحاظ مورفولوژیکی و چه از لحاظ مولکولی می باشد که در خلیج فارس زیست می کنند، قرابت بیشتری با گونه *Gafrarium tumidum* دارد که در درخت فیلوژنی، با این گونه monophyletic هستند. و با گونه *Gafrarium dispar* که توسط Pan,B. در سال ۲۰۰۶ در اقیانوس آتلانتیک شمالی(USA)در یک کلاد قرار می گیرند. تاکنون *Gafrarium tumidum* که با ژن 16srRNA توالی یابی شده باشد و در سایت NCBI ثبت گردیده باشد مشاهده نشده است و برای اولین بار در ایران این گونه توالی مولکولی انجام شد.گونه *Hyotissa hyotisa* از خلیج فارس مورد بررسی مورفولوژیک قرار گرفت و با استفاده از کلید شناسایی مورد تایید واقع شد. پس از تعیین توالی ژن مورد نظر و Blast کردن در سایت بانک ژن به درستی با گونه گزارش شده توسط O′Foighil,D and Lee,T. در سال ۲۰۰۴ که نمونه برداری از منطقه فلوریدا (آتلانتیک غربی) صورت گرفته است و نیز گونه ای با که از اقیانوس آرام غربی در سال ۲۰۱۳ توسط Li,C. گزارش شده است ۱۰۰٪ همپوشانی داشت. و در درخت فیلوژنی رسم شده بیشترین قرابت را با همان گونه از فلوریدا داشت و با گونه های دریای خلیج فارس در یک کلاد خواهری قرار گرفت. گونه *Crassostrea virginica* از خلیج فارس بررسی مورفولوژیک و با استفاده از کلید شناسایی مورد تایید قرار گرفت. پس از تعیین توالی ژن مورد نظر و Blast کردن در سایت بانک ژن به درستی با گونه*Crassostrea virginica* گزارش

شده توسط Bieler,R. و همکارانش در سال ۲۰۱۳ که مربوط به منطقه Chicago می باشد و جنس Crassostrea که توسط ذوالقرنین از خلیج فارس گزارش شده است و هم چنین گونه *Crassostrea blecheri* که توسط Lapegue,s. در هنگ کنگ در سال ۲۰۰۳ گزارش شده همپوشانی داشت. و در درخت فیلوژنی رسم شده بیشترین قرابت را با هم نشان دادند ولی با گونه های دریای خلیج فارس با فاصله در یک کلاد خواهری قرار گرفته اند. گونه *Saccostrea cuculata* که در سال ۲۰۰۸ توسط Xia,J. و Yu,z از جنوب دریای چین گزارش شده و گونه *Saccostrea mordex* که در سال ۲۰۰۶، Lam,x and Morton,B. از غرب اقیانوس آرام(سمت هند) گزارش کرده اند با همین گونه های خلیج فارس در درخت فیلوژنی رسم شده در یک کلاد به گونه ای که گونه های خلیج فارس در یک تاکسون و گونه های ثبت شده مذکور در یک تاکسون و همگی در یک کلاد قرار می گیرند و بیشترین قرابت را با هم نشان می دهند. گونه*Pinctada Fucuta* و *Pinctada radiata* از خلیج فارس بررسی مورفولوژیک شد و با استفاده از کلید شناسایی مورد تایید قرار گرفت. پس از تعیین توالی ژن مورد نظر و Blast کردن در سایت بانک ژن به درستی با گونه *Pinctada Fucuta* که در سال ۲۰۰۵توسط Masaoka,T. در Kagoshima(ژاپن) گزارش شده و گونه *Pinctada radiata* که توسط Meyer در سال ۲۰۱۳ از منطقه ایالت فدرال میکرونزی(Pacific Ocean) نمونه برداری و توالی یابی گردیده است هم پوشانی بالا داشت. و در درخت فیلوژنی رسم شده گونه های دریای خلیج فارس در یک تاکسون خواهری و گونه های خارجی نیز در یک تاکسون قرار گرفتند. گونه *Pinctada fucuta* که در ایران از آب های جزیره لنگه صید و توالی یابی شده است با *Pinctada fucuta* ژاپن و استرالیا کاملاً اختلاف داشته و در دو کلاد متفاوت قرار می گیرند. علت این تفاوت را حالت توپولوژی منطقه، جریان های دریایی و وضعیت جنگل های مانگرو، شرایط جغرافیایی، شوری و دما و بادهای موسمی از جمله اختلافات موجود در مناطق ایران و دیگر نقاط دنیا می توان دانست. گونه *Pinctada nigra* که در سال ۲۰۱۰ توسط Temkin,I. از Territory Australia شمالی گزارش شده و همین گونه که توسط Msasoka,T. از کاگوشیما ژاپن گزارش شده است و گونه خلیج فارس به دلیل تشابهات ژنتیکی در یک کلاد قرار می گیرند و بیشترین قرابت را با دیگر گونه های Pinctada دارند.گونه*Pinna bicolor* از خلیج فارس بررسی مورفولوژیک شد و با استفاده از کلید شناسایی مورد تایید قرار گرفت. پس از تعیین توالی ژن مورد نظر و Blast کردن در سایت بانک ژن به درستی با گونه *Pinna bicolor* گزارش شده توسط.Xue و همکارانش در سال ۲۰۱۱ که نمونه برداری از منطقه جنوب چین صورت گرفته است ۱۰۰٪ همپوشانی داشت و در درخت فیلوژنی رسم شده بیشترین قرابت را با همین گونه از خلیج فارس داشت و با گونه های دریای خلیج فارس در یک کلاد خواهری قرار گرفت. گونه *Malleus regula* بررسی مورفولوژیک و با استفاده از کلید شناسایی مورد تایید قرار گرفت. پس از تعیین توالی ژن مورد نظر و Blast کردن در سایت بانک ژن به درستی با گونه *Malleus regula* گزارش شده توسط Temkin و همکارانش در سال ۲۰۱۰ که نمونه برداری از استرالیا صورت گرفته است ۱۰۰٪ همپوشانی داشت و در درخت فیلوژنی رسم شده بیشترین قرابت را با این گونه از ایران داشت و با گونه های دریای خلیج فارس در یک کلاد خواهری قرار گرفت. درخت فیلوژنی Maximum parsimony از این توالی‌ها و توالی‌های گزارش شده پیشین در زیر نمایش داده شده است:



شکل ٤- درخت Maximum Parsimony رسم شده با نرم افزار Mega با توالی قطعه ژنی16s

بحث و نتیجه گیری

کاهش ذخایر آبزیان در بسیاری از نقاط جهان باعث شده تا محققین علوم شیلاتی جهت مدیریت ذخایر آبزیان قبل از هر اقدام عملی به مطالعه و تعیین ساختار ژنتیکی گونه های با ارزش آن منطقه از طریق روش های مولکولی روی آورند که در برنامه های بهره برداری از ذخایر آبزیان دریایی، صنعت آبزی پروری و برنامه های اصلاح نژادی دارای اهمیت زیادی می-

باشد(۲۱). در اکثر موجودات برای تعیین روابط تکاملی از داده های مربوط به توالی DNA استفاده می شود و از آن جا که چنین داده هایی کمتر تحت تاثیر شاخص انتخاب(Selection) قرار می گیرند، بهتر می توانند روابط فیلوژنی و ساختار ژنتیکی واقعی را نمایان سازند. اکثر مطالعات فیلوژنتیک نرمتنان بر اساس نشان گرهای DNA میتوکندری و DNA ریبوزومی هسته است. یکی از روش های بررسی تنوع ژنتیکی که مبتنی بر PCR می باشد و جهت بررسی تنوع ژنتیکی میان جمعیت ها به کار می رود روش mtDNA است. ژنوم میتوکندری یک نشان گر ژنتیکی به طور گسترده ای برای مطالعات ژنتیکی کاربرد دارد. با توجه به این که میتوکندری منشا مادری دارد و نوترکیبی در آن انجام نمی گیرد، لذا این خصوصیات باعث بروز اختلاف ژنتیکی بیشتر در ژنوم میتوکندری نسبت به ژنوم هسته شده است و از این رو نشان گر خوبی برای تشخیص گروه های که برای ۱۰ ،۱۰۰۰،۱۰۰سال از هم جدا بوده‌اند می باشد(۱۰). خصوصیات ویژه ژنوم میتوکندری مانند این که سرعت تکامل آن ده بار سریع تر از ژنوم هسته است آن را به طور خاص ابزار مناسبی برای تحلیل های فیلوژنتیک می سازد. بیشترین نشان-گرهای مورد استفاده شامل 12SrRNA,16SrRNA ،COI، ناحیه کنترل mtDNA و ژن سیتوکروم b می-باشد. از میان نشان گرهای مذکور COI و 16SrRNA برای روابط فیلوژنتیک مورد استفاده قرار گرفته اند که در این تحقیق 16SrRNA بهترین پاسخ و محصول PCR دارای باند شارپ بوده است. علت این اختلافات بحث بومی گرایی است، شرایط ویژه جغرافیایی منطقه، وجود خوریات و جنگل های حرا در هر منطقه تاثیر زیادی بر میزان تنوع ژنتیکی آبزیان منطقه خواهد داشت. جنگل های حرا یکی از مهم ترین مناطق نوزادگاهی و تغذیه لارو ماهیان، سخت پوستان و نرمتنان به حساب می آیند. یکی دیگر از دلایل اصلی تفاوت و جدایی گونه ها، فاصله جغرافیایی است با افزایش فاصله جغرافیایی فاصله ژنتیکی افزایش می‌یابد که علت آن کاهش جریان ژنی در اثر وجود موانع فیزیکی و یا طبیعی می‌باشد. بیکام و رودستام و همکاران در سال ۱۹۸۹ بیان نمودند که رفتار مهاجر یک فاکتور مهم تاثیر گذار بر میزان جریان ژنی و ساختار جمعیتی است. نرمتنان اغلب در طول چرخه زندگی خود نقاط متفاوتی را جهت لانه گزینی انتخاب می کنند و مجبورند که برای کامل کردن چرخه زندگی خود دائماً بین این مناطق مهاجرت کنند(۴۴). پراکنش جغرافیایی دوکفه ای های هر منطقه در ارتباط با شرایط زیست محیطی به ویژه میزان تحمل آن ها نسبت به نوسانات شوری یا سایر فاکتورهای موثر، شرایط بستر و وابستگی دوکفه ای ها به آن، وجود مصب ها و خوریات و شرایط هیدرولوژیک آن و هم چنین توانایی گسترش و پراکندگی دوکفه ای ها قرار دارد که بر میزان جریان ژنی تاثیر گذار هستند. در جمع بندی، نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر که اولین بررسی در مورد تنوع و ساختار ژنتیکی دوکفه ای ها در آب های ساحلی بندرعباس با استفاده از توالی یابی ژن میتوکندریایی 16SrRNA می باشد نشان داد که نشان گر های مولکولی به خصوص نشان گرهای میتوکندریایی می توانند به صورت ابزاری مناسب در جهت تفکیک جمعیت های آبزیان از جمله دوکفه ای ها به کار روند و این که این گونه نشان گرها را می-توان در گونه هایی با خویشاوندی نزدیک و با جد و نیای مشترک به راحتی استفاده کرد. در این بررسی مشخص گردید که تنوع هاپلوتیپی در حد کم و تنوع نوکلئوتیدی زیاد در بین این گونه ها در مناطق مورد بررسی وجود دارد. نتیجه گیری نهایی در این باره هنوز زود می باشد و به کارگیری سایر ژن های

میتوکندریایی به همراه روش های دیگر نظیر مایکروستلایت، RFLP، AFLP و غیره ضروری به نظر می رسد. از آن جا که یکی از علل کاهش شدید جمعیت ها، فقدان تنوع ژنتیکی می باشد، ارزیابی نتایج این بررسی و به کارگیری نتایج آن در آینده می تواند راه گشای مدیریت شیلاتی در بازسازی صحیح جمعیت ها و ذخایر این گونه با ارزش گردد.

منابع

۱-بیرامی، ن.، محمدصادق علوی، ی.، سیف آبادی،ج. ۱۳۹۴. رابطه اندازه – زی توده در چهار گونه از شکم پایان جنس Nerita (Gastropoda: Neritidae) در ناحیه جزر و مدی بندر لنگه، کنفرانس بین المللی توسعه با محوریت کشاورزی، محیط زیست و گردشگری، تبریز.

2.Ardura, A., Linde, A. R., Moreira, J. C., Garcia-Vazquez, E. (2010). DNA barcoding for conservation and management of Amazonian commercial fish. Biological Conservation, 143(6); 1438-1443.

4.Astani, M., Vosoughi, A., Salimi, L., Ebrahimi, M. (2012). Comparative study of heavy metal (Cd, Fe, Mn, and Ni) concentrations in soft tissue of gastropod Thais mutabilis and sediments from intertidal zone of Bandar Abbas. Advances in Environmental Biology, 319-327.

4.Baker, R. J., Bradley, R. D. (2006). Speciation in mammals and the genetic species concept. Journal of Mammalogy, 87(4); 643-662.

5.Barber, P. H., Erdmann, M. V., Palumbi, S. R. (2006). Comparative phylogeography of three codistributed stomatopods: origins and timing of regional lineage diversification in the coral triangle. Evolution, 60(9); 1825-1839.

6.Barnes, R. S. K., Calow, P. P., Olive, P., Golding, D. W., Spicer, J. I. (2009). The invertebrates: a synthesis: John Wiley & Sons.

7.Bisby, F., Roskov, Y., Orrell, T., Nicolson, D., Paglinawan, L., Bailly, N. (2010). Species 2000 & ITIS Catalogue of Life: 2010. Annual Checklist. Species 2000: Reading, UK.

8.Boore, J. L., Collins, T. M., Stanton, D., Daehler, L. L., Brown, W. M. (1995). Deducing the pattern of arthropod phylogeny from mitochondrial-DNA rearrangements.

9.Bouchet, P., HérOs, V., Lozouet, P., MaEstrati, P. (2008). A quarter-century of deep-sea malacological exploration in the South and West Pacific: where do we stand? How far to go. Tropical deep-sea Benthos, 25, 9-40.

10. Burt, J. A., Al-Khalifa, K., Khalaf, E., AlShuwaikh, B., & Abdulwahab, A. (2013). The continuing decline of coral reefs in Bahrain. Marine Pollution Bulletin, 72(2); 357-363.

11. Canapa, A., Barucca, M., Marinelli, A., Olmo, E. (2000). Molecular data from the 16S rRNA gene for the phylogeny of Pectinidae (Mollusca: Bivalvia). Journal of Molecular Evolution, 50(1); 93-97.

12. Cangussu, L. C., Altvater, L., Haddad, M. A., Cabral, A. C., Heyse, H. L., Rocha, R. M. (2010). Substrate type as a selective tool against colonization by non-native sessile invertebrates. Brazilian Journal of Oceanography, 58(3); 219-231.

13. Davis, G.P., Hetzel, D.J. (2000). Integrating molecular genetic technology with traditional approaches for genetic improvement in aquaculture species. Aquaculture research, 31(1); pp.3-10.

14. Gil, L. A. (2007). PCR-based methods for fish and fishery products authentication. Trends in Food Science & Technology, 18(11); 558-566.

15. Hajibabaei, M., Singer, G. A., Hickey, D. A. (2006). Benchmarking DNA barcodes: an assessment using available primate sequences. Genome, 49(7); 851-854.

16. Halanych, K. M. (1995). Evidence from 18S ribosomal DNA that the lophophorates are protostome animals. Science, 267(5204), 1641-1643.

17. Hebert, P. D., Cywinska, A., Ball, S. L. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 270(1512); 313-321.

18. Hebert, P. D., Stoeckle, M. Y., Zemlak, T. S., & Francis, C. M. (2004). Identification of birds through DNA barcodes. PLoS Biol, 2(10); e312.

19. Hosseinzadeh, H., Daghoghi, B., Rameshi, H. (2001). Atlas of the persian gulf molluscs.

20. Jow, H., Hudelot, C., Rattray, M., Higgs, P. (2002). Bayesian phylogenetics using an RNA substitution model applied to early mammalian evolution. Molecular Biology and Evolution, 19(9); 1591-1601.

21. Keller, A., Schleicher, T., Förster, F., Ruderisch, B., Dandekar, T., Müller, T. (2008). ITS2 data corroborate a monophyletic chlorophycean DO-group (Sphaeropleales). BMC Evolutionary Biology, 8(1); 1.
22. Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution, 16(2); 111-120.
23. Kyle, C., Wilson, C. (2007). Mitochondrial DNA identification of game and harvested freshwater fish species. Forensic Science International, 166(1); 68-76.
24. Lin, Y.-S., Poh, Y.-P., Lin, S.-M., Tzeng, C.-S. (2002). Molecular techniques to identify freshwater eels: RFLP analyses of PCR-amplified DNA fragments and allele-specific PCR from mitochondrial DNA. Zoological Studies-Taipei-, 41(4); 421-430.
25. Monaghan, M. T., Balke, M., Pons, J., Vogler, A. P. (2006). Beyond barcodes: complex DNA taxonomy of a South Pacific Island radiation. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 273(1588); 887-893.
26. Nassaj, S. M. S., Nabavi, S. M. B., Yavari, V., Savari, A., Maryamabadi, A. (2010). Species diversity of macrobenthic communities in salakh region, Qeshm Island, Iran. World, 2(6); 539-544.
27. Pearse, V., Pearse, J., Buchsbaum, M., Buchsbaum, R. (1987). Living invertebrates: Blackwell scientific publications.
28. Philippe, H., Chenuil, A., Adoutte, A. (1994). Can the cambrian explosion be inferred through molecular phylogeny? Development, 15-25.
29. Puslednik, L., Serb, J. M. (2008). Molecular phylogenetics of the Pectinidae (Mollusca: Bivalvia) and effect of increased taxon sampling and outgroup selection on tree topology. Molecular phylogenetics and evolution, 48(3); 1178-1188.
30. Rezai, H., Rameshi, H., Ranai-Rad, E. (1995). Distribution of benthic molluscs in shallow waters around some Iranian Islands in the Persian Gulf. Iranian Fisheries Research and Training Organization, Ministry of Jahad.
32. Saavedra, C., Peña, J. B. (2006). Phylogenetics of american scallops (Bivalvia: Pectinidae) based on partial 16S and 12S ribosomal RNA gene sequences. Marine Biology, 150(1), 111-119.
33. Saeedi, H. (2012). Availability of venerid clam, amiantis umbonella as potential metal bioindicator in bandar abbas coast, the Persian Gulf. The Egyptian Journal of Aquatic Research, 38(2); 93-103.
34. Savolainen, V., Cowan, R. S., Vogler, A. P., Roderick, G. K., Lane, R. (2005). Towards writing the encyclopaedia of life: an introduction to DNA barcoding. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 360(1462); 1805-1811.
35. Schander, C., Willassen, E. (2005). What can biological barcoding do for marine biology? Marine Biology Research, 1(1); 79-83.
36) Schultz, J., Müller, T., Achtziger, M., Seibel, P. N., Dandekar, T., Wolf, M. (2006). The internal transcribed spacer 2 database—a web server for (not only) low level phylogenetic analyses. Nucleic Acids Research, 34(suppl 2);W704-W707.
37. Seibel, P. N., Müller, T., Dandekar, T., Schultz, J., & Wolf, M. (2006). 4SALE–a tool for synchronous RNA sequence and secondary structure alignment and editing. BMC bioinformatics, 7(1); 1.
38. Sharabati, D. (1981). Saudi arabian seashells: selected red sea and arabian gulf molluscs: Amer Malacologists.
39. Sheppard, C., Al-Husiani, M., Al-Jamali, F., Al-Yamani, F., Baldwin, R., Bishop, J. (2010). The Gulf: a young sea in decline. Marine Pollution Bulletin, 60(1); 13-38.
40. Smith, A. D., Lui, T. W., Tillier, E. R. (2004). Empirical models for substitution in ribosomal RNA. Molecular Biology and Evolution, 21(3); 419-427.
41. Smith, M. A., Fisher, B. L. (2009). Invasions, DNA barcodes, and rapid biodiversity assessment using ants of Mauritius. Frontiers in Zoology, 6(10.1186); 1742-9994.
42. Smythe, K. (1972). Marine mollusca from bahrain island, persian gulf. J. Conch, 27; 491-496.
43. Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. (2007). MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution, 24(8); 1596-1599.
44. Waller, T. R. (2006). New phylogenies of the Pectinidae (Mollusca: Bivalvia): reconciling morphological and molecular approaches. Developments in Aquaculture and Fisheries Science, 35; 1-44.
45. Wolf, M., Ruderisch, B., Dandekar, T., Schultz, J., & Müller, T. (2008). Prof DistS

:(profile-) distance based phylogeny on sequence structure alignments. Bioinformatics, 24(20); 2401-2402.

46)Zhao, Y., Samal, E., Srivastava, D. (2005). Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. Nature, 436; 214-220.

Molecular Identification and Phylogeny of 16 Species of Bivalvia on Shores of the Persian Gulf(Hengam Island,Larak Island,Geshm Island,Lenge Island)

Sh. Masaeli[1], **P. Ghavam Mostafavi**[1], H. Hosseinzadeh Sahafi[2], S. Tamadoni Jahromi[3], A. Nabinejad[4], V.Noaman[4]

1. Department of Marine Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran/Iran
Mostafavi_pa@srbiau.ac.ir

2. Iranian Fisheries Science Research Institute Agriculture Research , Education and Extension Organization. Tehran, Iran

3. Persian Gulf and Oman Sea Ecology Research center , Iranian Fisheries Science Research Institute , Agricultural Research Education and Extention Organization (AREEO) , Bandar Abass.Iran

4. Veterinary Research Department, Isfahan Agriculture and Natural Resources Research and Education Center, AREO , Isfahan, Iran

***Received:*2016.14.9** **Accepted: 2016.5. 11**

Abstract

Inroduction & Objective: Bivalvia are one of the least studied orders in the Persian Gulf .A survey and molecular analysis was conducted to determine bivalvia species diversity in the Persian Gulf. Phylogenetic relationships among all described species of the bivalvia ,were examined with nucleotide sequence data from portions of mitochondrial gene 16srRNA We provide 16s barcode sequences of commertial bivalvia of Persian Gulf ,Iran.Industrial activities , ecologic consideration , and goals of the bivalvia mollecular Identification campaign make it crucial that species of the south costal be identified. The reconstruction of evolut phylogeny of these species are crucial for revealing stock identity that can be used for the management of fisheries industries in Iran. Mitochondrial DNA sequences were used to reconstruct the phylogeny of the bivalvia species .

Material and Methods: : For the purpose , DNA was extracted using Isoamyl alcohl phenol chloroform method. The evolutionary relationships among 16 species of the bivalvia were examined using 550 bp of mitochondrial DNA from the 16s rRNA gene.

Results: Finally the cladograms were compared and the resulted phylogenetic trees confirmed that the Iran ′s species origin is Indo west pacific species .some of Iran′s species , which were grouped with the other bivalvia taxa seem to always form a sister clade with Indo-west pacific species with strong bootstrap .

Conclusion: The result completely agrees with the previously defined species using morphological characters. However , we still lack any comprehensive and clear understanding of phylogenetic relationship in this group.

Keywords: Bivalvia,16s rRNA, Phylogeny , Persian Gulf.