

بررسی ساختار ژنتیکی صدف مروارید ساز لب سیاه *Pinctada sp. persica* با استفاده از توالی یابی ژن سیتوکروم اکسیداز I میتوکندری در خلیج فارس

محمدشریف رنجبر^{۱*}، حسین ذوالقرنین^۱، وحید یآوری^۲، محمدعلی سالاری علی آبادی^۱، بیتا ارچنگی^۱

۱. گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر

۲. گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر

چکیده

در این پژوهش به منظور بررسی ساختار ژنتیکی صدف مروارید ساز لب سیاه *Pinctada sp. persica* با استفاده از توالی یابی ژن سیتوکروم اکسیداز میتوکندری (COI) در خلیج فارس ۲۸ نمونه از سه ایستگاه (لارک، شیدور و خارک) صید گردید و قطعه ای از مانتل هر نمونه در اتانول ۹۶ درصد قرار داده شد. استخراج DNA به روش CTAB انجام گرفت و واکنش زنجیره ای پلی مرز با یک جفت پرایمر انجام گرفت. بعد از توالی یابی، الاین کردن سکانس ها با نرم افزار CLUSTAL_W صورت گرفت، تعداد هاپلوتایپ ها، فراوانی هاپلوتایپی، تنوع نوکلئوتیدی با نرم افزارهای DNAsp و Areliquien محاسبه گردید. همچنین درصد GC و ترسیم درخت فیلوژنی با نرم افزار MEGA انجام شد. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که صدف لب سیاه گونه خلیج فارس فاقد تمایز ژنتیکی و دارای یک جمعیت واحد می باشد. فاصله ژنتیکی این گونه با زیر گونه پلی نزی *P. margaritifera cumingii* دارای مقدار ۰/۱۳۶ می باشد که این مقدار، از فاصله بین دو گونه *Pinctada mazatlanica* و *P. margaritifera cumingii* به مقدار ۰/۰۲۷ بیشتر است و فاصله ژنتیکی بین صدف لب سیاه خلیج فارس با زیر گونه آفریقایی نیز مقدار (۰/۰۲۷) بدست آمد. بنابراین صدف لب سیاه خلیج فارس با زیر گونه *Pinctada margaritifera cumingii* در یک کلاد قرار نمی گیرد و به احتمال زیاد گونه جدیدی، متفاوت از گونه *Pinctada margaritifera* است.

واژگان کلیدی: صدف لب سیاه، *Pinctada*، ساختار ژنتیک، فیلوژنی، سیتوکروم اکسیداز، خلیج فارس

۱. مقدمه

خلیج فارس دریای نیمه بسته ای است که از طریق تنگه هرمز به دریای عمان و اقیانوس هند ارتباط می‌یابد. مختصات جغرافیایی این خلیج بین حدود ۴۸ درجه تا ۵۶ درجه شرقی و ۲۳ درجه و ۴۵ دقیقه تا ۳۰ درجه و ۳۰ دقیقه شمالی واقع شده است (Reynolds, 1993). خلیج فارس دریای نسبتاً کم عمق و نیمه بسته با مشخصه ورودی آب کم و میزان تبخیر بالاست (Sheppard, 1993). عمق آن در مصب اروندرود ۲۵ متر و در تنگه هرمز ۹۱ متر گزارش شده است (Coad, 1998). خلیج فارس به جهت دارا بودن انواع گوناگون ماهی ها و جانوران دریایی به میزان فراوان، در ردیف یکی از غنی ترین دریاهاى جهان قرار می‌گیرد.

اویسترهای مروارید ساز، دو جنس *Pinctada Röding, 1798* و *Pteria Scopoli, 1777* از خانواده Pteriidae را شامل می‌شوند. اعضای این خانواده دارای صدفی بیضوی مورب که بطور جانبی فشرده شده با خط پاشنه مستقیم و شکاف عمیق در ناحیه ابریشم هستند. تفاوت‌های شدید فردی در شکل و رنگ که بطور عمده ناشی از شرایط محیطی است مشاهده می‌شوند و یک سری دیگر از محدودیت‌ها مانع انجام یک طبقه بندی بدون ابهام در بین آنها می‌گردد (Wada and Tëmkin, 2008). اویستر مرواریدساز لب سیاه *Pinctada margaritifera* یک گونه گرمسیری اقیانوس هند - شرق آرام است (Rodgers et al., 2000). خلیج فارس یکی از زیستگاه‌های مهم اویسترهای مروارید ساز خصوصاً اویستر لب سیاه می‌باشد و تا قبل از کشف نفت در منطقه خلیج فارس، صادرات مروارید و پوسته صدف یکی از اقلام مهم صادرات این منطقه بوده است. گونه *P. margaritifera* دارای چندین زیر گونه می‌باشد که *zanzibarensi* در سواحل شرقی آفریقا، *persica* در خلیج فارس و *cumingi* در پلی نزی شرقی گزارش شده اند (Rao and Rao, 1974).

بطور معمول در توالی نوکلئوتیدی مربوط به یک ژن یا بخشی از یک ژن در گونه‌های مختلف یا حتی در افراد مختلف یک گونه، تفاوت‌هایی به چشم می‌خورد که هر چند این تفاوت‌ها بسیار اندک می‌باشند ولی می‌توانند به عنوان ملاکی جهت بررسی فاصله ژنتیکی و زمان اشتقاق دو گونه از یکسو و بازسازی و مدل سازی تاریخچه تکاملی و رابطه جدی- فرزندی و در نهایت ترسیم درخت فیلوژنی آنان مورد استفاده قرار گیرد (گله‌داری و همکاران، ۱۳۸۵). بررسی mtDNA روشی حساس و دقیق برای آشکار کردن تفاوت ژنتیکی فراهم می‌کند. این تفاوتها ممکن است بین جمعیت‌های یک گونه وجود داشته باشد و می‌توان از آنها در رده‌بندی فیلوژنیک و همچنین در تعیین درجه نزدیکی و شباهت ژنتیکی موجودات استفاده نمود (Moritz et al., 1987; Avise, 2004). پرورش مروارید خصوصاً پرورش مروارید سیاه در ۲ دهه گذشته رونق و رشد زیادی پیدا کرده است (Anon, 2006; Tisdell and Poirine, 2008). اساس و پایه صنعت پرورش مروارید در کشورهای ژاپن، استرالیا و پلی نزی فرانسه بطور سنتی با تکیه بر جمع آوری صدف از طبیعت می‌باشد. این جمع آوری صدف می‌تواند به شکل صدف بالغ یا بچه صدف باشد که تا رسیدن به اندازه مناسب برای پرورش مروارید، نگهداری می‌شوند (Southgate, 2008). بنابر این شناخت دقیق از پراکنش، میزان ذخایر و جمعیت‌های این گونه می‌تواند گام مهم و اولیه برای پرورش آن در منطقه خلیج فارس باشد از سویی تفاوت‌های موجود در بین جنسها، گونه‌ها و حتی زیر گونه‌ها می‌تواند تفاوت اساسی در کیفیت محصول و مروارید استحصالی ایجاد نماید. شناسایی بسیاری از گونه ای اویستر مرواریدساز بوسیله خصوصیات پوسته مخصوصاً در مراحل اولیه رشد کاری بسیار دشوار است (Wada and Tëmkin, 2008).

مطالعات متنوعی در زمینه بررسی تنوع ژنتیکی و جمعیتی اویسترهای گونه های مختلف و صدف مروارید ساز لب سیاه با روش مختلف ژنتیکی در دیگر مناطق انجام شده است که تاکنون روی ژنتیک این گونه مطالعه چندانی در خلیج فارس انجام نشده است که تنها مطالعه انجام شده محدود به مطالعات معظمی و همکاران در سال ۱۳۹۱ به

روش RFLP است که جمعیت واحدی را در منطقه مورد مطالعه مشاهده نمودند. هدف از انجام این تحقیق بررسی ساختار ژنتیکی صدف مروارید ساز لب سیاه با استفاده از توالی یابی ژن سیتوکروم اکسیداز I میتوکندری (COI) در خلیج فارس با تاکید بر جایگاه تکاملی و فیلوژنیک می باشد.

۲. مواد و روشها

پس از جمع آوری اطلاعات اولیه از بسترهای مرجانی در اطراف جزایر ایرانی شمال خلیج فارس و زیستگاههای این صدفها (تجلی پور، ۱۳۷۳؛ رنجبر، ۱۳۷۸) و مکانهایی که در گذشته صدفها صید می شدند، ۳ ایستگاه تعیین گردید که شامل ایستگاه جزیره لارک در شمال شرق خلیج فارس (۲۴ نمونه)، جزایر هندورابی - شیدور در شمال (۲۲ نمونه) و جزیره خارک در شمال غرب (۵ نمونه) بودند (شکل ۱). پس از تعیین ایستگاه به روش غواصی اسکوبا از زیستگاههای صدف، نمونه برداری انجام شد. تکه ای از مانتل هر نمونه با قیچی جدا نموده و در اتانول ۹۶ درجه قرار داده شد و به آزمایشگاه مرکز مطالعات و پژوهش های خلیج فارس واقع در بوشهر منتقل گردید.



شکل ۱- موقعیت ایستگاههای نمونه برداری صدف مرواریدساز لب سیاه در خلیج فارس (ایستگاه ۱ جزیره لارک در شمال شرق خلیج فارس، ایستگاه ۲ جزایر هندورابی - شیدور در شمال و ایستگاه ۳ جزیره خارک در شمال غرب).

استخراج DNA به روش CTAB از بافت ماهیچه ای صدف انجام شد (Porebski, 1997; Lind *et al.*, 2009). جهت سنجش کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به ترتیب از دستگاه اسپکتروفوتومتر و الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۱ درصد استفاده گردید. برای تکثیر ژن سیتوکروم اکسیداز I میتوکندری از پرایمرهای HCO2198: TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA و LCO1490: GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG استفاده گردید. جهت انجام PCR و تکثیر ژن هدف، ۱۰۰ نانوگرم DNA استخراجی، ۱ میکرولیتر از آغازگرها (۱۰ پیکومول) بعلاوه ۰/۵ میکرولیتر dNTP (۱۰ میلی مولار)، ۰/۲ میکرولیتر Taq (۵۰/μ)، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (۱۰X)، ۱ میکرولیتر MgCl₂ (۵۰ میلی مولار) استفاده شد که در نهایت حجم آن با آب مقطر به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد (Arnaud, 2001., 2008; Lind, 2009). برنامه دستگاه ترموسایکلر به ترتیب شامل واسرشته سازی (Denaturation) اولیه در ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴ دقیقه که با ۳۰

چرخه واسرشته سازی (Denaturation) در ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال پرایمرها به هدف (Annealing) در ۴۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴۰ ثانیه و بسط پرایمر (Extension) ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه دنبال می شد و در نهایت با بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه به پایان می رسید. پس از تکثیر ژن COI جمعاً ۲۸ نمونه از ۳ ایستگاه به روش سانجر توسط شرکت تکاپو زیست تعیین توالی شد. جهت بررسی و مقایسه توالی‌ها از نرم افزارهای BioEdit، MEGA Ver. 5 و DNAsp Ver. 5 استفاده شد. همچنین جهت مقایسه توالی اویسترهای لب سیاه خلیج فارس با سایر نقاط جهان در ژن بانک از طریق سایت NCBI توالی‌های مشابه را شناسایی سپس برای تعیین فاصله ژنتیکی در نرم افزار MEGA Ver. 5 مقایسه و درخت فیلوژنی ترسیم گردید.

۳. نتایج

توالی‌های ژن COI با طول ۶۴۹ جفت باز، توسط نرم افزار CLUSTAL_W مقایسه شدند، در سه ایستگاه لارک، شیدور و خارک جمعاً ۹ جایگاه پلی مورف و ۵ هاپلوتیپ توسط نرم افزار Arlequin Ver 3.5 ثبت شد (جدول ۱). هاپلوتیپ‌های مشاهده شده، در بانک ژنی ثبت گردید. توالی‌های همتراز شده پنج هاپلوتیپ ثبت شده در بانک ژنی به ترتیب در پایین آورده شده است. نتایج حاصل از توالی یابی DNA ایستگاههای مختلف نشان داد که توالی ژن COI در این گونه ۶۴۹ نوکلئوتید دارد و هاپلوتیپ شماره ۱ در همه جمعیت‌ها غالب است. اطلاعات مربوط به جمعیت‌ها، تعداد و تنوع هاپلوتیپ‌های خلیج فارس در جدول ۲ آمده است.

جدول ۱- هاپلوتیپ‌ها و جایگاه‌های پلی مورفیسم در صدف مرواریدساز لب سیاه خلیج فارس

هاپلو تیپ	شماره بانک ژنی	جایگاه پلی مورف									فراوانی	انحراف معیار (S.d)
		۱۸	۱۹	۲۴	۳۴	۳۵	۳۶	۳۷	۳۵۸	۶۰۵		
۱	AB777259	T	T	T	G	A	T	A	T	T	۰/۸۵۷۱۴۳	۰/۰۶۷
۲	AB777260	T	T	T	G	A	T	A	C	T	۰/۰۳۵۷۱۴	۰/۰۳۵
۳	AB777261	G	G	T	G	A	T	A	T	T	۰/۰۳۵۷۱۴	۰/۰۳۵
۴	AB777262	T	T	T	G	A	T	A	T	C	۰/۰۳۵۷۱۴	۰/۰۳۵
۵	AB777263	T	T	C	T	T	A	T	T	T	۰/۰۳۵۷۱۴	۰/۰۳۵

در ایستگاه لارک، هاپلوتیپ‌های شماره (۲، ۳ و ۴)، در ایستگاه شیدور هاپلوتیپ شماره (۵)، و هاپلوتیپ شماره (۱) در همه ایستگاه‌ها مشاهده گردید. همچنین بیشترین تنوع هاپلوتیپی برای ژن مورد بررسی در لارک (۰/۳۷۱) و کمترین در خارک (صفر) ثبت گردید. بیشترین و کمترین مقدار تنوع نوکلئوتیدی نیز به ترتیب در شیدور (۰/۰۱۹۳) و خارک (صفر) ثبت شد. تمایز ژنتیکی بر اساس آزمون AMOVA میان مناطق صفر بدست آمد ($F_{ST}=0$).

توالی ژن COI اویستر لب سیاه خلیج فارس با توالی این ژن در زیر گونه آفریقایی، زیر گونه اقیانوس آرام و ۶ گونه دیگر از جنس Pinctada مقایسه شدند. از سه گونه متعلق به جنس Ptereria نیز به عنوان خارج گروه استفاده شد.

دندروگرام فیلوژنی با ۱۰۰۰ تکرار توسط نرم افزار MEGA5 ترسیم و در شکل‌های ۲ آورده شده است، همچنین نسبت نوکلئوتید گونه‌ها در جدول ۳ نشان می‌دهد که نسبت GC به کل نوکلئوتیدها در صدف لب سیاه گونه خلیج فارس *Pinctada sp persica* (۴۴/۲ درصد) نسبت به زیر گونه آفریقایی *P. margaritifera zanzibarensi* (۴۴/۷ درصد) و زیر گونه پلی نزی *P. margaritifera cumingii* (۴۲/۱ درصد) اندکی بیشتر است. براساس نتایج حاصل از فاصله ژنتیکی، صدف لب سیاه گونه خلیج فارس *Pinctada sp persica* با زیر گونه پلی نزی *P. margaritifera cumingii* دارای مقدار ۰/۱۳۶ می‌باشد که این مقدار از فاصله بین دو گونه *P. margaritifera* و *Pinctada mazatlanica* و *P. margaritifera cumingii* به مقدار ۰/۰۲۷ بیشتر است و فاصله بین صدف لب سیاه خلیج فارس با زیر گونه آفریقایی دقیقاً مقدار (۰/۰۲۷) بدست آمد.

جدول ۲- مشخصات هاپلوטיפ‌های بدست آمده از ایستگاه‌های مختلف نمونه برداری

جمعیت	تعداد نمونه توالی یابی شده	تعداد هاپلو تایپ	تنوع هاپلو تایپی	تنوع نوکلئوتیدی
لازک	۱۵	۴	۰/۳۷۱	۰/۰۰۰۸۲
شیدور	۸	۲	۰/۲۵۰۰	۰/۰۰۱۹۳
خارک	۵	۱	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰

۴. بحث و نتیجه گیری

براساس نتایج بدست آمده از آزمون AMOVA تمایز ژنتیکی میان مناطق (سه ایستگاه) صفر محاسبه گردید ($F_{ST} = ۰/۰۰۰$) و این شاید به دلیل توانایی محدود این مارکر مولکولی باشد. Liu و Cordes (۲۰۰۴) بر این عقیده اند که میزان تنوع ژنتیکی در میان جمعیتها ممکن است محدود باشد لذا روشهای قویتر میکروستلایت و AFLP را پیشنهاد می‌کنند. نیاوندی و همکاران (۱۳۸۴) در مطالعات قبلی انجام شده بر روی گونه نرم تن مرکب ببری *Sepia pharaonis* در خلیج فارس و دریای عمان بر روی ژن 18SrRNA نتوانستند تفاوت ژنتیکی در بین ایستگاهها مشاهده نمایند و به این نتیجه رسیدند که ماهیان مرکب خلیج فارس و دریای عمان دارای یک جمعیت واحد می‌باشند. این در حالی است که یاورمقدم (۱۳۹۱) با مطالعه ای که به روش میکروستلایت بر روی گونه ی نرم تن مرکب ببری انجام دادند به این نتیجه دست یافتند احتمالاً بیش از یک جمعیت در شمال خلیج فارس وجود دارد و علت را توانایی بالاتر نشانگرهای میکروستلایت نسبت به روش PCR-RFLP بیان داشتند. بنابراین جهت مشاهده تمایز ژنتیکی و جمعیتی صدف مروارید سیاه، استفاده از دیگر روش های ملکولی نظیر میکروستلایت لازم بنظر می‌رسد.

اما نتایج چالش برانگیز این مطالعه حاصل مقایسه هاپلوטיפ خلیج فارس با دیگر مناطق و گونه‌های نزدیک می‌باشد. همانطور که در جدول ۴، مشاهده می‌گردد که فاصله ژنتیکی بین زیر گونه خلیج فارس با زیر گونه شرق آفریقا برابر با ۰/۰۲۷ و فاصله با زیر گونه *cumingii* برابر با ۰/۱۳۶ بدست آمده است در حالی که فاصله زیر گونه *cumingii* با گونه *P. mazatlanica* برابر با ۰/۰۲۷ یعنی دقیقاً برابر با دو زیر گونه خلیج فارس و شرق آفریقا می‌باشد. دندروگرامهای فیلوژنی (شکل ۲) نیز نشان می‌دهند که زیر گونه خلیج فارس با شرق آفریقا در دو شاخه جدا گانه اما در یک کلاد مستقل از *P. margaritifera* و *P. mazatlanica* قرار می‌گیرند. این موضوع این احتمال را قوت می‌بخشد که زیر گونه خلیج فارس زیر گونه ای از *P. margaritifera* نیست بلکه گونه ای مجزا از آن می‌باشد. Cunha و همکاران (۲۰۱۱) نیز گزارش کردند که نمونه‌های *P. margaritifera* از نژادهای مختلف هستند و نمونه‌های مربوط به جزایر

موریس در شاخه ای جدا از نمونه‌های ژاپن و پلی نزی قرار می‌گیرند بنابراین شاید آنها یک مجموعه گونه باشند و نمونه موریس می‌تواند یک گونه جداگانه باشد.

با مراجعه به نتایج ارائه شده در جدول ۳ مشاهده می‌گردد که از مقایسه ۳۸۷ نوکلئوتید ژن COI، نسبت GC در اویستر مرواریدساز خلیج فارس ۴۴/۲٪ در زیر گونه شرق آفریقا ۴۴/۷٪ و در گونه *Pinctada margaritifera* برابر با ۴۲/۱٪ و در گونه *Pinctada mazatlanica* برابر با ۴۱/۹٪ و در گونه *Pinctada maxima* برابر با ۴۳/۳٪ می‌باشد. هر چه نسبت GC یک گونه بیشتر باشد آن گونه اجدادی تر است (Rodriguez-Trelles et al., 2000). Chu و Yu (۲۰۰۶) از مطالعه ای که با ITS بر روی جنس *Pinctada* انجام داده بودند نتیجه گیری کردند که گونه‌های *P. margaritifera* و *P. maxima* قدیمی تر هستند. بنابراین می‌توان نتیجه گیری کرد که احتمالاً اویسترهای مرواریدساز لب سیاه خلیج فارس و شرق آفریقا باز هم به نسبت بقیه قدیمی تر هستند.

Hebert و همکاران (۲۰۰۳) پیشنهاد دادند که از COI به عنوان بارکد برای تشخیص گونه‌ها استفاده شود، همچنین از ITS ها برای بررسی رابطه فیلوژنی دوکفه ایها استفاده شده است (Lopez-Pinon et al., 2002; Kenchington et al., 2000; Yu et al., 2000). در مطالعات اخیر نیز که بر روی جنس *Pinctada* انجام شده است پیشنهاد کرده اند که ITS می‌تواند جایگزین مناسبی برای COI باشد (Yu and Chu, 2006; He et al., 2005). بنابراین در این مورد پیشنهاد می‌شود که از نشانگرهای ITS جهت تأیید نتایج حاصل از این بررسی استفاده گردد.

تشکر و قدردانی

با تشکر از آقایان مصطفی کامیاب، سید احمد قاسمی، احسان توسل پور، هدایت یاور مقدم، علی موحدی نیا، امیر اشتری لرکی و مجید عسکری حصنی که در انجام نمونه برداری، فعالیتهای آزمایشگاهی و آنالیز داده‌ها ما را یاری نمودند همچنین با تشکر از خانم لاله دارایی و برنامه کمکهای کوچک محیط زیست جهانی که حامی این تحقیق در قالب پروژه شماره (71) IRA-OP3-2-06-04 بودند.

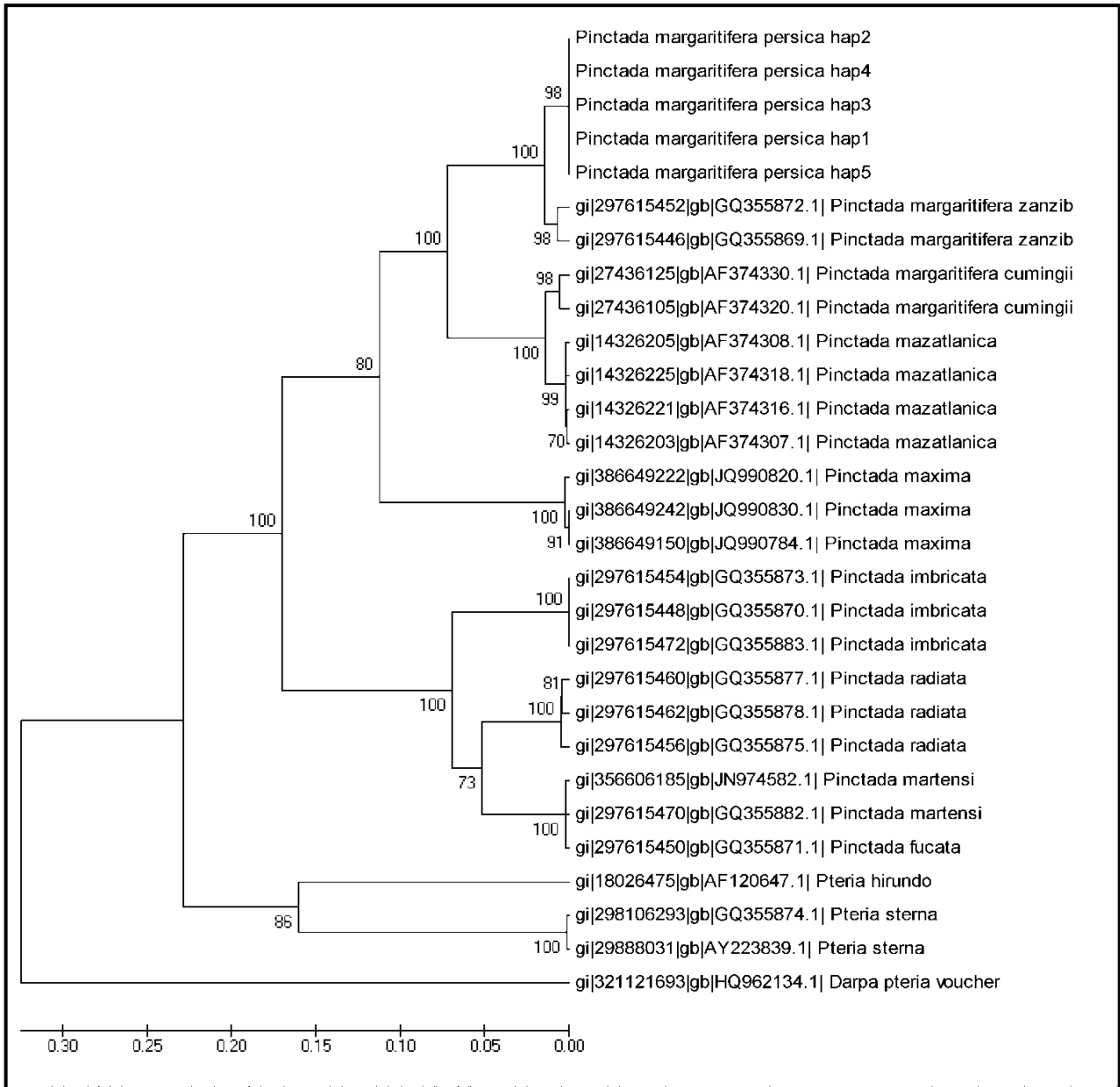
منابع

- تجلی پور، م.، ۱۳۷۳. بررسی سیستماتیک و انتشار نرمتنان سواحل ایرانی خلیج فارس، ترجمه تجلی پور، گلبرگ، انتشارات خیبر، تهران.
- تجلی پور، م.، ۱۳۶۴. نرمتنان مروارید ساز خلیج فارس، موسسه مطالعات و تحقیقات فرهنگی، تهران.
- رنجبر، م. ش.، ۱۳۷۸. بررسی پتانسیل جنوب شرقی جزیره قشم جهت پرورش صدف مرواریدساز محار معمولی، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه شهید چمران اهواز.
- گله داری، ح. فروغمند، م. ۱۳۸۵. مهندسی ژنتیک جامع. انتشارات بهشت. ۴۱۹ص.
- نهایندی، ر.، رضوانی گیل کلایی، س.، وثوقی، غ. و کاظمی، ب.، ۱۳۸۴. بررسی 18s rRNA در جمعیت ماهی مرکب ببری (*Sepia pharaonis*) در خلیج فارس و دریای عمان با استفاده از روش PCR-RFLP. مجله علمی شیلات ایران، سال ۱۴ (۲): ۱۵۷-۱۶۸.

یاورمقدم، ه.، ۱۳۹۱. ساختار ژنتیک جمعیت‌های ماهی مرکب ببری (*Sepia pharaonis*) با استفاده از نشانگرهای مولکولی ریز ماهواره در سواحل شمالی خلیج فارس. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر.

- Anon, P., 2006. Golay's global view. *Pearl world: Int. Pearling J.*, 15(1): 7–8.
- Arnaud-Haond, S., Monteforte, M., Galtier, N., Blanc, F., Bonhomme, F., 2001. Population structure and genetic variability of pearl oyster *Pinctada mazatlanica* along Pacific coasts from Mexico to Panama. *Conserv. Genet.*, 1: 299–307.
- Arnaud-Haond S., Vonau, V., Rouxel, C., Bonhomme, F., Prou, J., Goyard, E., Boudry, P., 2008. Genetic structure at different spatial scales in the pearl oyster (*Pinctada margaritifera cumingii*) in French Polynesian lagoons: beware of sampling strategy and genetic patchiness. *Mar. Biol.*, 155 (2): 147-157.
- Avise, J. C., 2004. *Molecular markers, natural history and evolution*. Sinauer Associates Inc Publishers. Sunderland, Massachusetts. 541p.
- Cunha, L. R., Blanc F., Bonhomme, F., Arnaud-Haond, S., 2011. Evolutionary Patterns in Pearl Oysters of the Genus *Pinctada* (Bivalvia: Pteriidae). *Mar. Biotechnol.*, 13 (2): 181-192.
- Coad, B. W., (1998). Systematic biodiversity in the freshwater fishes of Iran. *Ital. J. Zool.*, 65: 101–108.
- Folmer O., Black M., Lutz R., Vrijenhoek R., (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 3(5): 294–299.
- He, M., Huang, L., Shi, J., Jiang, Y., 2005. Variability of ribosomal DNA ITS-2 and its utility in detecting genetic relatedness of pearl oyster. *Mar. Biotechnol.*, 7: 40-45.
- Kenchington, E., Bird, C.J., Osborne, J., Reith, M., 2002. Novel repeat elements in the nuclear ribosomal RNA operon of the flat oysters *Ostrea edulis* C. Linnaeus, 1785 and *O. angasi* Sowerby, 1871. *J. Shellfish Res.*, 212: 697–705.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., deWaard, J. R., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 270: 313–322.
- Lind, C. E., Evans, B. S., Knauer, J., Taylor, J. J. U., Jerry D. R., 2009. Decreased genetic diversity and a reduced effective population size in cultured silver-lipped pearl oysters (*Pinctada maxima*). *Aquaculture.*, 286, 12–19.
- Liu, Z.J., Cordes, J.F., 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture.*, 238: 1–37.
- Lopez-Pinon, M.J., Insua, A., Mendez, J., (2002) Identification of four scallop species using PCR and restriction analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacer region. *Mar. Biotechnol.*, 4: 495–502.
- Moritz, C., Dowling, T. E., Brown, W. M., 1987. Evolution of Animal Mitochondrial DNA: Relevance for Population Biology and Systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 18: 269-292
- Porebski, S., Bailey, L. G., Baum, R. B., 1997. Modification of a CTAB DNA Extraction Protocol for Plants Containing High Polysaccharide and Polyphenol Components. *Plant. Mol. Biol. Rep.*, 15 (1): 8-15.
- Rao, K.V., Rao, S.K., 1974. Pearl oysters. In: Nair, R.V., Rao, S.K. (Eds.), *The Commercial Molluscs of India*. ICAR Bulletin of the Central Marine Fisheries Research Institute., 25: 84–105.
- Reynolds, R. M., 1993. Physical oceanography of the Gulf, Strait of Hormuz, and the Gulf of Oman: results from the Mitchell Expedition. *Mar. Pollut. Bull.*, 27: 35-60.

- Rodgers, S. K., Sims, N. A., Sarver, D. J., Cox, E. F., 2000. Distribution, Recruitment, and Growth of the Black-Lip Pearl Oyster, *Pinctada margaritifera*, in Kane'ohe Bay, O'ahu, Hawaii Pacific Science., 54(1): 31-38.
- Rodriguez-Trelles, F., Tarrío, R., Ayala, F.J., 2000. Evidence for a high ancestral GC content in *Drosophila*. Mol. Biol. Evol. 17, 1710-1717.
- Sheppard, C.R.C., 1993. Physical environment of the Gulf relevant to marine pollution: an overview. Mar. Pollut. Bull., 27: 3-8.
- Southgate, P. C., 2008. Pearl Oyster Culture. In: Southgate, P., Lucas, J., (Ed.), The Pearl Oyster. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 231-272.
- Tisdell, C., Poirine, B., 2008. Economics of Pearl Farming. In: Southgate, P., Lucas, J., (Ed.), The Pearl Oyster. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 473-495.
- Wada T. K., I. Tëmkin., 2008. Taxonomy and Phylogeny. In: Southgate, P., Lucas, J., (Ed.), The Pearl Oyster. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 37-75.
- Yu, E.T., Juini-Menez, M.A., Monje, V.D. (2000) Sequence variation in the ribosomal DNA internal transcribed spacer of *Tridacna crocea*. Mar Biotechnol., 2: 511-516
- Yu, D. H. & Chu, K. H. (2006) Species identity and phylogenetic relationship of the pearl oysters in *Pinctada Röding*, 1798 based on ITS sequence analysis. Bioch. Syst. Ecol., 34: 240-250.



شکل ۲- نمودار فیلوژنی بر اساس پیوند همجواری Neighbor Joining

جدول ۳- درصد نوکلئوتیدها در توالی های سیتوکروم اکسیداز گونه های مقایسه شده- تعداد کل نوکلئوتیدها ۳۸۷

مشخصات گونه	A	T	C	G	Total
<i>gi 386649242 gb JQ990830.1 Pinctada maxima</i>	39.9	16.8	19.7	23.6	386.0
<i>gi 297615472 gb GQ355883.1 Pinctada imbricata</i>	32.6	20.5	20.2	26.7	386.0
<i>gi 297615460 gb GQ355877.1 Pinctada radiata</i>	34.9	21.4	17.6	26.1	387.0
<i>gi 356606185 gb JN974582.1 Pinctada martensi</i>	35.7	19.1	16.3	28.9	387.0
<i>gi 297615450 gb GQ355871.1 Pinctada fucata</i>	35.1	19.4	16.5	28.9	387.0
<i>gi 14326225 gb AF374318.1 Pinctada mazatlanica</i>	41.6	16.5	15.8	26.1	387.0
<i>gi 321121693 gb HQ962134.1 Darpa pteria voucher</i>	39.1	29.3	17.4	14.1	396.0
<i>gi 298106293 gb GQ355874.1 Pteria sterna</i>	34.7	21.6	20.3	23.4	389.0
<i>gi 18026475 gb AF120647.1 Pteria hirundo</i>	37.4	19.5	16.2	26.9	390.0
<i>gi 27436125 gb AF374330.1 Pinctada margaritifera cumingii</i>	41.1	16.8	16.5	25.6	387.0
<i>gi 297615452 gb GQ355872.1 Pinctada margaritifera zanzibarensi</i>	37.0	18.3	20.7	24.0	387.0
<i>Pinctada sp persica hap1</i>	37.5	18.3	19.9	24.3	387.0

جدول ۴- فاصله گونه ها محاسبه شده به روش Pairwise distance و انحراف معیار با نرم افزار MEGA5

<i>gi 386649242 gb JQ990830.1 _Pinctada_maxima</i>	0.032	0.034	0.032	0.032	0.026	0.059	0.040	0.050	0.026	0.029	0.029
<i>gi 297615472 gb GQ355883.1 _Pinctada_imbricata</i>	0.297	0.021	0.019	0.019	0.035	0.066	0.043	0.047	0.036	0.037	0.038
<i>gi 297615460 gb GQ355877.1 _Pinctada_radiata</i>	0.305	0.145	0.016	0.017	0.032	0.061	0.046	0.045	0.033	0.037	0.037
<i>gi 356606185 gb JN974582.1 _Pinctada_martensi</i>	0.293	0.129	0.102	0.005	0.030	0.061	0.046	0.046	0.030	0.037	0.037
<i>gi 297615450 gb GQ355871.1 _Pinctada_fucata</i>	0.305	0.139	0.111	0.008	0.030	0.060	0.046	0.047	0.031	0.038	0.038
<i>gi 14326225 gb AF374318.1 _Pinctada_mazatlanica</i>	0.212	0.363	0.333	0.289	0.301	0.059	0.040	0.043	0.008	0.022	0.021
<i>gi 321121693 gb HQ962134.1 _Darpa_pteria_voucher</i>	0.651	0.704	0.664	0.658	0.645	0.639	0.054	0.056	0.059	0.057	0.056
<i>gi 298106293 gb GQ355874.1 _Pteria_sterna</i>	0.430	0.444	0.483	0.488	0.493	0.416	0.585	0.034	0.039	0.042	0.043
<i>gi 18026475 gb AF120647.1 _Pteria_hirundo</i>	0.535	0.530	0.498	0.504	0.509	0.458	0.615	0.325	0.044	0.050	0.051
<i>gi 27436125 gb AF374330.1 _Pinctada_margaritifera_cumingii</i>	0.212	0.363	0.333	0.289	0.301	0.027	0.645	0.402	0.463	0.022	0.021
<i>gi 297615452 gb GQ355872.1 _Pinctada_margaritifera_zanzib</i>	0.248	0.358	0.358	0.389	0.402	0.155	0.645	0.407	0.530	0.148	0.008
<i>Pinctada_sp_persica_hap1</i>	0.237	0.354	0.346	0.376	0.389	0.142	0.627	0.407	0.524	0.136	0.027

A study of the genetic structure of the Black-lip pearl oyster (*Pinctada sp. Persica*) using mtDNA Cytochrome Oxidase I sequencing in the Persian Gulf

Abstract

In this study, genetic stock structure of the black-lipped pearl oyster (*Pinctada sp. Persica*) was examined using mtDNA Cytochrome Oxidase I sequencing (COI) across Persian Gulf. For this reason, 28 samples were collected from three stations (Larak, Shidvar, and Khark). Total genomic DNA was extracted using DNA extraction methods and amplification of the selected fragments was undertaken.

Analysis of sequencing was carried out using Bioedit and Clustal-W. Total number of haplotypes, nucleotide diversity and haplotype frequencies were calculated using DNAsp and Areliquien softwares. In order to construct the phylogenetic tree, MEGA was undertaken. Results of analysis suggested that there is low genetic variability between sampled black-lipped oysters. Therefore, there is most probably a single population of black-lipped species across Persian Gulf. Comparison of this research with available data from other studies showed that genetic distance between black-lipped species and sub-species *P. margaritifera cumingii* is 0.136 while the distance between *Pinctada mazatlanica* and *P. margaritifera cumingii* (0.027) was lower. On the other hand, the genetic distance between the Persian Gulf black-lipped oyster and the African sub-species is 0.027. Hence, results of this study suggested that the Persian Gulf black-lipped oyster does not go under the same category with *P. margaritifera cumingii*. Therefore, the studied species could probably be a new species different from the *Pinctada margaritifera* in Persian Gulf area.

Key words: black-lip oyster, *Pinctada*, genetic structure, Phylogeny, Cytochrome Oxidase I, Persian Gulf.