

شناسایی گونه‌های خانواده *Nacellidae* Thiele, 1891 در جزیره هرمز (خلیج فارس)

زهرا میسوری، مهدی قدرتی شجاعی و جعفر سیف‌آبادی*

ایران، نور، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، گروه زیست‌شناسی دریا

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۹/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۴/۲۱

چکیده

شکم‌پایان با بیشترین فراوانی و تنوع زیستگاهی، بزرگترین رده از شاخه نرم‌تنان هستند. تنوع گونه‌ای لیمپت‌های حقیقی (خانواده *Nacellidae*) در جزیره هرمز با جمع‌آوری ۱۲۱ نمونه از اعضای این خانواده از دو ایستگاه در نواحی جذرومدی و در دو فصل پاییز و زمستان سال‌های ۱۳۹۵ و ۱۳۹۶ بررسی شد. مطالعات ریخت‌شناختی بر اساس صفات ریختی پوسته، پا و ساختار رادولا بر روی نمونه‌ها انجام شد و همچنین مطالعه مولکولی با استفاده از داده‌های ژن میتوکندریایی سیتوکروم اکسیداز C زیرواحد ۱ (COI) صورت گرفت. نتایج مطالعات ریخت‌شناختی نشان داد که تمامی نمونه‌های جمع‌آوری شده با وجود دارا بودن فنوتیپ-های متفاوت و تفاوت از نظر صفات طرح و رنگ پوسته، متعلق به گونه *Cellana karachiensis* می‌باشند. نتایج مطالعه مولکولی بر روی ۶ نمونه نیز این یافته را مورد تایید قرارداد. از این رو نتایج این مطالعه، علاوه بر نشان دادن تنوع فنوتیپی بالا برای گونه *C. karachiensis*، ارزش آرایه‌شناختی صفات طرح و رنگ پوسته را در شناسایی گونه‌های این خانواده مورد سوال قرارداد.

واژه‌های کلیدی: شکم‌پایان کشکی، خارچسب، سوهانک، جزیره هرمز

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۱۱۴۴۹۹۸۱۶۳، پست الکترونیکی: seyfabadi@modares.ac.ir

مقدمه

شباهت‌ها و تفاوت‌ها به ترتیب در سطح وسیعی برای طبقه‌بندی شکم‌پایان به کار گرفته شده‌اند. در تجزیه و تحلیل‌های پیشین از شکم‌پایان جلوآبشش، به جز ریخت‌شناسی رادولا، بعضی صفات دیگر مانند ساختار میکروسکوپی پوسته، دستگاه گوارش، سیستم عصبی، اندام تولیدمثل و ساختار اسپرم را مناسب اهداف طبقه‌بندی نشان داده‌اند (۲۱، ۲۲، ۳۱ و ۲۶). همچنین، می‌توان از تنوع در توالی DNA برای شناسایی و حل ابهام در طبقه‌بندی‌های جانوری و گونه‌های جدید استفاده کرد (۳۵ و ۱۹). توالی ژن COI میتوکندری جهت تمایز جانوران از یکدیگر کارایی داشته و می‌تواند به شکل ابزاری جهان‌شمول به‌عنوان بارکد شناسایی گونه به کار آید (۱۸). این تکنیک جهت تمایز در میان گونه‌های نزدیک به هم در شاخه‌های مختلف جانوری مناسب می‌باشد (۵۵ و ۳۰).

شکم‌پایان با بیشترین فراوانی و تنوع زیستگاهی، بزرگترین رده از شاخه نرم‌تنان و یکی از گروه‌های مهم کف‌زی در مناطق ساحلی محسوب می‌شوند (۳۴ و ۵۱). حفره دهانی در سیستم گوارشی شکم‌پایان از عناصر گسسته متعدد و مرتبطی تشکیل شده است (۴۸) که رادولا اصلی‌ترین اندام تغذیه‌ای محسوب می‌شود (۹). ساختار رادولا در مطالعات آرایه‌شناختی و تبارزادی اهمیت بالایی را دارا می‌باشد (۸). چندریختی گونه‌ای در شکم‌پایان با صفات ریختی رادولا بهتر از صفات پوسته و پا نشان داده می‌شود (۳۶)، و مقایسه ساختار رادولا بیانگر اختصاصی بودن آن برای هر یک از گونه‌ها می‌باشد (۲۵ و ۲۹).

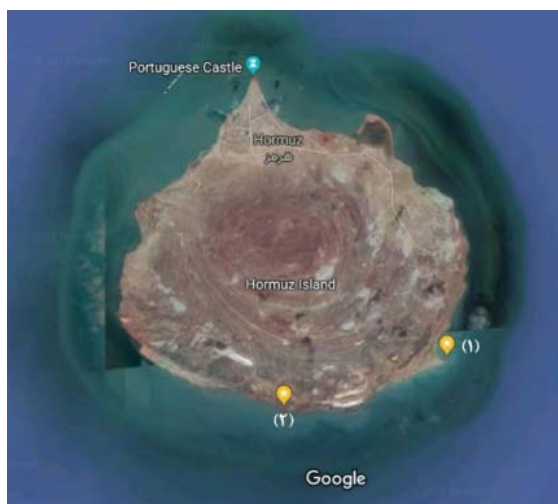
ویژگی‌های رادولا در سطوح خانواده، جنس، شباهت‌ها و در سطح گونه، تفاوت‌های پایدار را نشان می‌دهند.

شناسایی لیمپت‌ها در مناطق مختلف مورد توجه بوده (۴۱ و ۴۵) و در برخی مقالات از رادولا به‌عنوان یک صفت آرایه‌شناختی مهم و همچنین تفکیک گونه‌ها در کنار تأیید مولکولی استفاده شده است (۳۶، ۴۹، ۵۴ و ۵۶).

تاکنون اطلاعات اندکی در رابطه با شناسایی لیمپت‌ها در خلیج فارس و دریای عمان وجود دارد (۱، ۵ و ۱۱). همچنین در ایران، استفاده از ساختار رادولا در تفکیک شکم‌پایان در چند سال اخیر مورد توجه قرار گرفته است (۳، ۴ و ۱۰). لذا با توجه به کمبود اطلاعات پیرامون لیمپت‌ها در خلیج فارس و دریای عمان و همچنین وجود شواهدی مبنی بر وجود چندین گونه لیمپت حقیقی در این مناطق، پژوهش حاضر به‌منظور بررسی گونه‌های موجود از جمعیت‌های لیمپت‌های حقیقی (زیررده

مواد و روشها

نمونه‌برداری: پس از بررسی‌های اولیه میدانی در مناطق جزرومدی جزیره هرمز (۵۶/۴۶ شرقی و ۲۷/۰۶ شمالی)، دو ایستگاه تجمع لیمپت‌های حقیقی (زیررده *Patellogastropoda*) برای جمع‌آوری انتخاب و موقعیت جغرافیایی آنها ثبت گردید (شکل ۱، جدول ۱). نمونه‌برداری در زمستان ۹۵، ۹۶ و پاییز ۹۶، در زمان حداکثر جزر انجام شد.



شکل ۱- جزیره هرمز و ایستگاه‌های نمونه‌برداری. ایستگاه ۱ (مرکز تحقیقات محیط‌زیست)، ایستگاه ۲ (خاک سرخ)

جدول ۱- مشخصات ایستگاه‌های نمونه‌برداری در جزیره هرمز

ایستگاه	نام ایستگاه	مختصات جغرافیایی	توصیف ایستگاه و بستر
۱	ایستگاه تحقیقات محیط زیست	۵۶° ۲۹' ۴۶" E ۲۷° ۰۲' ۳۷" N	منطقه بالای جزر و مدی، صخره‌ای صیقلی میان جزر و مدی، صخره‌ای - ماسه‌ای با پوشش جلبکی روی صخره‌ها ناحیه پایین جزر و مدی، سنگی - ماسه‌ای
۲	خاک سرخ	۵۶° ۲۷' ۳۲" E ۲۷° ۰۲' ۰۱" N	منطقه بالای جزر و مدی، صخره‌ای صیقلی میان جزر و مدی سنگی، صخره‌ای - ماسه‌ای با پوشش جلبکی پراکنده ناحیه پایین جزر و مدی، سنگی - ماسه‌ای فراوانی املاح معدنی در آب به‌دلیل وجود معدن خاک سرخ

کرده و پس از انجام الکتروفورز و حرکت DNA در ژل، ژل را به درون دستگاه UV-doc منتقل و عکس‌برداری انجام شد.

جهت تکثیر ژن میتوکندریایی CO1، از پرایمرهای (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') LCO1490 و (5'-HC02198-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') (۱۲) استفاده شد. برای تکثیر این جایگاه‌ها طی واکنش PCR با حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر شامل: ۵ میکرولیتر بافر PCR 1x، ۴ میکرولیتر منیزیم کلراید، ۴ میکرولیتر dNTP mix، ۵/۲ میکرولیتر پرایمر رفت و ۵/۲ میکرولیتر پرایمر برگشت، ۱ میکرولیتر آنزیم Taq پلیمرز، ۱ میکرولیتر DNA الگو و ۳۰ میکرولیتر آب مقطر استفاده گردید. برنامه دمایی به‌کار رفته برای واکنش PCR: واسرشته‌سازی در دمای ۹۵ °C به مدت ۵ دقیقه، مرحله دوم شامل ۳۵ چرخه به‌ترتیب واسرشته‌سازی در دمای ۹۵ °C به مدت ۴۰ ثانیه، هم‌سرشته‌سازی به مدت ۴۰ ثانیه در دمای ۵۶ °C و مرحله بسط به مدت ۲ دقیقه در دمای ۷۲ °C و در نهایت مرحله بسط نهایی در دمای ۷۲ °C به مدت ۵ دقیقه انجام شد. محصول PCR به‌دست آمده برای بررسی الگوی بانندی و ارزیابی نتایج، در ژل آگاروز یک درصد با ولتاژ ۷۰ ولت به مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز شدند. در نهایت با استفاده از دستگاه UV-doc تصاویر مربوطه تهیه گردید.

برای تعیین توالی قطعات تکثیر شده، محصول PCR روی ژل آگاروز ۱ درصد بارگذاری گردید و پس از استخراج باندها مدنظر از ژل (۴۷) به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شد. در ادامه ۶ توالی به‌دست آمده پس از مشاهده با استفاده از نرم‌افزار Chromas 2.1 (۳۲) اصلاح و مورد تایید قرار گرفت. همچنین علاوه بر توالی‌های به دست آمده در این مطالعه، ۵۵ توالی دیگر نیز از بانک ژن، جهت انجام تحلیل‌های تبارزادی در این مطالعه مورداستفاده قرار گرفتند (جدول ۲). در ادامه توالی‌ها توسط الگوریتم CLUSTAL W (۵۳)، در نرم افزار BioEdit 7.0.5 (۱۶)

مطالعات ریخت‌شناختی: در اولین گام، با استفاده از کلید شناسایی موجود (۴۴) و سایت معتبر WoRMS، نمونه‌های دارای ویژگی‌های ریختی یکسان، براساس شکل پوسته و رنگ پا در گروه‌های جداگانه قرارداد شدند. در گام بعدی، صفات ریختی لیمپت‌ها ثبت گردید، سپس نمونه‌ها در الکل ۷۰ درصد برای بررسی ساختار رادولا و الکل ۹۶ درصد برای مطالعات مولکولی تثبیت (۲۰) و به آزمایشگاه علوم دریایی منتقل شدند. سپس، اندام رادولا با دقت از بخش دهانی نمونه‌های لیمپت جداسازی و جهت زدودگی از بافت‌های اضافی، به مدت حداقل یک دقیقه در محلول رقیق هیپوکلرید سدیم با نسبت ۹:۱ (آب ژاول: آب مقطر) قرارداد شد (۱۳ و ۲۴). سپس با آب مقطر شستشو داده شد و تا زمان عکس‌برداری در الکل ۷۰ درصد نگه‌داری گردید. در نهایت، رادولاهای فیکس شده به آزمایشگاه میکروسکوپ الکترونی دانشگاه تربیت مدرس منتقل و به‌وسیله دستگاه پوشش‌دهنده با لایه نازکی از طلا پوشش شدند و با میکروسکوپ الکترونی SEM (مدل XL 30 فیلیپس) از آنها عکس گرفته شد. عکس‌برداری از قسمت میانی رادولا با دو تکرار انجام گردید.

مطالعات مولکولی: استخراج DNA نمونه‌های مورد بررسی با روش فنل-کلروفرم (۵۲) انجام شد. کمیته DNA ژنومی با استفاده از دستگاه نانودراپ با جذب اشعه ماوراء بنفش مشخص گردید. مقدار پرتو ماوراء بنفش جذب شده به‌وسیله محلول DNA در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای یک نمونه DNA خالص، نسبت جذب در ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر برابر با ۲-۱/۸ می‌باشد. نسبت کمتر از ۱/۸ نشان دهنده آلودگی با پروتئین و فنل و بالاتر از ۲ آلودگی با RNA است (۵۷). پس از اندازه‌گیری کمیته DNA با نانودراپ، کیفیت نمونه‌ها با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد و رنگ‌آمیزی با DNA safe stain تعیین شد. مقدار ۱ میکرولیتر DNA استخراجی را داخل چاهک ژل آگارز ۱ درصد بارگیری

در این درخت، مقادیر bootstrap بالای ۷۰ درصد به‌عنوان مقادیر مناسب در نظر گرفته می‌شوند. همچنین درخت تبارزادی Bayesian با استفاده از نرم‌افزار MrBayes 3.2.6 (۴۶) با روش Markov Chain Monte Carlo (MCMC) ترسیم شده و چهار زنجیره به‌طور همزمان برای ۱۰ میلیون نسل راه اندازی شدند. در درخت Bayesian مقادیر احتمال پسین بالای ۹۹ درصد، خیلی خوب و مقادیر بین ۹۰ تا ۹۵ درصد به‌عنوان مقادیر خوب در نظر گرفته می‌شوند.

هم‌تراز شدند. سپس در نرم افزار MEGA X (۲۸) برای عدم وجود کدون پایانی کنترل شدند. بهترین مدل تکاملی با استفاده از نرم‌افزار Modeltest3.7 (۴۳) انتخاب شد. فاصله ژنتیکی بین نمونه‌های بررسی شده در نرم‌افزار MEGA X (۲۸) پس از انتخاب مدل تکاملی مناسب محاسبه گردید. درخت بیشینه درست‌نمایی (Maximum Likelihood) با استفاده از نرم‌افزار RaxmlGUI 1.3 (۵۰) رسم شد. استحکام گره‌ها در درخت بیشینه درست‌نمایی با ۱۰۰۰ تکرار bootstrap به‌دست آمد.

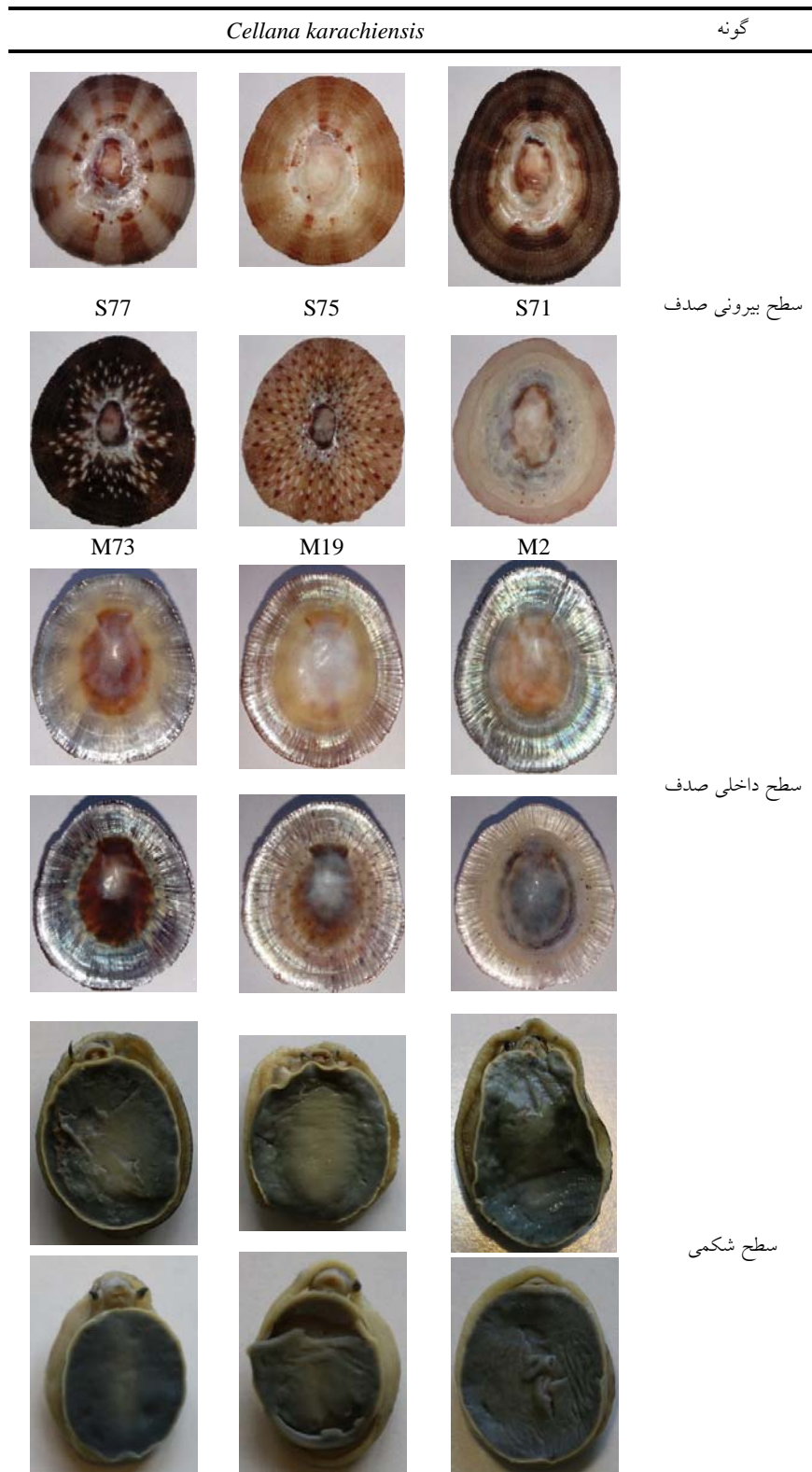
جدول ۲- توالی‌های گرفته شده از بانک ژنی NCBI جهت انجام تحلیل‌های تبارزادی

کد دسترسی ژن CO1	گونه	نمونه	کد دسترسی ژن CO1	گونه	نمونه	کد دسترسی ژن CO1	گونه	نمونه
AB238547	<i>C. karachiensis</i>	۱	KX453282	<i>C. rota</i>	۲۰	GQ455962	<i>C. radians</i>	۳۹
AB433634	<i>C. karachiensis</i>	۲	KX453283	<i>C. rota</i>	۲۱	GQ455963	<i>C. radians</i>	۴۰
LCO60523	<i>C. karachiensis</i>	۳	AB238550	<i>C. pricei</i>	۲۲	AB433648	<i>C. stellifera</i>	۴۱
LCO60524	<i>C. karachiensis</i>	۴	AB238561	<i>C. solida</i>	۲۳	AB238544	<i>C. denticulata</i>	۴۲
LCO60525	<i>C. karachiensis</i>	۵	GQ455974	<i>C. solida</i>	۲۴	GQ455938	<i>C. denticulata</i>	۴۳
LCO60526	<i>C. karachiensis</i>	۶	FJ515970	<i>C. tramoserica</i>	۲۵	GQ455939	<i>C. denticulata</i>	۴۴
KP698009	<i>C. karachiensis</i>	۷	FJ515971	<i>C. tramoserica</i>	۲۶	AB433649	<i>C. strigilis</i>	۴۵
KP698010	<i>C. karachiensis</i>	۸	FJ515972	<i>C. tramoserica</i>	۲۷	KY353129	<i>C. strigilis</i>	۴۶
KP698011	<i>C. karachiensis</i>	۹	FJ515973	<i>C. tramoserica</i>	۲۸	KY353130	<i>C. strigilis</i>	۴۷
KP698012	<i>C. karachiensis</i>	۱۰	FJ515974	<i>C. tramoserica</i>	۲۹	KY353131	<i>C. strigilis</i>	۴۸
KP698013	<i>C. karachiensis</i>	۱۱	AB238563	<i>C. tramoserica</i>	۳۰	KY353132	<i>C. strigilis</i>	۴۹
KP698014	<i>C. karachiensis</i>	۱۲	AB238545	<i>C. flava</i>	۳۱	KY353133	<i>C. strigilis</i>	۵۰
KP698015	<i>C. karachiensis</i>	۱۳	KY353124	<i>C. ardosiaea</i>	۳۲	HQ880555	<i>N. deaurata</i>	۵۱
KF840075	<i>C. karachiensis</i>	۱۴	KY353125	<i>C. ardosiaea</i>	۳۳	KX898056	<i>Nacella</i> sp.	۵۲
KF840076	<i>C. karachiensis</i>	۱۵	KY353126	<i>C. ardosiaea</i>	۳۴	GU901248	<i>N. clypeater</i>	۵۳
KF840077	<i>C. karachiensis</i>	۱۶	KY353127	<i>C. ardosiaea</i>	۳۵	KF261314	<i>N. concinna</i>	۵۴
KX453279	<i>C. rota</i>	۱۷	KY353128	<i>C. ardosiaea</i>	۳۶	GU901220	<i>N. macquariensis</i>	۵۵
KX453280	<i>C. rota</i>	۱۸	AB238551	<i>C. radians</i>	۳۷			
KX453281	<i>C. rota</i>	۱۹	GQ455961	<i>C. radians</i>	۳۸			

نمونه‌ها براساس شکل پوسته، رنگ پا و با استفاده از کلید شناسایی موجود بررسی شدند و کلیه نمونه‌ها متعلق به گونه *Cellana karachiensis* از خانواده Nacellidae شناسایی شدند. اطلاعات مربوط به ۶ فنوتیپ مشاهده شده از این گونه در جدول ۳ و شکل ۲ آورده شده است.

نتایج

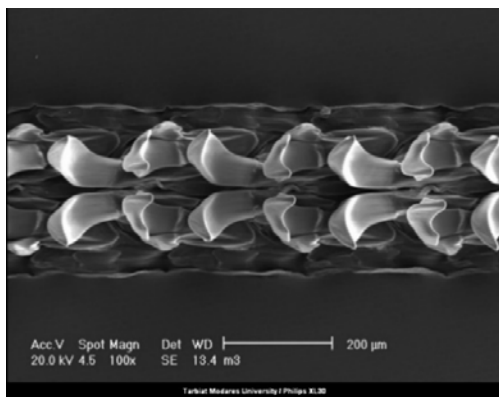
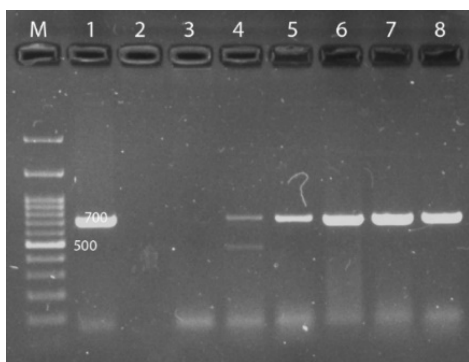
ریخت شناختی: در مجموع تعداد ۱۲۱ نمونه شکم‌پای حقیقی (زیررده Patellogastropoda) از دو ایستگاه در جزیره هرمز، طی سه مرحله زمانی، جمع‌آوری شد.



شکل ۲- تصاویر رنگ سطح بیرونی صدف، سطح داخلی صدف و سطح شکمی در گونه *Cellana karachiensis*

جدول ۳- جایگاه گونه و مشخصات ریختی آن

اسم گونه	<i>Cellana karachiensis</i> (Winckworth, 1930)
اسم فارسی	حلزون گنبدی صاف
راسته	Archaeogastropoda
خانواده	Nacellidae
اندازه	۲۳-۴۰ میلی‌متر
رنگ پوسته	کرم، قهوه‌ای روشن و تیره
رنگ پا	سبز مایل به طوسی
مشخصات نمونه	پوسته تخم مرغی شکل، دارای خطوط شعاعی برجسته و محکم، نوارهای عرضی قهوه‌ای تیره در سطح خارجی. سطح درونی نقره‌ای و اثر ماهیچه‌ای قهوه‌ای نعل اسبی شکل دارد. طرح رنگ صدف در نمونه‌های جوانتر به صورت لکه‌های پراکنده قهوه‌ای-قرمز در یک زمینه زرد رنگ ظاهر می‌شود.
پراکنندگی و رفتار	بستر سنگی و صخره‌ای صیقلی در ناحیه میانی و پایین جزرومدی، گیاه‌خوار، فراوان

شکل ۳- تصویر میکروسکوپی SEM از رادولای گونه *C. karachiensis*

شکل ۴- طول قطعات تکثیر شده در واکنش PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد (M: Molecular Marker)

نتایج براساس هر دو درخت تبارزادی بیشینه درست‌نمایی و بیزین نشان می‌دهد که نمونه‌های ۱، ۳، ۵، ۶، ۷ و ۸

ساختار رادولا گونه *C. karachiensis*: رادولای این گونه دارای ساختار Docoglossan یا Stereoglossan بوده که ابتدایی‌ترین ساختار و بدون تغییر از اجداد اولیه را نشان می‌دهد. در این نوع رادولا، هر ردیف دارای یک دندان مرکزی و معمولا کوچک است که در برخی گونه‌ها ممکن است وجود نداشته باشد. ۱ تا ۳ دندان جانبی و دندان حاشیه‌ای قلبی شکل دارد. هر دو دندان جانبی و حاشیه‌ای معمولا کوتاه و محکم هستند و ساختاری سفت و سخت دارند. فرمول این ساختار به صورت « 2 + D (Dominant) + 3 + 3 + D + 2 + 0 + 2 + D + 3 » یا « 3 + R (Rachis) + 2 + D + 3 » است. تصویر رادولای گونه بررسی شده با بزرگنمایی ۲۰۰ میکرومتر در شکل ۳ آورده شده است.

مطالعات مولکولی: میزان جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر، بیانگر مقادیر بیشتر از ۱/۷ و کمتر از ۲/۱ بود. نتیجه تکثیر ژن میتوکندریایی CO1، اندازه قطعه مورد انتظار حدود ۷۰۰ جفت بازی را نشان داد (شکل ۴).

نتیجه توالی‌یابی ژن CO1 به روش Sanger، خوانش ۵۵۱ جفت باز قابل اعتماد بود. کد دسترسی نمونه‌های بررسی شده در بانک ژنوم جهانی NCBI در جدول ۴ آورده شده است.

تعلق آن‌ها به کلاد ذکر شده، با مقادیر bootstrap و احتمال پسین بالایی، به ترتیب در هر دو درخت بیشینه درست‌نمایی و Bayesian حمایت می‌شود.

متعلق به گونه *C. karachiensis* از خانواده Nacellidae می‌باشند. براساس هر دو درخت، نمونه‌های مذکور متعلق به کلاد *C. karachiensis* و کلاد خواهری گونه *C. rota* می‌باشند. جایگاه آرایه‌شناختی نمونه‌های مورد مطالعه و

جدول ۴- کد دسترسی ژن CO1 نمونه‌های مورد بررسی ثبت شده در بانک ژنی NCBI

کد دسترسی ژن CO1	محل نمونه‌برداری	گونه	نمونه
MH795133	جزیره هرمز	<i>Cellana karachiensis</i>	۱
MH795134	جزیره هرمز	<i>Cellana karachiensis</i>	۳
MH795136	جزیره هرمز	<i>Cellana karachiensis</i>	۵
MH795137	جزیره هرمز	<i>Cellana karachiensis</i>	۶
MH795138	جزیره هرمز	<i>Cellana karachiensis</i>	۷
MH795139	جزیره هرمز	<i>Cellana karachiensis</i>	۸

کد	اسم گونه	نمونه
S73	<i>Cellana karachiensis</i>	۱
S75	<i>Cellana karachiensis</i>	۳
M19	<i>Cellana karachiensis</i>	۷
M2	<i>Cellana karachiensis</i>	۵
S77	<i>Cellana karachiensis</i>	۸
S71	<i>Cellana karachiensis</i>	۶

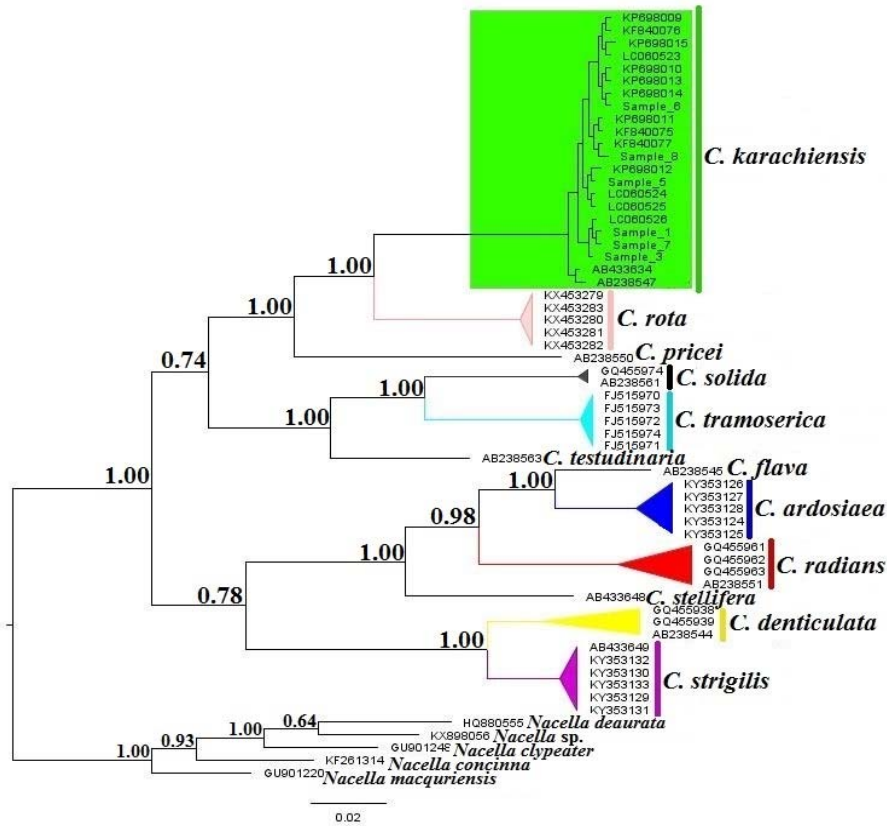
خانواده این گونه در اطلس نرم‌تنان خلیج فارس (۲) به اشتباه Patellidae ذکر شده است. مقایسه ریختی نمونه‌ها براساس صفات شکل پوسته، رنگ پا و ساختار رادولا نشان داد که کلیه نمونه‌ها متعلق به گونه *C. karachiensis* می‌باشند. تنها تفاوت در بین این نمونه‌ها مربوط به طرح و رنگ پوسته بود. از این رو به نظر می‌رسد با توجه به این که افراد متعلق به یک گونه طرح و رنگ پوسته متفاوتی را نشان می‌دهند، این صفات فاقد اعتبار آرایه‌شناختی در شناسایی گونه‌ها باشند، اما با توجه به این که در این مطالعه تمامی نمونه‌ها متعلق به یک گونه بودند، لازم است اعتبار آرایه‌شناختی این صفات با استفاده از تعداد نمونه‌های بیشتر متعلق به گونه‌های متفاوت و در محدوده جغرافیایی وسیع‌تر نیز مورد بررسی قرار بگیرد.

محاسبه فواصل ژنتیکی براساس مدل K2P نشان می‌دهد فاصله ژنتیکی در میان نمونه‌های مورد مطالعه برابر با صفر و همچنین فاصله ژنتیکی بین نمونه‌های مورد مطالعه و گونه *C. karachiensis* برابر با ۰/۱ درصد می‌باشد. همچنین میزان فاصله ژنتیکی بین نمونه‌های مورد مطالعه با *C. rota* و همچنین گونه *C. karachiensis* با *C. rota* برابر با ۱۰/۴ درصد است که این میزان کمتر از اختلاف ژنتیکی این گونه با دیگرگونه‌ها می‌باشد. نمونه‌های مربوط به ایران بیشترین فاصله ژنتیکی را نیز با گونه *C. ardosiaea* (۲۰/۳ درصد) دارا می‌باشند (جدول ۶). اسامی نمونه‌های ایران در درخت تبارزادی به ترتیب زیر می‌باشد (جدول ۵).

بحث

مطالعات ریخت‌شناختی: براساس نتایج این پژوهش، از مجموع ۱۲۱ نمونه لیمپت حقیقی در ۶ فنوتیپ، تنها یک گونه *C. karachiensis* از خانواده Nacellidae شناسایی شد.

جدول ۵- نام و کد نمونه‌های ایران

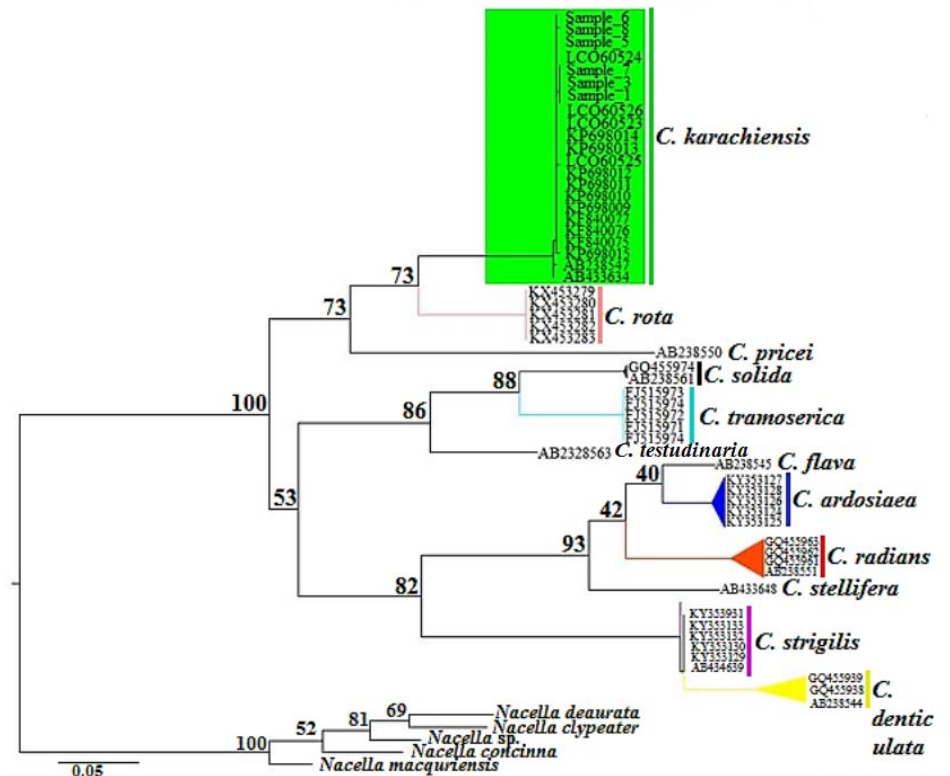


شکل ۵- درخت تبارزادی Bayesian براساس داده‌های ژن میتوکندریایی COI، اعداد روی هر شاخه بیانگر مقادیر احتمال پسین می‌باشند

جدول ۶- فاصله ژنتیکی حاصل از توالی‌های ژن COI بین نمونه‌های مورد مطالعه با گونه‌های مختلف

	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳
۱ <i>C. karachiensis</i>	۰/۱												
۲ نمونه‌های ۱، ۳، ۵، ۶، ۷ و ۸	۰/۱	۰											
۳ <i>C. rota</i>	۱۰/۴	۱۰/۴	۰										
۴ <i>C. pricei</i>	۱۵	۱۵	۱۴/۲	-									
۵ <i>C. solida</i>	۱۵/۴	۱۵/۳	۱۷/۱	۱۶/۱	۰/۲								
۶ <i>C. tramoserica</i>	۱۶/۳	۱۶/۳	۱۸/۶	۱۸/۲	۱۰/۱	۰							
۷ <i>C. testudinaria</i>	۱۴/۴	۱۴/۵	۱۵/۶	۱۷	۱۰/۹	۱۱/۱	-						
۸ <i>C. flava</i>	۱۷/۳	۱۷/۳	۱۶/۳	۱۶/۵	۱۶/۲	۱۶/۶	۱۴/۹	-					
۹ <i>C. ardosiaea</i>	۲۰/۲	۲۰/۳	۱۵/۹	۱۶	۱۵/۶	۱۶/۵	۱۵/۷	۶	۱				
۱۰ <i>C. radians</i>	۱۸/۴	۱۸/۵	۱۸/۱	۱۸/۲	۱۶/۵	۱۵/۳	۱۵/۴	۱۸/۵	۸/۶	۰/۹			
۱۱ <i>C. stellifera</i>	۱۷/۹	۱۷/۹	۱۶/۶	۱۷/۸	۱۷/۳	۱۸/۹	۱۸/۲	۱۰/۲	۹/۹	۱۰/۱	-		
۱۲ <i>C. strigilis</i>	۱۸/۴	۱۸/۴	۱۸/۵	۱۸/۶	۱۸/۵	۱۴/۱	۱۶	۱۵/۹	۱۵/۶	۱۷/۵	۱۷/۲	۰/۱	
۱۳ <i>C. denticulata</i>	۱۸	۱۸/۱	۱۷/۵	۱۹/۳	۱۷/۳	۱۴/۷	۱۵/۴	۱۵/۴	۱۴/۲	۱۶/۷	۱۶/۱	۳	۰/۷

* اعداد برجسته شده در قطر ماتریس فاصله درون گونه‌ای را نشان می‌دهند



شکل ۶- درخت تبارزادی بیشینه درست‌نمایی بر اساس داده‌های ژن میتوکندریایی CO1، اعداد روی هر شاخه بیانگر مقادیر bootstrap می‌باشند

شرایط تغذیه‌ای یکسانی برخوردار بودند، اشاره کرده‌اند (۴۲).

در این پژوهش، بررسی ۳۰ قطعه عکس از ساختار رادولای *C. karachiensis* به وسیله میکروسکوپ SEM در مقیاس‌های ۲۰۰ و ۵۰۰ میکرومتر نشان دهنده جایگاه مشخص دندان‌ها و ابعاد آنها می‌باشد. ولی تنوع رادولا در گونه‌های یک جنس در فراساختارهایی همچون ابعاد مختلف دندان‌ها قرار دارد که بررسی آنها نیاز به عکس‌هایی با وضوح بالا دارد و توصیه می‌شود دندان‌های مرکزی، کناری و حاشیه‌ای جهت اندازه‌گیری دقیق‌تر، قبل از عکس‌برداری از یکدیگر جدا شده و با انجام محاسبات آماری به بیان دقیق تفاوت میان آنها پرداخته شود (۱۷)، ۲۳ و ۳۶).

بهره‌برداری از منابع تغذیه‌ای مشخص توسط جانوران در هر یک از محیط‌ها منجر به تکامل ساختارها و مکانیسم‌های تغذیه‌ای مختلف، از جمله رادولا شده است. با توجه به رژیم غذایی و نیاز جانور، ساختار رادولا در شکم‌پایان نیز متفاوت بوده و ابعاد و اشکال مختلف دندان‌های رادولا عملکرد خاص خود را دارند. مطالعات اولیه پیرامون رادولا نیز بیانگر این است که ساختار رادولا حتی در گونه‌های مختلف یک جنس نیز دارای تفاوت است و بنابراین می‌تواند در تفکیک گونه‌های یک جنس مورد استفاده قرارگیرد (۲۵ و ۳۳) و از این رو در مطالعات آرایه‌شناختی و تبارزادی از اهمیت بالایی برخوردار است (۸). از طرف دیگر برخی از مطالعات نیز به شکل‌پذیری اندام رادولا و تشکیل دندان‌های مشابه در گونه‌های یک جنس که از

گرفته بر روی ۱۸ گونه از این جنس با استفاده از داده‌های دو ژن مذکور و همچنین ژن COI (۳۸)، نشان می‌دهد که گونه‌های نیوزلند و استرالیا، گروه اصلی در جنس *Cellana* بودند. این مساله با تجزیه و تحلیل ۲۳ نمونه از این گونه‌ها و با استفاده از ژن‌های COI و هیستونی هسته H3 نیز پشتیبانی شد (۳۹). مطالعات مولکولی در جنس *Cellana* اخیراً توسط چند محقق منتشر شده است (۶، ۷، ۱۵ و ۴۰). جهت مطالعه منشا تمامی گونه‌ها و همچنین زیرگونه‌های شناخته شده *Cellana* در نیوزلند، ژن‌های 12S rRNA و 16S rRNA مورد بررسی قرار داده شد (۱۴).

مطالعه حاضر با استفاده از داده‌های ژن میتوکندریایی COI نشان داد که نمونه‌های ۱، ۳، ۵، ۶، ۷ و ۸ متعلق به گونه *C. karachiensis* می‌باشند. براساس هر دو درخت تبارزادی بیشینه درست‌نمایی و Bayesian در این مطالعه، نمونه‌های مذکور متعلق به کلاد *C. karachiensis* و کلاد خواهری گونه *C. rota* می‌باشند (شکل‌های ۵ و ۶). کلاد شامل هر دو گونه *C. karachiensis* و *C. rota*، کلاد خواهری گونه *C. pricei* می‌باشد. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد آرایش هر دو درخت Bayesian و بیشینه درست‌نمایی، تا حد بسیار زیادی با هم مطابقت دارد، ولی تفاوت‌هایی نیز بین آرایش مربوط به هر دو درخت تبارزادی مشاهده می‌شود. مهم‌ترین تفاوت مشاهده شده مربوط به جایگاه آرایه-شناختی کلاد شامل سه گونه *C. solida*، *C. tramoserica* و *C. testudinaria* می‌باشد. براساس درخت Bayesian کلاد شامل سه گونه ذکر شده، کلاد خواهری سه گونه *C. karachiensis*، *C. rota* و *C. pricei* می‌باشد ولی این جایگاه از حمایت بالایی برخوردار نیست. بر اساس درخت بیشینه درست‌نمایی کلاد مذکور، کلاد خواهری گونه‌های *C. flava*، *C. ardosiaea*، *C. radians*، *C. strigilis* و *C. denticulata* می‌باشد، ولی این جایگاه نیز از حمایت پایینی برخوردار است. در کل موقعیت آرایه‌شناختی این کلاد مورد سوال است و احتمال می‌رود با استفاده از داده‌های مولکولی بیشتر، مانند داده‌های

خواص مکانیکی دندان‌ها بیشتر تحت تاثیر اندازه، شکل، مواد تشکیل دهنده، خواص مواد غذایی و فعل و انفعالات میان دندان‌ها در طول تغذیه می‌باشد که تعیین کننده نیاز هرگونه به رادولای خاص می‌باشد. نوع رادولا به‌عنوان یک ابزار تغذیه‌ای مهم شناخته شده است. شکل دندان‌ها و برآمدگی‌های آن در ساختارهای مختلف رادولا نشان دهنده عملکرد متفاوت آن در گروه‌های مختلف با رژیم غذایی متفاوت می‌باشد که می‌تواند باعث ایجاد قابلیت‌ها و محدودیت‌های تغذیه‌ای در شکم‌پایان شده و به تفسیر چگونگی تعامل گونه‌هایی با رژیم غذایی مشابه بدون رقابت برای حذف یکدیگر کمک کند. نوع رادولا و تعداد دندان‌های آن نشان دهنده تکامل در تغذیه شکم‌پایان از گیاهخواری به گوشتخواری است. به‌طور کلی شکم‌پایان جهت تراشیدن جلبک به دندان‌های بسیار و گوشتخواران به دندان‌های کمتر، به‌خصوص دندان‌های جانبی و حاشیه‌ای نیاز دارند. گونه *C. karachiensis* گیاه‌خوار بوده و دارای دندان‌های بسیاری است که عموماً جهت تراش اجتماعات جلبکی بر روی صخره‌های صیقلی نواحی جزر و مدی به‌کار گرفته می‌شوند.

مطالعات مولکولی: خانواده Nacellidae شامل گونه‌های گرمسیری (*Cellana*)، سردسیری (*Nacella*) و احتمالاً گونه اندمیک استرالیا (*Naccula*) است. گونه‌های *Cellana* در حال حاضر به‌طور گسترده‌ای در غرب حوضه آرام-هند توزیع شده و بیشترین تنوع را در استرالیا نشان می‌دهد. *Naccula* به استرالیای جنوبی محدود می‌شود. تنها بررسی‌های تبارزادی این خانواده مربوط به مطالعه (۴۴) می‌باشد. باتوجه به آخرین گزارشات، *Nacella* شامل ۱۵ گونه است در حالی که *Cellana* شامل ۳۷ گونه و زیرگونه می‌باشد.

مطالعات تبارزادی انجام شده بر روی ۵ گونه از جنس *Cellana* با استفاده از داده‌های دو ژن 12S rRNA و 16S rRNA (۲۷ و ۳۷) و همچنین مطالعه تبارزادی صورت

عامل زیست جغرافیایی پراکندگی در الگوی پراکنش این گونه نقش داشته است. گونه *C. ardosiaea* در سواحل جزایر کشور شیلی پراکنش دارد که با محدوده پراکنش گونه *C. karachiensis* فاصله جغرافیایی بسیار زیادی را دارا می‌باشد. این مساله می‌تواند احتمالاً بیانگر نقش فاصله جغرافیایی در ایجاد جدایی و واگرایی ژنتیکی باشد. با توجه به این که غالباً گونه‌هایی که فاصله ژنتیکی کمتری را دارا می‌باشند از نظر جغرافیایی نیز به یکدیگر نزدیکتر و گونه‌هایی که فاصله ژنتیکی زیادی دارند، فاصله جغرافیایی زیادی را نیز دارا هستند. در تایید این موضوع می‌توان به دو گونه *C. strigilis* و *C. denticulate* اشاره کرد. این دو گونه هر دو در سواحل کشور نیوزیلند پراکنش دارند و فاصله جغرافیایی کمی با یکدیگر دارند. فاصله ژنتیکی بین این دو گونه کمترین میزان فاصله ژنتیکی بین گونه‌ای در این مطالعه و برابر با ۳ درصد می‌باشد. همچنین فاصله ژنتیکی بین دو گونه *C. strigilis* و *C. denticulate* برابر با ۳ درصد می‌باشد که این نتیجه، نتایج درخت‌های تبارزادی مبنی بر روابط نزدیک بین این دو گونه را مورد تایید قرار می‌دهد. همچنین میزان فواصل ژنتیکی درون گونه‌ای نیز بین صفر تا ۱ درصد متغیر می‌باشد که بیشترین میزان فاصله ژنتیکی درون گونه‌ای مربوط به گونه *C. ardosiaea* می‌باشد (جدول ۶). محاسبه فواصل ژنتیکی درون گونه‌ای برای برخی از گونه‌ها به علت وجود تنها یک توالی از آن‌ها در بانک ژن مقدور نبود.

نتایج مطالعه مولکولی انجام شده براساس داده‌های ژن COI، با نتایج مطالعات ریخت‌شناختی مطابقت نشان می‌دهد و تعلق نمونه‌های مورد مطالعه را به گونه *C. karachiensis* را مورد تایید قرار می‌دهد. نتایج فوق بیانگر اهمیت انجام مطالعات دقیق بر روی شناسایی گونه‌های زیررده *Patellogastropoda* با استفاده از ابزارهای مختلف ریختی و مولکولی همچون ساختار رادولا و توالی COI در کنار صفات ظاهری پوسته و پا می‌باشد.

ژن هسته‌ای و نیز سایر داده‌های ژن میتوکندری، جایگاه آرایه‌شناختی این کلاد بهتر مشخص شود. تفاوت دیگر در بین دو درخت تبارزادی، مربوط به کلاد شامل دو گونه *C. strigilis* و *C. denticulate* می‌باشد. در درخت Bayesian این دو گونه، دو کلاد مجزا را تشکیل می‌دهند، ولی در درخت بیشینه درست‌نمایی، هرچند در بین این دو گونه واگرایی ژنتیکی مشاهده می‌شود، ولی هر دو گونه درون یک کلاد قرار می‌گیرند. با توجه به روابط تبارزادی این دو گونه و همچنین فاصله ژنتیکی پایین بین این دو گونه (جدول ۶)، این احتمال می‌رود که این دو گونه به تازگی از یکدیگر اشتقاق یافته باشند و هنوز در مراحل اولیه انشعاب باشند. براساس هر دو درخت تبارزادی جایگاه کلاد مربوط به این دو گونه، به عنوان کلاد خواهری گونه‌های *C. flava*، *C. ardosiaea*، *C. radians*، *C. stellifera* می‌باشد. استفاده از داده‌های مولکولی بیشتر می‌تواند روابط تبارزادی این دو گونه را نیز بهتر مشخص کند.

محاسبه فواصل ژنتیکی حاصل از توالی‌های ژن COI، نشان می‌دهد که فاصله ژنتیکی در میان نمونه‌های مورد بررسی بین ۰/۱ تا ۲۰/۳ درصد متغیر می‌باشد. کمترین میزان فاصله ژنتیکی بین نمونه‌های مورد مطالعه و گونه *C. karachiensis* و بیشترین فاصله ژنتیکی نیز بین نمونه‌های مورد مطالعه و گونه *C. ardosiaea* و پس از آن بین دو گونه *C. karachiensis* و *C. ardosiaea* (۲۰/۲ درصد) مشاهده می‌شود. تمامی نمونه‌های متعلق به گونه *C. karachiensis* در محدوده جغرافیایی خلیج فارس، دریای عمان و سواحل غربی هند واقع در اقیانوس هند، پراکنش دارند. نمونه‌های مورد مطالعه از نظر جغرافیایی، فاصله کمتری را با نمونه‌های گونه *C. karachiensis*، در مقایسه با سایر گونه‌های این جنس دارا هستند. محدوده پراکنش جغرافیایی گونه *C. karachiensis* یک محدوده از سواحل به هم پیوسته است که نمونه‌های مورد مطالعه در نواحی میانی این محدوده جغرافیایی قرار می‌گیرند. احتمال می‌رود

منابع

- ۱- بیرامی، ن.، سیف‌آبادی، ج.، و علوی یگانه، ص.، ۱۳۹۵. شناسایی ریختی گونه‌های جنس *Nerita* رده شکم‌پایان. خانواده Neritidae در ناحیه جزرومدی بندرلنگه، فصلنامه علمی پژوهشی محیط زیست جانوری، سال هشتم، شماره ۳، صفحات ۸۷-۹۲.
- ۲- حسین‌زاده صحافی، ه.، دقوقی، ب.، و رامشی، ح.، ۱۳۷۹. اطلس نرم‌تنان خلیج فارس، انتشارات موسسه تحقیقات شیلات ایران، تهران، ۲۴۸ صفحه.
- 3- عیسی‌پور، م.، سیف‌آبادی، ج.، دقوقی، ب.، ۱۳۹۴ (الف). ساختار رادولا در دو گونه شکم‌پای خلیج فارس، *Conomurex mauritia grayana* و *persicus* (Strombidae) (Cypraeidae)، فصلنامه علمی پژوهشی علوم و فنون شیلات، جلد ۴، شماره ۱، صفحات ۱۱۵-۱۱۸.
- ۴- عیسی‌پور، م.، سیف‌آبادی، ج.، و دقوقی، ب.، ۱۳۹۴ (ب). مقایسه ریخت‌شناسی رادولا در دو گونه شکم‌پای *Conus textile* و *coronatus* از خانواده Conidae. اقیانوس‌شناسی، جلد ۶، شماره ۲۲، صفحات ۷۷-۸۲.
- 5-Asgari, M., Amini Yekta, F., and Izadi, S., 2012. Dominant Intertidal Crustacean and Gastropod Species in Qeshm Island, Iran, Northern Persian Gulf, Marine Biodiversity Records, 5, e87 p.
- 6-Ayre, D. J., Minchinton, T. E., and Perrin, C., 2009. Does Life History Predict Past and Current Connectivity for Rocky Intertidal Invertebrates across a Marine Biogeographic Barrier, Molecular Ecology, 18(9), PP: 1887-1903.
- 7-Bird, C. E., Holland, B. S., Bowen, B. W., and Toonen, R. J., 2007. Contrasting Phylogeography in Three Endemic Hawaiian Limpets (*Cellana* spp.) with Similar Life Histories, Molecular Ecology, 16(15), PP: 3173-3186.
- 8-Christiaens, J., 1973. Révision du Genre *Patella* (Mollusca, Gastropoda), Muséum National d'Histoire Naturelle, 3(82), PP: 1305-1392.
- 9-Cruz, R., Lins, U., and Farina, M., 1998. Minerals of the Radular Apparatus of *Falciidens* sp. (*Caudofoveata*) and the Evolutionary Implications for the Phylum Mollusca, The Biological Bulletin, 194(2), PP: 224-230.
- 10-Eisapour, M., Seyfabadi, S. J., and Daghooghi, B., 2015. Comparative Radular Morphology in some Intertidal Gastropods along Hormozgan Province, Iran, Journal of Aquaculture Research and Development, 4(6) p.
- 11-El-Sorogy, A., Youssef, M., Al-Kahtany, K., and Al-Otaiby, N., 2016. Distribution of Intertidal Molluscs along Tarut Island Coast, Arabian Gulf, Saudi Arabia, Pakistan, Journal of Zoology, 48(3), PP: 611-623.
- 12-Folmer, R. H. A., Nilges, M., Folkers, P. J. M., Konings, R. N. H., and Hilbers, C. W., 1994. A Model of the Complex between Single-Stranded DNA and the Single-Stranded DNA Binding Protein Encoded by Gene V of Filamentous Bacteriophage M13, Journal of Molecular Biology, 240(4), PP: 341-357.
- 13-Franklin, J. B., Fernando, S. A., Chalke, B. A., and Krishnan, K. S., 2007. Radular Morphology of *Conus* (Gastropoda: Caenogastropoda: Conidae) from India, Molluscan Research, 27(3), PP: 111-122.
- 14-Goldstien, S. J., Gemmell, N. J., and Schiel, D. R., 2006(a). Molecular Phylogenetics and Biogeography of the Nacellid Limpets of New Zealand (Mollusca: Patellogastropoda), Molecular Phylogenetics and Evolution, 38(1), PP: 261-265.
- 15-Goldstien, S. J., Schiel, D. R., and Gemmell, N. J., 2006(b). Comparative Phylogeography of Coastal Limpets across a Marine Disjunction in New Zealand, Molecular Ecology, 15(11), PP: 3259-3268.
- 16-Hall, T. A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, In Nucleic acids symposium series, 41(41), PP: 95-98.
- 17-Harding, J. M., Gera, S. M., and Mann, R., 2008. Radula Morphology in Veined Rapa Whelks, *Rapana venosa* (Valenciennes, 1846) (Gastropoda: Muricidae) from Chesapeake Bay, USA, Nautilus, 122(4), PP: 217-227.
- 18-Hebert, P. D., Ratnasingham, S., and De Waard, J. R., 2003. Barcoding Animal Life: Cytochrome C Oxidase Subunit 1 Divergences among Closely Related Species, Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 270(1), PP: S96-S99.
- 19-Hebert, P. D., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H., and Hallwachs, W., 2004. Ten Species in One: DNA Barcoding Reveals Cryptic

- Species in the Neotropical Skipper Butterfly *Astrartes fulgurator*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101(41), PP: 14812-14817.
- 20-Holford, M., Puillandre, N., Terryn, Y., Cruaud, C., Olivera, B., and Bouchet, P., 2009. Evolution of the *Toxoglossa venom* Apparatus as Inferred by Molecular Phylogeny of the Terebridae, Molecular Biology and Evolution, 26(1), PP: 15-25.
- 21-Houbrick, R. S., 1988. Cerithioidean Phylogeny, Malacological Review Supplement, 4, PP: 88-128.
- 22-Jamieson, B. G. M., Hodgson, A. N., and Bernard, R. T. F., 1991. Phylogenetic Trends and Variation in the Ultrastructure of the Spermatozoa of Sympatric Species of South African Patellid Limpets (Archaeogastropoda, Mollusca), Invertebrate Reproduction and Development, 20(2), PP: 137-146.
- 23-Jørgensen, A., 2001. Variation in Radular Teeth and Acuspid side of the Radula in *Lacuna pallidula*, *L. parva* and *L. vincta* (Gastropoda: Littorinidae) from the Isle of Wight, United Kingdom. Helgoland Marine Research, 55(2), 95 p.
- 24-Kantor, Y. I., and Taylor, J. D., 2000. Formation of Marginal Radular Teeth in Conoidea (Neogastropoda) and the Evolution of the Hypodermic Envenomation Mechanism, Journal of Zoology, 252(2), PP: 251-262.
- 25-Kantor, Y. I., 2006. On the Morphology and Homology of the "Central Tooth" in the Radulae of Turrinae (Conoidea: Turridae), Ruthenica, 16(1-2), PP: 47-52.
- 26-Kool, S. P., 1993. The Systematic Position of the Genus *Nucella* (Prosobranchia: Muricidae: Ocenebrinae), The Nautilus, 107(2), PP: 43-57.
- 27-Koufopanou, V., Reid, D. G., Ridgway, S. A., and Thomas, R. H., 1999. A Molecular Phylogeny of the Patellid Limpets (Gastropoda: Patellidae) and its Implications for the Origins of their Antitropical Distribution, Molecular Phylogenetics and Evolution, 11(1), PP: 138-156.
- 28-Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., and Tamura, K., 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms, Molecular Biology and Evolution, 35(6), PP: 1547-1549.
- 29-Kumbhar, J. V., and Rivonker, C. U., 2012. A New Record of *Morulaanaxares* with a Description of the Radula of Three Other Species from Goa, Central West Coast of India (Gastropoda: Muricidae), Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 12(1), PP: 189-197.
- 30-Lakra, W. S., Goswami, M., and Gopalakrishnan, A., 2009. Molecular Identification and Phylogenetic Relationships of Seven Indian Sciaenids (Pisces: Perciformes, Sciaenidae) Based on 16S rRNA and Cytochrome C Oxidase Subunit I Mitochondrial Genes, Molecular Biology Reports, 36(5), PP: 831-839.
- 31-Lindberg, D. R., 1988. The Patellogastropoda, Malacological Review Supplement, 4, PP: 35-63.
- 32-McCarthy, C., 1996. Chromas Version 1. 45., School of Health SCIENCE, Griffith University, Gold Coast Campus, Queensland, Australia.
- 33-Mclean, J. H., 2011: Reinstatement of the Fissurellid Subfamily Hemitominae, with the Description of New Genera, and Proposed Evolutionary Lineage, Based on Morphological Characters of Shell and Radula (Gastropoda: Vetigastropoda), Malacologia, Vol, 54(2), PP: 407-427.
- 34-Miller, S. L., 1974. The Classification, Taxonomic Distribution, and Evolution of Locomotor Types among Prosobranch Gastropods, Journal of Molluscan Studies, 41(3), PP: 233-261.
- 35-Moritz, C., and Cicero, C., 2004. DNA Barcoding: Promise and Pitfalls, PLoS Biology, 2(1), PP: 1529-1531.
- 36-Mutaf, B. F., and Aksit, D., 2009. Further SEM Assessment of Radular Characters of the Limpets *Patella caerulea* Linnaeus 1758 and *P. rustica* Linnaeus 1758 (Mollusca: Gastropoda) from Antalya Bay, Turkey, Turkish Journal of Zoology, 33(3), PP: 359-365.
- 37-Nakano, T., and Ozawa, T., 2004. Phylogeny and Historical Biogeography of Limpets of the Order Patellogastropoda Based on Mitochondrial DNA Sequences, Journal of Molluscan Studies, 70(1), PP: 31-41.
- 38-Nakano, T., and Ozawa, T., 2007. Worldwide Phylogeography of Limpets of the Order Patellogastropoda: Molecular, Morphological and Palaeontological Evidence, Journal of Molluscan Studies, 73(1), PP: 79-99.
- 39-Nakano, T., Yazaki, I., Kurokawa, M., Yamaguchi, K., and Kuwasawa, K., 2008. The Origin of the Endemic Patellogastropod Limpets of the Ogasawara Islands in the Northwestern Pacific, Journal of Molluscan Studies, 75(1), PP: 87-90.

- 40-Nakano, T., Marshall, B. A., Kennedy, M., and Spencer, H. G., 2009. The Phylogeny and Taxonomy of New Zealand *Notoacmea* and *Patelloida* species (Mollusca: Patellogastropoda: Lottiidae) Inferred from DNA Sequences, *Molluscan Research*, 29(1), 33 p.
- 41-Nakano, T., and Sasaki, T., 2011. Recent Advances in Molecular Phylogeny, Systematics and Evolution of Patellogastropod Limpets, *Journal of Molluscan Studies*, 77(3), PP: 203-217.
- 42-Padilla, D. K., 1998. Inducible Phenotypic Plasticity of the Radula in *Lacuna* (Gastropoda: Littorinidae), *The Veliger*, 41, PP: 201-204.
- 43-Posada, D., and Crandall, K. A., 1998. Modeltest: Testing the Model of DNA Substitution. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 14(9), PP: 817-818.
- 44-Powell, A. W. B., 1973. The Patellid Limpets of the World (Patellidae), *Indo-Pacific Mollusca*, 3, PP: 75-206.
- 45-Reisser, C. M. O., Marshall, B. A., and Gardner, J. P. A., 2012. A Morphometric Approach Supporting Genetic Results in the Taxonomy of the New Zealand Limpets of the *Cellana strigilis* Complex (Mollusca: Patellogastropoda: Nacellidae), *Invertebrate Systematics*, 26(2), PP: 193-203.
- 46-Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., and Huelsenbeck, J. P., 2012. MrBayes 3.2, Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space, *Systematic Biology*, 61(3), PP: 539-542.
- 47-Sambrook, J., Russell, D. W., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, PP: 7.42-7.45 and 17.48-17.51.
- 48-Scheltema, A. H., Kerth, K., and Kuzirian, A. M., 2003. Original Molluscan Radula: Comparisons among Aplacophora, Polyplacophora, Gastropoda, and the Cambrian Fossil *Wiwaxia corrugata*, *Journal of Morphology*, 257(2), PP: 219-245.
- 49-Scuderi, D., and Eernisse, D. J., 2016. A New Alien Limpet for the Mediterranean: *Lottia* sp. (Patellogastropoda: Lottiidae), *Biodiversity Journal*, 7(2), PP: 287-293.
- 50-Silvestro, D., and Michalak, I., 2012. Raxmlgui: A Graphical Front-End for RAXML, *Organisms Diversity and Evolution*, 12(4), PP: 335-337.
- 51-Strong, E. E., Gargominy, O., Ponder, W. F., and Bouchet, P., 2008. Global Diversity of Gastropods (Gastropoda: Mollusca) in Freshwater: In *Freshwater Animal Diversity Assessment*, Springer Netherlands, 595(1), PP: 149-166.
- 52-Taggart, J. B., Hynes, R. A., Prodöuhl, P. A., and Ferguson, A., 1992. A Simplified Protocol for Routine Total DNA Isolation from Salmonid Fishes, *Journal of Fish Biology*, 40(6), PP: 963-965.
- 53-Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic acids research*, 22(22), PP: 4673-4680.
- 54-Valdovinos, C., and Ruth, M., 2005. Nacellidae Limpets of the Southern End of South America: Taxonomy and Distribution, *Revista Chilena de Historia Natural*, 78(3), PP: 497-517.
- 55-Ward, R. D., Zemlak, T. S., Innes, B. H., Last, P. R., and Hebert P. D., 2005. DNA Barcoding Australia's Fish Species, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462), PP: 1847-1857.
- 56-Willassen, E., Williams, A. B., and Oskars, T. R., 2016. New Observations of the Enigmatic West African *Cellana* Limpet (Mollusca: Gastropoda: Nacellidae), *Marine Biodiversity Records*, 9(1), 60 p.

Species Identification of Nacellidae Thiele, 1891 Family in Hormuz Island (Persian Gulf)

Maysoori Z., Ghodrati Shojaee M. and Seyfabadi J.

Dept. of Marine Biology, Faculty of Natural Resources and Marine Science, Tarbiat Modares University, Noor, I.R. of Iran

Abstract

Gastropods are the largest group of molluscs, with the highest abundance and habitats diversity. The species diversity of true limpets (Nacellidae) in Hormuz Island was investigated by collecting 121 specimens belonging to this family from two stations in the intertidal zone in fall and winter 2016 and 2017. Morphological studies were carried out on the basis of shell morphological characteristics, foot color, radula structure. Besides, the molecular study was also performed using the cytochrome oxidase c subunit 1 (CO1) of the mitochondrial gene. The results of morphological studies indicate that all the specimens, despite having different phenotypes and differences in pattern and color of the shell traits, belonged to *Cellana karachiensis* which was also confirmed by the molecular finding. Therefore, the results of this study show various phenotypes for *C. karachiensis*, which also cast doubt on the taxonomic value for identification of this family, based on the color pattern, shell and radula traits.

Keywords: Patellogastropoda, Limpet, Radula, Hormuz Island