

## بازنگری وضعیت تاکسونومی دلفین گوژپشت خلیج فارس (Cetacea:Delphinidae)

### *Sousa plumbea* با استفاده از ژن میتوکندریایی D-LOOP

مرضیه انصاری نژاد<sup>۱</sup>، عدنان شهدادی<sup>۱</sup>، مژده رام<sup>۲</sup> و محمدشریف رنجبر<sup>۱\*</sup>

<sup>۱</sup> ایران، بندرعباس، دانشگاه هرمزگان، دانشکده علوم و فنون دریایی، گروه زیست‌شناسی دریا

<sup>۲</sup> ایران، بندرعباس، اداره کل حفاظت محیط زیست هرمزگان، بانک ژن

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۱/۰۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۷/۱۲

#### چکیده

در این مطالعه به بررسی تبارزادی دلفین گوژپشت آب‌های جنوبی ایران (خلیج فارس و دریای عمان) با استفاده از ژن میتوکندریایی D-LOOP پرداخته شد. تعداد چهار توالی D-LOOP از چهار نمونه دلفین گوژپشت آب‌های ایران بدست آمد و نتایج با توالی‌های قبلاً منتشر شده در بانک ژن مقایسه شد. آنالیزهای تبارزادی با ترسیم درخت‌های حداکثر احتمال (ML) و استنباط بیزین (BI) و همچنین شبکه هاپلوتایپی صورت گرفت. نتایج مطالعه حاضر نشان داد همه نمونه‌های ایرانی در یک کلاد حفاظت شده با توالی‌های هند با ارزش بوت استرپ ۹۸ در درخت ML و احتمال پسین ۱ در درخت BI قرار گرفتند. این کلاد شامل نمونه‌های ایران و هند به همراه نمونه‌های گونه *Sousa plumbea* از غرب آفریقا در یک خوشه حفاظت شده قرار گرفتند. این یافته‌ها نشان می‌دهد که دلفین‌های گوژپشت ایرانی بر خلاف آنچه تاکنون گزارش می‌شده متعلق به گونه *S. chinensis* نیست و به همراه نمونه‌های هندی و آفریقای جنوبی متعلق به گونه *S. plumbea* می‌باشد. به هر حال اما جهت ارزیابی دقیق‌تر تبارزادی و وضعیت طبقه‌بندی نمونه‌های ایران، بررسی‌های دقیق‌تر ریخت‌سنجی و استفاده از سایر نشانگرهای میتوکندریایی و همچنین هسته‌ای پیشنهاد می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: منطقه هند و اقیانوس آرام، *Sousa plumbea*، ایران، قشم، جاسک

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۷۶۳۳۷۱۱۰۲۵، پست الکترونیکی: sharif.ranjbar@hormozgan.ac.ir

#### مقدمه

محکمی مبنی بر وجود چهار گونه را در اختیار قرار می‌دهد (۱ و ۱۵). این چهار گونه شامل: ۱- *S. teuszii* (دلفین گوژپشت اقیانوس اطلس) که با رنگ یکنواخت و یک کوهان اصلی در پشت خود دارد و در اقیانوس اطلس شرقی در امتداد ساحل غربی آفریقا یافت می‌شود. ۲- گونه-ی *S. plumbea* (دلفین گوژپشت اقیانوس هند) شباهت ظاهری زیادی به *S. teuszii* دارد با این تفاوت که باله‌های تیزتری دارد. این گونه در غرب اقیانوس هند، از آفریقای جنوبی تا میانمار زندگی می‌کند. ۳- گونه‌ی *S. chinensis* (دلفین گوژپشت اقیانوس هند - آرام) گونه‌ای که باله‌های

دلفین‌های گوژپشت جنس *Sousa* از زیر خانواده دلفین‌ها (Delphininae) پراکنش جغرافیایی وسیعی در آب‌های اقیانوس اطلس شرقی (غرب آفریقا)، اقیانوس هند و اقیانوس آرام غربی دارند (۱۵). اما وضعیت طبقه‌بندی و سیستماتیک جنس *Sousa* همچنان حل نشده و ابهام‌آمیز باقی مانده است و تعداد گونه‌های این جنس هنوز به درستی مشخص نیست.

یک بررسی جامع و گسترده در بازنگری جنس *Sousa*، از جمله بررسی ساختار ریخت‌سنجی اسکلتی، ریخت‌سنجی خارجی، رنگ، ژنتیک مولکولی و جغرافیای زیستی شواهد

طبقه بندی جنس *Sousa* به چهار گونه، که برای اولین بار توسط Mendez و همکاران در سال ۲۰۱۳ پیشنهاد شده است، به سرعت مورد استقبال و تصویب کمیته شناسایی پستان‌داران دریایی (Marine Mammology's Ad Hoc Committee on Taxonomy 2014) قرار گرفت و امروزه مورد توجه بسیاری مسئولان جهانی در زمینه طبقه بندی پستان‌داران دریایی می‌باشد (۱، ۱۵ و ۲۰).

دلفین‌های گوژپشت در آب‌های کم عمق ساحلی و به‌طور کلی در نزدیکی ورودی‌های آب شیرین به صورت دسته-جمعی دیده می‌شوند. با توجه به این که در مناطق ساحلی حضور دارند، از بین رفتن زیستگاه‌ها، برخورد با شناورها و آلودگی‌های مختلف از منابع مهم آسیب به این گونه است. دو گونه *S. plumbea* و *S. chinensis* مطابق معیارهای فهرست قرمز IUCN به عنوان گونه‌های آسیب‌پذیر شناخته می‌شوند (۱، ۳ و ۱۷).

دلفین گوژپشت آب‌های ایران عمدتاً به رنگ خاکستری و با باله پشتی می‌باشد که از نظر ریخت‌سنجی با توصیفات *S. plumbea* در مطالعه (۲۶) مطابقت بیشتری دارد. این گونه در ایران با نام علمی *S. chinensis* گزارش شده است (۲). مطالعاتی که تاکنون بر روی دلفین گوژپشت ایران انجام شده، بیشتر بر اساس شواهد ریخت‌سنجی بوده است. در تحقیقاتی (۲ و ۲۳) که با استناد به مطالعات تاکسونومیک (۱۴ و ۲۶) و مبنی بر خصوصیات ریخت‌سنجی و مشاهدات ثبت شده از این گونه در آب‌های ایران صورت گرفته، بیان شد و با توجه به روشن نشدن وضعیت رده بندی جنس *Sousa* و تا زمان مشخص شدن وضعیت طبقه بندی گونه *S. plumbea*، دلفین گوژپشت ایران به عنوان *S. chinensis* معرفی می‌شود. با این اوصاف به جز مشاهدات و شواهد میدانی، هیچ شواهد قانع‌کننده‌ای مبنی بر وجود *S. chinensis* در آب‌های ایران وجود ندارد، از این رو روشن شدن وضعیت طبقه بندی و تبارزادی دلفین گوژپشت آب‌های ایران بسیار مهم است.

تیزتری دارند، فاقد کوهان و رنگ نمونه بالغ سفید است. دلفین گوژپشت اقیانوس هند - آرام، در اقیانوس آرام غربی و احتمالاً تا شرق اقیانوس هند تا میانه‌های چین و جنوب شرقی آسیا گسترش می‌یابد. ۴- *S. sahalensis* (دلفین گوژپشت استرالیا) که ظاهراً محدود به آب‌های استرالیا و گینه نو است. این گونه باله‌ی پشتی کوتاه‌تر و رنگ تیره‌تری دارد و دارای دماغه‌ی پشتی می‌باشد (۱۵، ۲۰ و ۲۴). مطالعات (۱۶ و ۱) اخیراً، شواهدی مبنی بر وجود گونه پنجم نیز از خلیج بنگال ارائه داده است. به طور کلی مقالات مروری که در دهه ۱۹۰۰ ارائه شده‌اند، وجود این گونه‌ها را تایید نکردند و فقط سه گونه *S. sahalensis*، *S. chinensis* و *S. plumbea* معتبر شناخته شدند (۱۶). در تحقیقات بعدی Frere و همکاران در سالهای ۲۰۰۸ و ۲۰۱۱ که با استفاده از DNA میتوکندریایی و نشانگرهای هسته‌ای انجام شد، تعداد کلادهای بدست آمده برای گونه‌های جنس *Sousa*، نمایان‌گر وجود واحدهای ژنتیکی متعدد در سطح گونه بود و نشان داد که بازبینی رده‌بندی این گونه‌ها ضروری است (۸ و ۹). Fraser (1966) تاکید کرد که باید جنس *Sousa* بازبینی شود، اما گونه‌های مورد نیاز برای این کار در دسترس نبودند (۱۵). اهمیت بازبینی در تاکسونومی و طبقه بندی گونه‌های جنس *Sousa* تا سال ۲۰۱۳ ادامه داشت. Mendez و همکاران در مطالعه‌ای که با تجزیه و تحلیل ترکیبی از داده‌های ژنتیکی میتوکندریایی و هسته‌ای و ریخت‌سنجی انجام دادند، الگوهای جغرافیایی جالب توجهی را یافتند. نتایج نشان دهنده اختلاف بین الگوهای ریخت‌سنجی شناخته شده و داده‌های مولکولی بودند و شواهد متقاعدکننده‌ای برای طبقه‌بندی دلفین‌های گوژپشت با حداقل چهارگونه را برای اولین بار ارائه دادند (۲۰). آنها همچنین با اطمینان از نظریه‌ی تفاوت دلفین‌های استرالیایی با گونه‌های معتبر آن زمان *Sousa*، حمایت کردند، که بعداً تحت عنوان *S. sahalensis* در مطالعه (۱۵) توصیف شده‌اند.

بانک ژن اداره کل حفاظت محیط زیست هرمزگان نگه-داری شدند.

بعد از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه جهت بررسی ژنتیکی، DNA به روش استاندارد فنل - کلروفرم استخراج گردید (۲۷). کیفیت باند DNA استخراجی هر نمونه با استفاده از الکتروفورز افقی روی ژل آگارز ۱ درصد در بافر TBE و رنگ آمیزی شده با Gel Red مورد بررسی قرار گرفت.

در این پژوهش از ژن میتوکندریایی D-LOOP استفاده شد که جهت تکثیر قطعاتی با اندازه تقریباً ۴۳۵ باز آلی برای ژن D-LOOP از پرایمرهای ارائه شده در جدول ۱ استفاده شد.

به منظور بر طرف شدن شکاف موجود در طبقه بندی گونه دلفین گوژپشت آب‌های ایران، جایگاه رده بندی و بررسی روابط تبارزادی با سایر گونه‌های جنس *Sousa* از مناطق مختلف جهان، در این مطالعه از توالی ژن میتوکندریایی D-LOOP استفاده شد. پژوهش حاضر اولین مطالعه در زمینه تبارزادی مولکولی دلفین گوژپشت آب‌های ایران است.

## مواد و روشها

در مجموع ۳ نمونه از دلفین گوژپشت در سواحل جزیره قشم و ۱ نمونه از دلفین گوژپشت در ساحل جاسک که به گل نشسته و تلف شده بودند بررسی شد. بافت‌های جمع آوری شده از نمونه‌ها در الکل ۹۶ درصد قرار داده شد و پس از انتقال در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد در آزمایشگاه

جدول ۱- نام و توالی پرایمرهای مورد استفاده

منبع	توالی پرایمر	نام پرایمر	نام ژن
Taberlet (32)	-5'CTCCACTATCAGCACCCAAAG-3'	L15995	D-LOOP
Fumagalli (10)	-5'CCTGAAGTAAGAACCAGATG-3'	H16498	D-LOOP

درصد ارزیابی گردید. تعیین توالی توسط شرکت Bioneer (کشور کره جنوبی) انجام شد.

جهت مقایسه و بررسی تبارزادی، سایر توالی‌های ثبت شده در بانک ژن NCBI مربوط به ژن D-LOOP از گونه‌های جنس *Sousa* دریافت و به داده‌ها اضافه شد (شماره‌ها در درخت‌های تبارشناسی قابل مشاهده است).

کروماتوگرام‌های حاصل از تعیین توالی با نرم‌افزار Chromas (v.2.1.1) ویرایش شدند. مناطق اولیه پرایمرها از کروماتوگرام‌ها حذف شدند.

هم ردیف سازی توالی‌ها با استفاده از الگوریتم ClustalW (۳۳) در نرم افزار BioEdit versio 7.0.5 (۱۱) انجام گرفت. ترازاها توسط برنامه FaBox (۳۴) آماده و جهت

برای تکثیر (PCR) ژن D-LOOP به وسیله دستگاه ترموسایکلر پس از بهینه سازی شرایط واکنش و انتخاب دمای مناسب، چرخه حرارتی متشکل از واسرشته شدن اولیه (Initial Denaturation) به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و به دنبال آن ۳۵ چرخه شامل، واسرشت سازی (Denaturation) با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، جهت اتصال آغازگر به DNA (Annealing) دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، و به منظور بسط (Extension) دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه و در نهایت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای بسط نهایی قطعات هدف انجام پذیرفت.

کیفیت محصول PCR با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱

فاصله ژنتیکی اصلاح شده (Kimura 2-Parameter, K2P) بین گونه‌ها برای توالی ژن D-LOOP با نرم افزار MEGA version 5.2.2 (۳۱) محاسبه شد.

شبکه هاپلوتایپی برای توالی‌های موجود ژن D-LOOP برای گونه‌های جنس *Sousa* از جمله توالی‌های ایرانی با استفاده از برنامه PopART vers. 1.7 (۱۹) ترسیم شد.

در مجموع در این پژوهش، ۲۵ توالی ثبت شده در بانک ژن NCBI از نقاط مختلف جهان و ۴ توالی مربوط به مطالعه حاضر برای ژن D-LOOP استفاده شد. گونه دلفین معمولی *Delphinus delphis* به عنوان Out Group انتخاب شد. اطلاعات تکمیلی نمونه‌ها در جدول شماره ۲ نشان داده شده است.

استفاده برای رسم درخت تبارشناسی و شبکه هاپلوتایپی به فرمت Nexus تبدیل شدند.

آنالیزهای تبارزادی با استفاده از روش‌های حداکثر احتمال (ML) (Maximum Likelihood) با نرم افزار raxmlGUL version 1.3 (۲۸) و آنالیز Bayesian Inference (BI) با نرم افزار MrBayes versio 3.2 (۱۲) انجام شد. درخت تبارزادی ML با تکرار بوت استرپ ۲۰۰۰ و مدل GTR+G و درخت BI با استفاده از مدل GTR+G و ۱۰۰۰۰۰۰ نسل اجرا شد. برای تعیین مدل تکاملی متناسب با داده از نرم افزار JModelTest v. 2.1.4 (۶) استفاده و از طریق آنالیز Akaike information criterion (۲۵) انتخاب گردید.

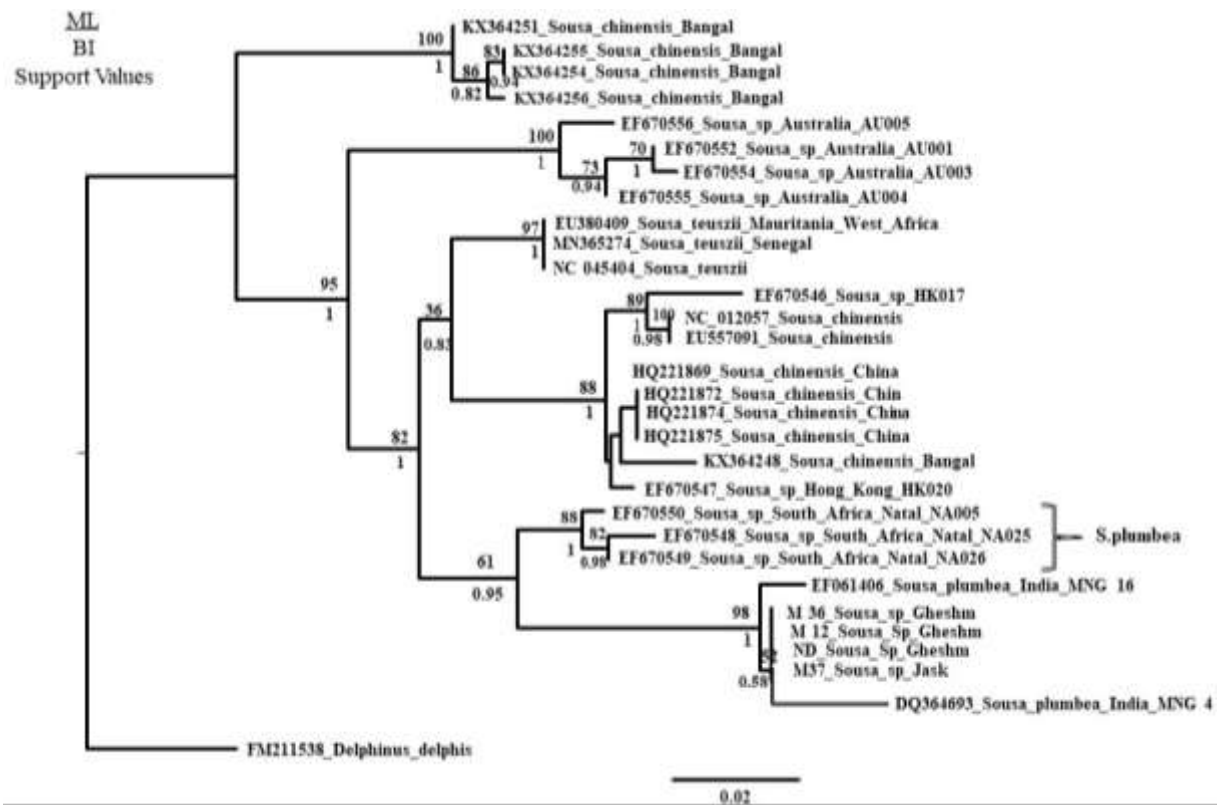
جدول ۲- توالی‌های مورد استفاده در آنالیز تبارزادی

Species	GenBank accession NO.D-LOOP	Reference	Locality
<i>Sousa</i> sp. (M12)		مطالعه حاضر	Iran-Gheshm
<i>Sousa</i> sp. (M36)		مطالعه حاضر	Iran-Gheshm
<i>Sousa</i> sp. (M37)		مطالعه حاضر	Iran-Jask
<i>Sousa</i> sp. (ND)		مطالعه حاضر	Iran-Gheshm
<i>Sousa</i> sp.	EF061406	Jayasankar (13), Chen (5)	India
<i>Sousa</i> sp.	DQ364693	Jayasankar (13), Chen (5)	India-Arabian sea
<i>S. plumbea</i>	EF670550	Frere (8), Chen (5)	South Africa-Natal
<i>S. plumbea</i>	EF670548	Frere (8), Chen (5)	South Africa-Natal
<i>S. plumbea</i>	EF670549	Frere (8), Chen (5)	South Africa-Natal
<i>S. chinensis</i>	EF670547	Frere (8), Chen (5)	Hong Kong
<i>S. chinensis</i>	EF670546	Frere (8), Chen (5)	Hong Kong
<i>S. sahalensis</i>	EF670552	Frere (8), Chen (5)	Australia
<i>S. sahalensis</i>	EF670554	Frere (8), Chen (5)	Australia
<i>S. sahalensis</i>	EF670555	Frere (8), Chen (5)	Australia
<i>S. sahalensis</i>	EF670556	Frere (8), Chen (5)	Australia
<i>S. teuzii</i>	EU380409	Frere (8), Chen (5)	West Africa-Mauritania
<i>S. teuzii</i>	NC045404	McGowen (21)	Senegal
<i>S. teuzii</i>	MN365274	McGowen (21)	Senegal
<i>S. chinensis</i>	HQ221869	Chen (5)	China
<i>S. chinensis</i>	HQ221872	Chen (5)	China
<i>S. chinensis</i>	HQ221874	Chen (5)	China
<i>S. chinensis</i>	HQ221875	Chen (5)	China
<i>S. chinensis</i>	KX364248	Amaral (1)	Bangal
<i>S. chinensis</i>	KX364254	Amaral (1)	Bangal
<i>S. chinensis</i>	KX364251	Amaral (1)	Bangal
<i>S. chinensis</i>	KX364255	Amaral (1)	Bangal
<i>S. chinensis</i>	KX364256	Amaral (1)	Bangal
<i>S. chinensis</i>	NC012057	Xiong (35)	China
<i>S. chinensis</i>	EU557091	Xiong (35)	China

## نتایج

شده‌اند. دلفین‌هایی که از آفریقای جنوبی، هند، غرب آفریقا و چین بودند، یک کلاد تک‌نیا تشکیل داده، که رابطه خواهری با دلفین‌های استرالیایی دارند. نمونه‌های خلیج بنگال نیز در قاعده درخت قرار گرفته‌اند. موقعیت و جایگاه در درخت‌های تبارزادی رسم شده از توالی‌های مطالعه حاضر و توالی‌های گزارش شده پیشین نشان داد که نمونه‌های دلفین گوژپشت آبهای ایران از جنس *Sousa* با نمونه‌های هند با حمایت بالا در هر دو آنالیز هم‌گروه شده است. این کلاد هندی - ایرانی با دلفین‌های آفریقای جنوبی یک خوشه تک‌نیا تشکیل دادند.

**نتایج درخت‌های تبارزادی:** درخت‌های تبارزادی ML و BI، با استفاده از ۳۰ توالی ژن D-LOOP از گونه‌های جنس دلفین گوژپشت *Sousa* ترسیم شد. دو درخت بدست آمده الگوی توپولوژی یکسانی را نشان دادند و بنابراین در اینجا درخت ML به اعداد حمایتی bootstrap و posterior probability از هر دو آنالیز نشان داده شده است (شکل ۱). کلادهای به دست آمده در این آنالیزها نشان می‌دهد دلفین‌های گوژپشت به شش گروه دلفین‌های هندی - ایرانی، آفریقای جنوبی، استرالیایی، بنگالی و غرب آفریقا تقسیم



شکل ۱- درخت تبارزادی حداکثر احتمال (ML) با استفاده از نرم افزار raxmlGUL براساس ژن D-LOOP. ضرایب اطمینان ML (bootstrap value) در بالا و BI (posterior probability) در پایین گره‌ها نشان داده شده است. گونه *Delphinus.delphis* به عنوان Outgroup انتخاب شده است.

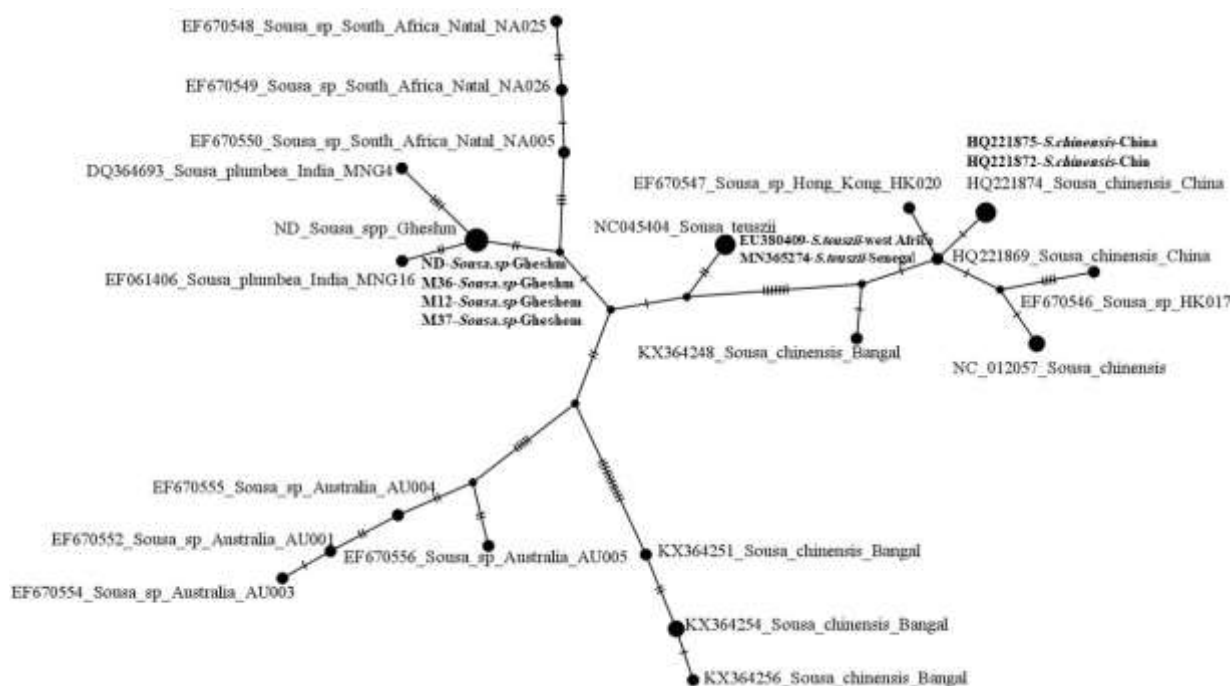
کمترین فاصله ژنتیکی بین نمونه‌های کلاد ایرانی - هندی با نمونه‌های کلاد آفریقای جنوبی به مقدار ۲.۷ درصد بدست آمد (جدول ۳).

**محاسبه فاصله ژنتیکی:** فاصله ژنتیکی (K2P) بین کلادها (جدول ۳) بر اساس توالی ژن D-LOOP با نرم افزار MEGA version 5.2.2 (۳۱) محاسبه شد. براساس این آنالیز،

جدول ۳ - میانگین فاصله ژنتیکی بین کلادها جنس *Sousa* در نقاط مختلف جهان

		1	2	3	4	5
1	Iran-India					
2	South_Africa	0/027				
3	West_Africa	0/028	0/031			
4	China	0/055	0/052	0/044		
5	Australia	0/059	0/061	0/060	0/081	
6	Bangal	0/078	0/077	0/066	0/089	0/086

بررسی شبکه هاپلوتایپی: شبکه هاپلوتایپ بدست آمده از توالی ژن D-LOOP برای دلفین‌های گورپشت نشان داد که هر چهار نمونه ایرانی یک هاپلوتایپ مشترک دارند. شش گروه هاپلوتایپی مجزا قابل تشخیص است که هر یک مربوط به یک منطقه جغرافیایی متفاوت است (شکل ۳). دلفین‌های ایران کمترین فاصله را با دلفین‌های هند با دو و چهار جهش و بیشترین فاصله را با دلفین‌های بنگالی دارد.



شکل ۳ - شبکه هاپلوتایپ ترسیم شده براساس داده‌های ژن D-LOOP برای دلفین گورپشت، اندازه هر دایره متناسب با تعداد دلفین‌هایی است که هاپلوتایپ مربوطه را نشان می‌دهند. هر خط هاشور معادل یک جهش می‌باشد.

شناسایی و معرفی شده‌اند (Osbeck, 1765) *S. chinensis* (۱۴ و ۲۶). براساس مطالعات ریخت‌سنجی در سالهای گذشته (۱۴ و ۲۶) که محققان تنها دو گونه را برای جنس *Sousa* به رسمیت شناخته بودند، و طبق شواهدی که در آن زمان وجود داشت، دلفین گورپشت آب‌های ایران با نام علمی *S. chinensis* معرفی شده است (۲). حال با توجه به مطالعاتی که در زمینه بازبینی طبقه بندی جنس *Sousa*

## بحث و نتیجه گیری

هرچند تاکسونومی دلفین‌های گورپشت به طور کامل روشن نیست و نیاز به بازبینی دقیق‌تر دارد و همچنین تعداد گونه‌های آنها مورد توافق همگانی نیست (۱۵)، اما در اکثر منابع، چهار گونه که در مقدمه نیز ذکر شد را به رسمیت می‌شناسند (۱۵، ۲۰ و ۲۴). نمونه‌های شمال غرب اقیانوس هند (دریای عرب و خلیج فارس) تاکنون به عنوان

سطح گونه‌ها از آفریقای غربی (*S. teuszii*)، جنوب شرقی آفریقا، عمان، دریای عربی و شبه قاره هند (*S. plumbea*)، تایلند و چین (*S. chinensis*) و استرالیا (*S. sahalensis*) جدا می‌کند (او و ۲۰).

در هند *Sutaria* و همکاران در سال ۲۰۰۴ با استفاده از مطالعه ریخت‌سنجی نشان دادند که جمعیت دلفین گوژپشت در سواحل شرق و غرب هند متفاوت هستند و انواع آن ممکن است در سواحل هند وجود داشته باشد. دلفین‌های گوژپشت که در سواحل غربی هند (دریای عربی) مشاهده شده‌اند، گوژ بزرگی دارند و به رنگ خاکستری تیره به نظر می‌رسند، بنابراین به *S. plumbea* شباهت دارند، در حالی که آن‌هایی که در طول ساحل شرقی هند مشاهده می‌شوند، گوژ کاملاً مشخصی ندارند و دارای رنگ روشن‌تری هستند. بنابراین این دلفین‌ها به *S. chinensis* شباهت دارند (۲۹). به نظر می‌رسد که در اقیانوس هند هر دو به واحدهای مجزای تبارزادی تقسیم می‌شوند که از شرق تا غرب متغیر است. به نظر می‌رسد که در *S. plumbea* در غرب اقیانوس هند توزیع شده‌اند در حالی که *S. chinensis* در شرق اقیانوس هند و بخش غربی اقیانوس آرام توزیع شده است (۱). گونه *S. plumbea* از شمال غربی سواحل هند نیز به ثبت رسیده است (۳۰). همچنین Mendez و همکاران در سال ۲۰۱۳ در مطالعه خود بیان می‌کنند که جمعیت دلفین گوژپشت از هند به همراه جمعیت‌های از دریای عرب، عمان و تایلند یک گروه با هاپلوتایپ مشخص تشکیل می‌دهند (۲۰).

Jayasankar و همکاران در سال ۲۰۰۸ دو نمونه از دلفین گوژپشت سواحل غرب هند (دریای عرب) را با استفاده از نشانگر *ctyb* ناحیه میتوکندریایی مورد ارزیابی قرار دادند و مشخص نمودند هر دو نمونه دارای هاپلوتایپ یکسانی هستند ولی با هاپلوتایپ‌های جمعیت دلفین گوژپشت از آفریقای جنوبی و هنگ کنگ تفاوت دارد (۱۳). بعد از آن Chen و همکاران در سال ۲۰۱۰ مطالعه‌ای با تمرکز بر الگوهای تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیتی *S. chinensis* در

انجام شده و ۴ گونه را برای آن به رسمیت شناخته و معرفی می‌کنند (۲۰) و با توجه به نتایج بدست آمده در این تحقیق به نظر می‌رسد، تجدید نظر در خصوص وضعیت رده بندی دلفین گوژپشت آب‌های ایران ضروری باشد.

در این مطالعه از ۴ نمونه دلفین گوژپشت، سه نمونه از قشم و یک نمونه از جاسک، که پس از بررسی ریخت-سنجی اولیه *S. chinensis* شناسایی شده بود، نمونه برداری بافتی انجام شد و مورد بررسی مولکولی قرار گرفت. هر چهار توالی بدست آمده برای ژن D-LOOP در مطالعه حاضر دارای هاپلوتایپ یکسان بودند (شکل ۳). طبق بررسی مولکولی انجام شده در این تحقیق مشخص شد که نمونه‌های دلفین گوژپشت موجود در آب‌های جنوبی ایران دارای هاپلوتایپ مشترک هستند و از نظر توالی ژنتیکی به نمونه‌های دلفین گوژپشت گونه *S. plumbea* از هند (دریای عرب) نزدیک‌تر است و با آن‌ها در یک کلاد قرار می‌گیرند. همچنین نمونه‌های دلفین گوژپشت ایرانی و هندی با گونه *S. plumbea* از آفریقای جنوبی هم گروه شده و با آن یک رابطه خوهری با تشکیل کلاد با حمایت بالا ایجاد می‌کند. نتایج حاصل از شبکه هاپلوتایپ ترسیم شده نیز نشان از این دارد که دلفین‌های گوژپشت ایران کمترین فاصله را با دلفین‌های گوژپشت هندی دارند. در درخت تبارزادی ترسیم شده (شکل ۱) نمونه‌های ایرانی در کلادی جداگانه از سایر گونه‌های جنس *Sousa* از نقاط مختلف جهان قرار گرفتند. روابط به دست آمده از شبکه هاپلوتایپ که با توالی ژن D-LOOP تخمین زده شد، نیز خوشه‌های مجزایی را نشان می‌دهد که با مناطق مختلف جغرافیایی مطابقت دارد.

طبقه‌بندی این جنس طبق مطالعات صورت گرفته، بحث برانگیز بوده است، در جامع‌ترین مطالعه ژنتیکی انجام شده تا به امروز، که شامل نمونه‌هایی از طیف وسیعی از گونه‌ها بود، میزان واگرایی بالایی را در هر دو نشانگر DNA میتوکندریایی و هسته‌ای مشاهده شد که دلفین‌ها را در

با جمعیت‌های همسایه متفاوت هستند (۱). ما نیز که در مطالعه حاضر از توالی‌های دلفین گوژپشت بنگالی بررسی شده در مطالعات Amaral و همکاران (۱) استفاده کردیم، نتایج بدست آمده نشان داد، این جمعیت از دلفین‌ها در کلادی جداگانه‌ای از سایر گونه‌های جنس *Sousa* قرار می‌گیرند. پژوهش‌های (۱، ۱۶ و ۲۰) ادعا می‌کنند که دلفین‌های خلیج بنگال گونه‌های مجزای می‌باشند و با توجه به برخی شباهت‌ها در ریخت و رنگ این گونه‌ها، امکان تطابق آن با گونه *S. lentiginosa* (Owen, 1866) وجود دارد. اما برای اثبات این موضوع تطابق نمونه‌های *S. lentiginosa* با ساختارهای ژنتیکی جدید لازم است (۳۰). با توجه به یافته‌های فعلی، گونه خلیج بنگال موقتاً به‌عنوان یک گروه بسیار متفاوت از دلفین‌ها در گونه *S. chinensis* در نظر گرفته شد. می‌توان گونه‌ی پنجمی را در دسته‌بندی *Sousa* sp. با توجه به ویژگی‌ها و جایگاه خاص آن، برای این نمونه‌ها در نظر گرفت (۱).

نتایج تبارزادی به دست آمده از مطالعه حاضر نیز حاکی از این است که گونه‌های دلفین گوژپشت از ایران *S. chinensis* نیست. نتایج حاصل از آنالیزهای تبارزادی با کمک DNA میتوکندریایی نمونه‌های ایرانی در مطالعه حاضر نشان می‌دهد که این دلفین‌ها به گونه *S. plumbea* نزدیک‌تر از سایر گونه‌های جنس *Sousa* هستند و بنابراین می‌توان آنها را متعلق به این گونه دانست. این نتایج همچنین یک تمایز نسبی را بین نمونه‌های هندی-ایرانی و نمونه‌های گونه *S. plumbea* از غرب آفریقا نشان می‌دهد. این جدایی نسبی بین نمونه‌های شمال غربی و جنوب غربی اقیانوس هند شاید نشان از وجود زیرگونه‌های مجزا در این مناطق باشد. بررسی‌های دقیق‌تر ریخت‌سنجی و همچنین استفاده از نشانگرهای بیشتر میتوکندریایی و هسته‌ای به هر حال برای نتیجه‌گیری دقیق‌تر ضروری به نظر می‌رسد.

آب‌های چین انجام دادند (۵). در این پژوهش، چند توالی از ناحیه D-LOOP دلفین‌های گوژپشت موجود در چین و هند، با دنباله‌هایی که قبلاً منتشر شده بودند، ترکیب شدند تا آنالیز جامع‌تری در مورد وضعیت تکامل نژادی *S. chinensis* در آب‌های چین انجام‌گیرد، در این مطالعه از دو نمونه دلفین گوژپشت هندی که در مطالعه (۱۳) مورد ارزیابی قرار داده بودند، استفاده شد و هر دو نمونه در یک کلاد قرار گرفتند که Chen این کلاد را با نام *S. plumbea* مشخص نمود و با دلفین‌های گوژپشت افریقای جنوبی که آنها نیز با کلاد *S. plumbea* مشخص شده بود، کلاد خواهری تشکیل دادند. تمامی نمونه‌هایی که از نقاط مختلف چین گرفته شده بودند در یک کلاد قرار گرفتند که با کلاد *S. chinensis* مشخص شد و این مسئله حاکی از آن بود که تنها یک گونه از جنس *Sousa* در چین وجود دارد (۵). همچنین یکی از معضلات اصلی در طبقه‌بندی جنس *Sousa*، جایگاه دلفین‌های گوژپشت خلیج بنگال بوده است (شرق هند، بنگلادش و میانمار). در این منطقه دلفین‌هایی وجود دارد که شباهت بسیاری با گونه‌های *S. chinensis* و *S. plumbea* دارند. برای مثال نشانه‌هایی از کوهان پشت، باله‌های پشتی پهن، وجود نقطه بر روی پوست، و بخش‌های بسیار بزرگ بدون رنگ در قسمت‌ها پشتی و کناری (۱۶، ۲۲، ۲۹ و ۳۰). بر طبق شواهدی که وجود داشت، Jefferson و همکاران در ۲۰۱۴ پیشنهاد کردند، که شاید بتوان دلفین‌های خلیج بنگال را به عنوان حدواسطی بین *S. plumbea* و *S. chinensis* در نظر گرفت (۱۵). نتایج حاصل از پژوهش‌های Amaral و همکاران براساس آنالیزهای ژنتیکی ناحیه D-LOOP و نتایج فیلوژئوگرافی، نشان داد دلفین‌های گوژپشت در سواحل بنگلادش در خلیج شمالی بنگال گروه تبارزادی جداگانه را تشکیل می‌دهند و نمونه‌های این منطقه بالاترین سطح تفاوت ژنتیکی با سایر مناطق جغرافیایی را نشان می‌دهند و شباهتی با هیچ یک از گونه‌های *S. chinensis* و *S. plumbea* نداشتند. آنان دریافتند که دلفین‌های بنگالی از نظر ژنتیکی

## سپاسگزاری

پژوهش و کلیه همکاری‌هایی که در مراحل نمونه برداری این تحقیق همکاری نموده‌اند، تشکر و قدرانی می‌گردد.

بدین وسیله از همکاری و مساعدت اداره کل حفاظت محیط زیست هرمزگان در جهت به انجام رساندن بهینه این

## منابع

- 1- Amaral, A. R., Smith, B. D., Mansur, R. M., Brownell, R. L., Rosenbaum, H. C., 2016. Oceanographic drivers of population differentiation in Indo-Pacific bottlenose (*Tursiops aduncus*) and humpback (*Sousa* spp.) dolphins of the northern Bay of Bengal. *Conservation Genetics*, 18, PP: 371–381
- 2- Braulik, G. T., Ranjbar, S., Owfi, F., Aminrad, T., Dakhteh, M., 2010. Marine Mammal Records from Iran. *Journal of Cetacean Research and Management*, 11(1), PP: 49-63
- 3- Braulik, G. T., Findlay, K., Cerchio, S., and Baldwin, R., 2015. Assessment of the conservation status of the Indian Ocean humpback dolphin (*Sousa plumbea*) using the IUCN red list criteria. *Advances in Marine Biology*, 72, PP: 119–141.
- 4- Chen, H., Zhai, K., Chen, J., Chen, Y., Wen, H., Chen, S., Wu, Y., 2008. A preliminary investigation on genetic diversity of *Sousa chinensis* in the Pearl River Estuary and Xiamen of Chinese waters. *Journal of Genetics and Genomics*, 35, PP: 491-497
- 5- Chen, L., Caballero, S., Zhou, K., Yang, G., 2010. Molecular phylogenetics and population structure of *Sousa chinensis* in Chinese waters inferred from mitochondrial control region sequences. *Biochemical Systematics and Ecology*, 38, PP: 897–905
- 6- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., and Posada, D., 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9,772. doi:10.1038/nmeth.2109
- 7- Fraser, F. C. 1966. Comments on the Delphinoidea. Pages 7–31 in K. S. Norris, ed. *Whales, dolphins, and porpoises*. University of California Press, Berkeley, CA.
- 8- Frere, C. H., Hale, P. T., Porter, L., Cockcroft, V.G., 2008. Phylogenetic analysis of mtDNA sequences suggests revision of humpback dolphin (*Sousa* spp.) taxonomy is needed. *Marine and Freshwater Research*, 59(3), PP: 259–268.
- 9- Frere, C. H., Seddon, J., Palmer, C., Porter, L., and Parra, G. J., 2011. Multiple lines of evidence for an Australasian geographic boundary in the Indo-Pacific humpback dolphin (*Sousa chinensis*): Population or species divergence? *Conservation Genetics*, 12, PP: 1633–1638.
- 10- Fumagalli, L., Pope, L. C., Taberlet, P., and Moritz, C., 1997. Versatile primers for the amplification of the mitochondrial DNA control region in marsupials. *Molecular Ecology*, 6(12), PP: 1199-1201.
- 11- Hall, T. A., 1999. BioEdit: a userfriendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, PP: 95-98.
- 12- Huelsenbeck, J. P., Ronquist, F., 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17, PP: 754-755.
- 13- Jayasankar, P., Anoop, B., VivekanandanRajagopalan, M., Yousuf, K. M. M., Reynold, P., Krishnakumar, P. K., Kumaran, P. L., Afsal, V. V., Krishnan, A.A., 2008. Molecular identification of Delphinids and finless porpoise (Cetacea) from the Arabian Sea and Bay of Bengal. *Zootaxa*, 1853, PP: 57–67.
- 14- Jefferson, T. A., Van Waerebeek, K., 2004. Geographic variation in skull morphology of humpback dolphins (*Sousa* spp.). *Aquatic Mammals*, 30, PP: 3–17
- 15- Jefferson, T. A., Rosenbaum, H. C., 2014. Taxonomic revision of the humpback dolphins (*Sousa* spp.), and description of a new species from Australia. *Marine Mammal Science*, 30, PP: 1494–1541
- 16- Jefferson, T. A., and Curry, B. E., 2015. Humpback dolphins: a brief introduction to the genus *Sousa*. *Advances in Marine Biology*, 72, PP: 1–16.
- 17- Jefferson, T. A., Smith, B. D., 2016. Re-assessment of the conservation status of the Indo-Pacific humpback dolphin (*Sousa chinensis*) using the IUCN red list criteria. *Advance in Marine Biology*, 73, PP: 1–26
- 18- Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of

- nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16, PP: 111-120
- 19- Leigh, J. W., Bryant, D., 2015. PopART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6, PP: 1110-1116
- 20- Mendez, M., Jefferson, T. A., Kolokotronis, S. O., 2013. Integrating multiple lines of evidence to better understand the evolutionary divergence of humpback dolphins along their entire distribution range: A new dolphin species in Australian waters? *Molecular Ecology*, 22, PP: 5936-5948.
- 21- McGowen, M. R., Murphy, K., Ndong, I., Potter, C. W., and Keith-Diagne, L. W., 2020. The complete mitochondrial genome of the critically endangered Atlantic humpback dolphin, *Sousateuszii* (Kükenthal, 1892). *Mitochondrial DNA Part, B*, 5(1), PP: 257-259
- 22- Muralidharan, R., 2013. Sightings and behavioral observations of Indo-Pacific humpback dolphins *Sousa chinensis* (Osbeck, 1765) along Chennai coast, Bay of Bengal. *Journal of Threatened Taxa*, 5, PP: 5002-5006.
- 23- Owfi, F., Braulik, G. T., Rabbaniha, M., 2016. Species diversity and distribution pattern of marine mammals of the Persian Gulf and Gulf of Oman -Iranian Waters. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 15 (2), PP: 927-944
- 24- Parra, G. J., Jefferson, T. A., 2018. Humpback Dolphins: *Sousa teuszii*, *S. plumbea*, *S. chinensis* and *S. sahalensis*. *Encyclopedia of Marine Mammals (Third Edition)*, PP: 483-489
- 25- Posada, D., and Buckley, T. R., 2004. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Systematic Biology*, 53, PP: 793-808.
- 26- Ross, G. J. B., Heinsohn, G. E., and Cockcroft, V. G., 1994. Humpback dolphins - *Sousa chinensis* (Osbeck, 1765), *Sousa plumbea* (G. Cuvier, 1829) and *Sousa teuszii* (Kükenthal, 1892). pp.23-42. In: Ridgway, S.H. and Harrison, R. (eds). *Handbook of Marine Mammals*, 5. The First Book of Dolphins. Academic Press, London and San Diego. 416pp.
- 27- Sambrook, J., Ramachandra, N., 1998. A simple and rapid method for isolation of cellular DNA. *Journal of Science Education*, 3
- 28- Silvestro, D., Michalak, I., 2012. RAXML GUI: a graphical frontend for RAML. *Organisms Diversity and Evolution*, 12, PP: 335-337.
- 29- Sutaria, D., Jefferson, T. A., 2004. Records of Indo-Pacific humpback dolphins (*Sousa chinensis*, Osbeck, 1765) along the coasts of India and Sri Lanka: an overview. *Aquatic Mammals*, 30, PP: 125-136.
- 30- Sutaria, D., Panicker, D., Jog, K., Sule, M., Muralidharan, R., Bopardikar, I., 2015. Humpback dolphins (genus *Sousa*) in India: an overview of status and conservation issues. *Advances in Marine Biology*, 72, PP: 229-256.
- 31- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum Parsimony method. *Molecular Biology and Evolution*, 28, PP: 2731-2739
- 32- Taberlet, P., Bouvet, J., and Proc, R., 1994. Mitochondrial DNA polymorphism, phylogeography, and conservation genetic of the brown bear *Ursus arctos* in Europe. *The Royal Society*, 255, PP: 195-200.
- 33- Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J., 1994. ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiples sequence alignments through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, 22, PP: 4673-4680.
- 34- Villesen, P., 2007. FaBox: an online toolbox for Fasta sequences. *Molecular Ecology, Notes* 7, PP: 965-968.
- 35- Xiong, y., Brandley, M. C., Xu, Sh., Zhou, K., and Yang, G., 2009. Seven new dolphin mitochondrial genomes and a time-calibrated Phylogeny of whales. *BioMed Central Evolutionary Biology*, 9:20

## **Taxonomic revision of the humpback dolphin *Sousa plumbea* (Cetacea: Delphinidae) from the Persian Gulf and Oman Sea, using mitochondrial D-LOOP gene.**

**Ansarinezhad M.<sup>1</sup>, Shahdadi A.<sup>1</sup>, Ram M.<sup>2</sup> and Ranjbar M.Sh.<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup> Dept. of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, I.R. of Iran

<sup>2</sup> Gene Bank, Dept. of Environment Hormozgan, Bandar Abbas, I.R. of Iran

### **Abstract**

The present study investigated phylogeny of Iranian (the Persian Gulf and Oman Sea) humpback dolphin, using mitochondrial D-LOOP gene. As a result, four sequences of D-LOOP were obtained from the four Iranian specimens and were compared with available sequences of the members of the genus *Sousa* from the GeneBank (NCBI). For phylogenetic analyses we used two methods, Maximum Likelihood and Bayesian Inference. In the analyses of D-LOOP, all Iranian sequences group firmly together with Indian specimen under a supported clade (bootstrap value = 98 in ML tree, posterior probability = 1 in BI tree). The Indo-Iranian clade clustered firmly with the clade of *Sousa plumbea* from west of Indian Ocean and South Africa. This finding proof that the Iranian humpback dolphin does not belong to *S. chinensis*, as previously were recorded, but belongs to *S. plumbea*. To address the phylogeny with better resolution, careful morphological examination along with using more mitochondrial and nuclear markers are suggested.

**Key words:** Indo-Pacific region, *Sousa plumbea*, Iran, Jask, Qeshm.