

بررسی مولکولی و ریخت‌شناختی گونه‌های جنس *Peronia* Fleming, 1822 (نرم‌تنان، شکم‌پایان) در سواحل ایرانی خلیج فارس و دریای عمان

یاسر فاطمی^۱، محمد رضا طاهری زاده^{۱*}، عدنان شهدادی^۱، حمیدرضا اسماعیلی^۲

^۱گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.

^۲گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.

*نویسنده مسئول taheri.1965@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۱۹

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۲۷

چکیده

جنس *Peronia* Fleming, 1822 با داشتن ۱۴ گونه از متنوع‌ترین جنس‌های خانواده‌ی Onchidiidae می‌باشد که در آب‌های خلیج فارس و دریای عمان پراکنش بالایی دارند. علی‌رغم نقش مهم اکولوژیکی آن‌ها در این مناطق، متأسفانه *Peronia* تاکنون به خوبی مطالعه نشده‌اند. در این مطالعه ضمن تشریح ویژگی‌های ریخت‌شناختی دو گونه از این جنس (*P. madagascariensis* (Labbé, 1934) و *P. verruculata* (Cuvier, 1830) با کمک توالی قطعه‌ی یک ژن سیتوکروم اکسیداز، وضعیت قرارگیری آن‌ها در این جنس مشخص شد. در این مطالعه برای اولین سوهانک مربوط به اعضای این جنس در ناحیه‌ی شمال غرب اقیانوس هند بررسی و گونه‌ی *P. madagascariensis* از آب‌های ایرانی دریای عمان گزارش شد.

واژگان کلیدی: بندرعباس، خور گواتر، تنوع زیستی، فیلوژنی.

مقدمه

مانگرو دیده نمی‌شوند. پا در این گروه به صورت کامل توسط نوتوم پوشیده است، دو شاخک در قسمت سری بین پا و نوتوم چشم‌ها را حمل می‌کنند همچنین دهان توسط دو لوب دهانی، احاطه می‌شود، مخرج در قسمت انتهایی بدن و بین پا و نوتوم قرار دارد، پنوستوم نیز در انتهای بدن و در سطح داخلی نوتوم دیده می‌شود. منفذ تناسلی در سمت راست و بسته به گونه‌های مختلف بین شاخک‌ها و لوب دهانی قرار می‌گیرد (Dayrat et al., 2016; Bitaab et al., 2018). اعضای این جنس در سطح جهانی به خوبی مطالعه نشده و شناسایی‌های آن‌ها عمدتاً اشتباه و یا هم‌نامی بوده است. در حال حاضر تنها مرجع دقیق برای این گونه مربوط به مطالعه‌ی Dayrat و همکاران (۲۰۲۰) می‌باشد که ۳۱ گونه‌ی شناخته‌شده‌ی این جنس را با معرفی ۹ گونه‌ی جدید به ۱۴ گونه کاهش داده‌اند.

در ایران نیز مطالعات پراکنده‌ای روی آن‌ها انجام شده است که همواره بخشی از مطالعات بزرگ‌تر بوده است. Maniei و همکاران در (۲۰۲۰) گونه‌ی جدیدی

اعضای خانواده‌ی Onchidiid در مناطق بین جزر و مدی زیست می‌کنند و در تمام مناطق دنیا به جز قطب دیده می‌شوند. لارو آن‌ها در آب دریا رهاسازی می‌شود به همین دلیل دریازی حقیقی به شمار می‌روند. اعضای این خانواده از هوا تنفس می‌کنند و اگر مدت زمان زیادی در زیر آب نگهداری شوند بر اثر خفگی تلف خواهند شد (Dayrat, 2009).

جنس *Peronia* Fleming, 1822 با داشتن ۱۴ گونه از متنوع‌ترین جنس‌های خانواده‌ی Onchidiidae می‌باشد. اعضای این جنس در ناحیه‌ی گرمسیری و زیرگرمسیری (در ناحیه‌ی هند آرام غربی، جنوب آفریقا و نیز جزایر هاوایی) زیست می‌کنند که با داشتن آبشش پستی از بقیه‌ی جنس‌های خانواده‌ی Onchidiidae متمایز می‌شوند. آبشش آن‌ها زمانی که در خشکی هستند و یا در اتانل ذخیره شده‌اند، به‌سختی دیده می‌شوند. آن‌ها در سواحل صخره‌ای و یا سواحل مرجانی و گاهی در سواحل گلی دیده می‌شوند، با این حال در جنگل‌های

دانشگاه شیراز عکس‌برداری شدند (شکل‌های ۲ و ۴). با استفاده از روش محلول نمکی، DNA از دو فرد از نمونه‌های جمع‌آوری شده استخراج شد. برای استخراج DNA ۱۰ میلی‌گرم از بافت عضله در محلول لیز کننده (CLS: Qiagen, USA) و به مدت ۱۰ ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بافت در ساعات سوم یا چهارم به کمک میله‌های پلاستیکی له شدند. سپس به آن‌ها محلول رسوب‌دهنده پروتئین (PPS: Qiagen, USA) اضافه شد و پس از سانتریفیوژ، مایع رویی به اتانول ۹۶ درصد منتقل شدند. پس از حدود چهار ساعت که نمونه‌ها در دمای ۲۰- نگهداری شدند، نمونه‌ها سانتریفیوژ شده و مایع رویی دور ریخته شد و برای نگهداری طولانی مدت به رسوب DNA محلول TE اضافه شد. با کمک ژل الکتروفورز، نمونه‌هایی که به اندازه‌ی کافی DNA داشتند تعیین و برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز انتخاب شدند. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای رفت LCO1490 با توالی نوکلئوتیدی 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3' و برگشت HCO2198 با توالی نوکلئوتیدی 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAAATCA-3' جهت تکثیر قطعه‌ای با طول حدود ۷۰۰ باز آلی از ژن سیتوکروم اکسیداز میتوکندریایی (CO1) انجام گرفت (Folmer et al., 1994). واکنش در حجم ۲۵ میکرو لیتر (شامل ۱۰ میکرو لیتر آب، ۱۲ میکرو لیتر ماستر میکس (محصول شرکت توپاز ژن)، ۱ میکرو لیتر از هر آغازگر و ۱ میکرومتر از DNA الگو) انجام گرفت. برنامه‌های سیکل حرارتی شامل ۳۵ سیکل و به ترتیب زیر انجام گرفت:

واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه، به مدت ۵ دقیقه، واسرشته‌سازی‌های دوره‌ای در دمای ۹۴ درجه به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال در دمای ۴۸ درجه به مدت ۴۵ ثانیه، تکثیر قطعه در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه و تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه. پس از بررسی کیفیت محصولات PCR بر روی ژل ۱/۵ درصد آگارز، نمونه‌هایی که مناسب

از این جنس را از سواحل بندرلنگه جزیره‌ی لاوان و با نام *Peronia prsiae* معرفی کردند که بعداً، Dayrat و همکاران با بازبینی کامل این جنس متوجه شدند که این گونه در واقع مترادف شده گونه *P. verculata* می‌باشد. *P. madagascariensis* توسط Dayrat و همکاران (۲۰۲۰) از جزیره‌ی قشم و هرمز و نیز سواحل کشور عمان گزارش شد. *P. verculata* از سواحل بندر بوشهر توسط Dayrat و همکاران (۲۰۲۰) گزارش شد. با توجه به اینکه اعضای این جنس به خوبی در ایران مطالعه نشده‌اند و همواره‌ی بررسی آن‌ها بخشی از مطالعات بزرگ‌تر بوده است و نیز ساختار سوهانک آن‌ها که مهم‌ترین ویژگی افتراقی آن‌هاست، تصویربرداری نشده بود، این مطالعه در ایستگاه بندرعباس و ساحل گواتر انجام شد و ضمن تشریح ریخت‌شناختی گونه‌ها و تعیین وضعیت قرارگیری آن‌ها در درخت فیلوژنتیکی مربوط به این جنس، تعیین فاصله‌ی ژنتیکی بین جمعیت مختلف گونه‌ها و نیز ترسیم شبکه‌ی هاپلو تایپی آن‌ها، گونه‌ی *P. madagascariensis* را برای اولین بار از سواحل ایرانی دریای عمان گزارش می‌دهد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری در بهمن‌ماه ۱۳۹۷ در ساحل شهر بندرعباس و در اسفند سال ۱۳۹۷ در سواحل گواتر در استان سیستان بلوچستان انجام شد. پس از عکس‌برداری از نمونه‌های زنده، جهت نگهداری طولانی مدت در اتانول مطلق نگهداری شدند و در نهایت به آزمایشگاه بافت‌شناسی دانشگاه هرمزگان منتقل شدند. برای تصویربرداری از سوهانک نمونه‌ها، ابتدا قسمت سری بریده شده و در KOH ۱۰ درصد قرار داده شد. پس از حذف بافت گوشت از روی سوهانک به اتانول مطلق منتقل شد و قبل از تصویربرداری با قرار دادن در آب دیونیزه شده الکل آن حذف شد. نمونه‌ها بر روی پایه‌های مخصوص مربوط به میکروسکوپ الکترونی قرار داده شده و باروکشی از طلا پوشیده و در آزمایشگاه بیوتکنولوژی



شکل ۱- نمای از نمونه‌ی زنده *P. madagascariensis* در دو سطح پشتی و شکمی.

میانگین فاصله‌ی ژنتیکی بین ایستگاه‌ها با استفاده از نرم‌افزار Mega X محاسبه شد (Tamura et al., 2011).

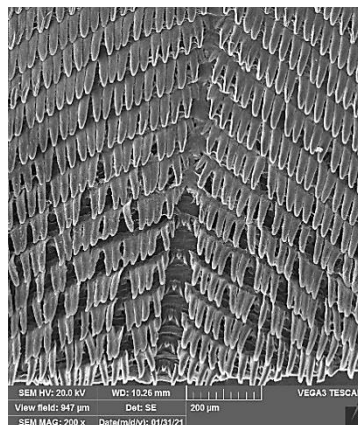
نتایج

گونه: *Peronia madagascariensis* (Labbé, 1934)

توصیف: بدن به رنگ سبز زیتونی، تعداد زیادی پایپلا بر روی سطح پشتی وجود دارد که برخی از آن‌ها بر روی خود چشم دارند. آبشش در قسمت پشتی و متراکم است و فقط در زیر آب باز شده و قابل مشاهده است. پا صاف و خاکستری است. هیپنوتوم سبز مایل به خاکستری است (شکل ۱). سوهانک دارای دو دسته‌ی دندان‌های جانبی هستند که به صورت اریب نسبت به دندان‌های میانی قرار گرفتند. دندان‌های کناری نسبت به هم آرایش موازی گرفته‌اند. دندان‌های میانی برجسته و دارای دوپایه‌ی کناری می‌باشند. این دندان‌ها نوک تیز و به سمت بیرون قرار گرفته‌اند و دارای دو خار تیز جانبی نیز هستند (شکل ۲).

نتایج محاسبه‌ی فاصله‌ی ژنتیکی بین جمعیت‌های مختلف گونه‌ی *P. madagascariensis* نشان داد که فاصله‌ی ژنتیکی بین جمعیت خلیج فارس و دریای

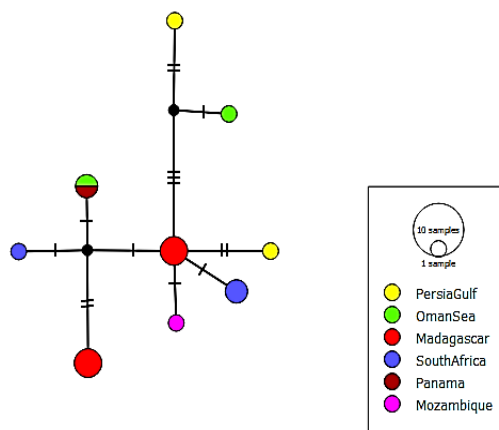
تشنخیص داده شدند، برای توالی‌یابی به شرکت توپاز ژن ارسال شدند. توالی‌های خام دریافت شده با کمک نرم‌افزار Choromas Lite (v. 2.1.1) (Technelysium Pty Ltd, Queensland, Australia) ویرایش شده و پس از آن توالی‌های این گونه و گونه‌های مشابه از بانک جهانی ژن استخراج گردید. همترازسازی توالی‌ها به کمک نرم‌افزار Bioedit برای ترسیم درخت، رسم شبکه هاپلوتایپی و نیز محاسبه فاصله ژنتیکی، سه مجموعه داده تهیه شد (Hall, 1999). برای رسم درخت فیلوژنی گونه‌ی *Onchidium typhae* Buchanan, 1800 دلیل نزدیکی به جنس *Peronia* به عنوان برون گروه در نظر گرفته شد. مجموعه داده‌ها با کمک نرم‌افزار AliView به فرمت PHYLIP برای ترسیم درخت، و با استفاده از وبسایت FaBox به فرمت Nexus جهت ترسیم شبکه هاپلوتایپی درآورده شد (Villesen, 2007). درخت‌های حداکثر احتمال در نرم‌افزار raxmlGUI با ۱۰۰۰ تکرار بوتسترپ و با استفاده از مدل GTR+G رسم گردید (Silvestro and Michalak, 2012; Darriba et al., 2012). تعیین مدل تکاملی (GTR+G) به کمک نرم‌افزار (v. 2.1.4) jModelTest انجام شد (Guindon and Gascuel, 2003). رسم شبکه به‌وسیله نرم‌افزار PopArt (Leigh and Bryant, 2015) و نیز



شکل ۲- تصویر میکروسکوپ الکترونی سوهانک برای نمونه‌ی *P. madagascarensis*.

جدول ۱- نتایج محاسبه فاصله ژنتیکی (K2P) (درصد) برای نمونه‌های گونه *P. madagascarensis*

	۵	۴	۳	۲	۱	
۱						خلیج فارس
۲				۰/۰۱	۰/۰۱	دریای عمان
۳				۰/۰۱	۰/۰۱	ماداگاسکار
۴			۰/۰۰	۰/۰۱	۰/۰۱	آفریقای جنوبی
۵		۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۱	۰/۰۱	پاناما
۶	۰/۰۱	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۱	۰/۰۱	موزامبیک

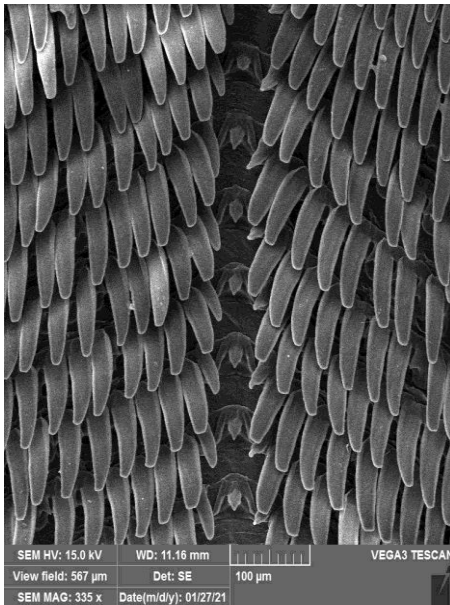


شکل ۳- شبکه هاپلوتایپی ۵۴۸ باز آلی ژن COI برای نمونه‌های گونه *P. madagascarensis* ترسیم شده در PopArt. هر خط هاشور نمایانگر یک جهش می‌باشد.

نشان داده است که یک گروه شامل هاپلوتایپ هایی از ماداگاسکار، آفریقای جنوبی موزامبیک و پاناما بوده که دو هاپلوتایپ از خلیج فارس و دریای عمان نیز در این گروه وجود دارد. گروه گونه‌ای دیگر شامل دو هاپلوتایپ خلیج فارس و دریای عمان بوده که با اختلاف چهار و پنج جهش نسبت به گروه گونه‌ای اول

عمان با همه‌ی جمعیت‌های دیگر یک درصد می‌باشد. کمترین فاصله مربوط به جمعیت آفریقای جنوبی و پاناما و نیز موزامبیک با ماداگاسکار و آفریقای جنوبی بوده است (صفر درصد) (جدول ۱).

ترسیم شبکه‌ی هاپلوتایپی برای گونه‌ی *P. madagascarensis* دو گروه گونه‌ای اصلی را



شکل ۵- تصویر میکروسکوپ الکترونی سوهانک برای گونه‌ی *P. verruculata*

شکل ۴- تصویر بخش شکمی و بخش پشتی نمونه‌ی زنده‌ی *P. verruculata*

جدول ۲- نتایج محاسبه فاصله ژنتیکی (K2P) (درصد) برای نمونه‌های گونه *P. madagascarensis*

	۷	۶	۵	۴	۳	۲	۱	
۱								خلیج فارس
۲						۰/۰۸		ماداگاسکار
۳						۰/۰۹	۰/۰۱	غرب هند
۴					۰/۰۰	۰/۰۹	۰/۰۱	پاکستان
۵				۰/۰۸	۰/۰۸	۰/۰۸	۰/۰۸	جزایر اندامان
۶			۰/۰۷	۰/۰۹	۰/۰۹	۰/۰۷	۰/۰۹	فیلیپین
۷		۰/۰۵	۰/۰۱	۰/۰۸	۰/۰۸	۰/۰۷	۰/۰۸	اندونزی
۸	۰/۰۶	۰/۰۳	۰/۰۷	۰/۰۹	۰/۰۹	۰/۰۶	۰/۰۹	استرالیا

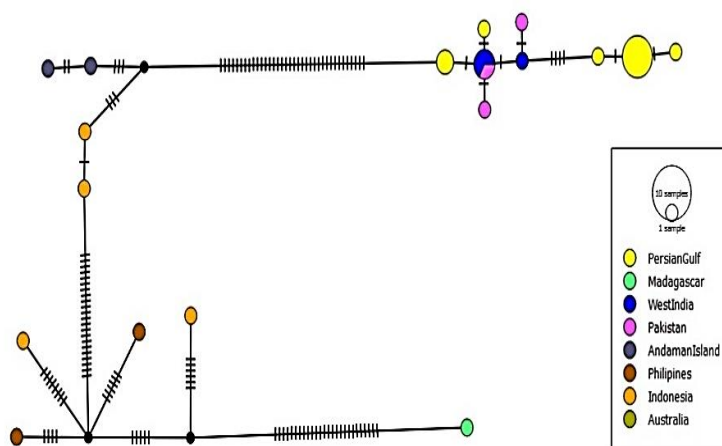
قرار گرفتند (شکل ۳).

گونه: *P. verruculata* (Cuvier, 1830)

توصیف: بدن بیضی شکل، سبز مایل به خاکستری، که با تعدادی پاپیلا پوشیده شده است، بر روی بعضی از آن‌ها ۳ تا ۷ لکه‌ی سیاه دیده می‌شود. پا صاف و عضلانی، به صورت کامل توسط نوتوم پوشیده شده است، بخش شکمی نوتوم سبز روشن و در قسمت حاشیه‌ی بیرونی خاکستری رنگ است، دو شاخک در قسمت سری و بین نوتوم و پا چشم‌ها را حمل می‌کنند. چشم‌ها در رأس این شاخک‌ها به صورت نقاط سیاه‌رنگی دیده می‌شوند. دهان به وسیله‌ی لوب‌های دهانی محاصره شده است، مخرج در قسمت انتهایی بدن و بین پا و نوتوم قرار دارد، پنئوستوم در

قسمت انتهایی بدن و در سطح داخلی نوتوم کاملاً مشخص است. منفذ تناسلی ماده در قسمت راست مخرج و منفذ تناسلی نر بین شاخک راست و لوب دهانی قرار دارد (شکل ۴۵). سوهانک دارای یک ردیف دندان‌های میانی که دوپایه‌ی تقریباً کشیده در طرف خود دارد، به سمت بیرون کشیده شده است، نوک تیز و دو تا خار جانبی دارد که نسبت به بقیه‌ی گونه‌های این جنس تیزی کمتری دارند. دندان‌های کناری به صورت اریب نسبت به دندان‌های مرکزی و نسبت به هم آرایش موازی دارند، این دندان‌ها و فقط یک پنجم قسمت انتهایی آن‌ها ردیف بعدی را می‌پوشاند (شکل ۵).

با انجام آنالیز K2P مشخص شده بین نمونه‌های



شکل ۶- شبکه هاپلوتایپی ۵۴۸ باز آلی ژن COI برای نمونه‌های گونه *P. vericulata* ترسیم شده در PopArt. هر خط هاشور نمایانگر یک جهش می‌باشد.

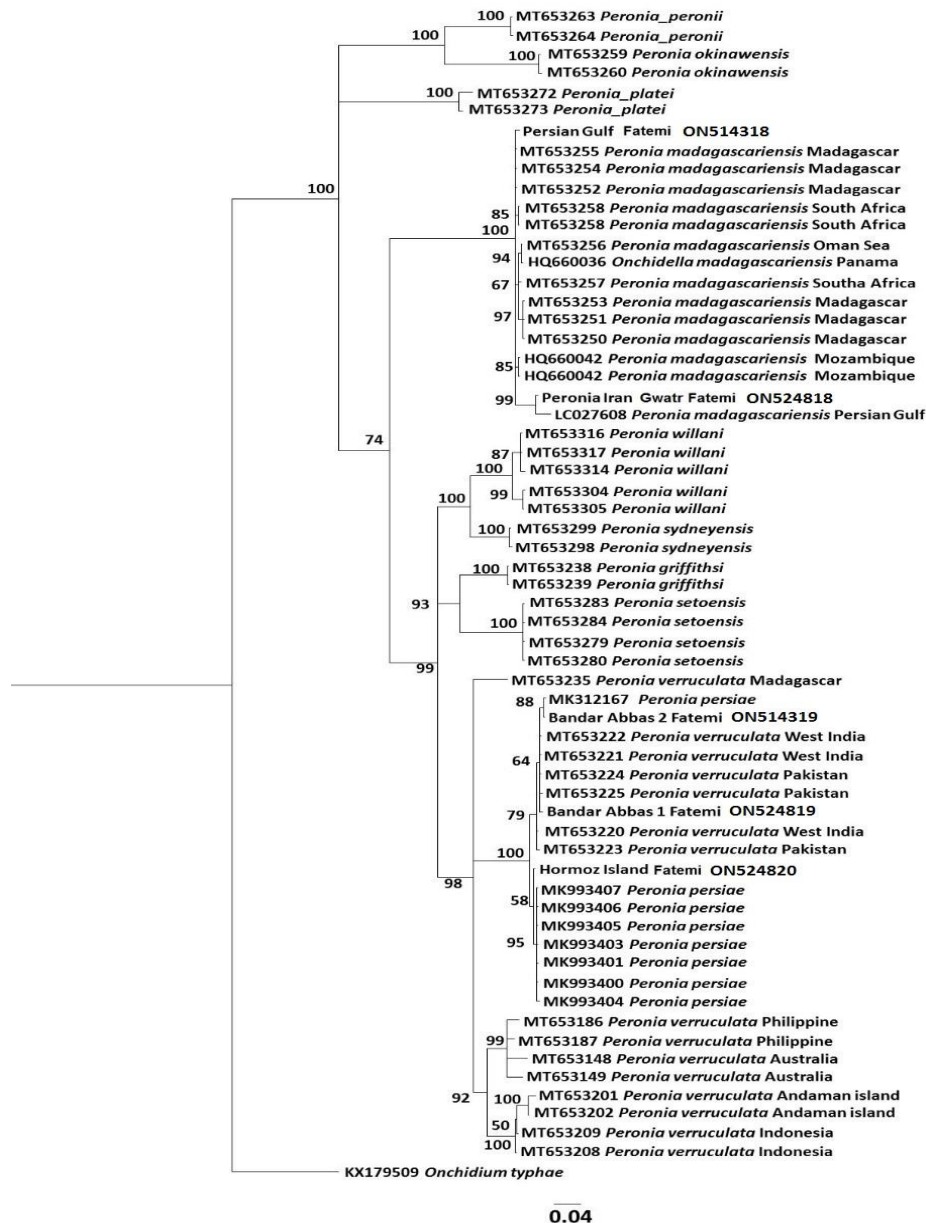
قرار گرفتند. دو نمونه از این مطالعه در کلاد *Madagascarensis* قرار گرفتند. زیر کلادهای متعددی برای این کلاد تشکیل شده است از جمله یک کلاد برای خلیج فارس و دریای عمان، یک زیر کلاد برای نمونه‌های موزامبیک، یک زیر کلاد برای نمونه‌های آفریقای جنوبی، یک زیر کلاد برای نمونه‌های دریای عمان و پاناما. دو نمونه از این مطالعه در کلاد *P. madagascarensis* قرار گرفتند که یک از آن‌ها با نمونه‌ی دریای عمان یک ساب کلاد با ۹۹ درصد حمایت و دیگری به صورت جداگانه و در کنار نمونه‌های ماداگاسکار قرار گرفتند (شکل ۸). گونه‌ی *P. vericulata* نیز در یک کلاد مونوفایلیتیک با ۹۸ درصد حمایت قرار گرفت. با این حال شامل زیر کلادهای مجزایی می‌باشد. نمونه‌های اندونزی و جزایر اندامان هر کدام در یک زیر کلاد، نمونه‌های استرالیا و فیلیپین در یک زیر کلاد، نمونه‌های پاکستان، غرب هند و برخی نمونه‌های ایران در یک زیر کلاد و نهایتاً نمونه‌ی ماداگاسکار در زیر کلاد مجزایی قرار گرفتند (شکل ۷).

بحث و نتیجه‌گیری

P. madagascarensis عمدتاً در سواحل صخره‌ای یا قله‌سنگی و به ندرت در سواحل گلی زیست دارد.

مختلف این گونه در حوزه‌ی پراکنش آن فاصله‌ی زیادی وجود دارد. به صورتی که بیشترین فاصله مربوط به نمونه‌های خلیج فارس با فیلیپین (۹ درصد)، نمونه‌های غرب هند و پاکستان با ماداگاسکار (۹ درصد) می‌باشد. کمترین فاصله مربوط به نمونه‌های پاکستان با غرب هند (صفر درصد) و نیز نمونه‌های پاکستان و غرب هند با نمونه‌های خلیج فارس (۱ درصد) بوده است (جدول ۲).

در شبکه هاپلوتایپی نیز دو گروه گونه‌ای و چند پاراتایپ مجزا داریم. یک گروه گونه‌ای شامل نمونه‌های ایران، پاکستان و غرب هند، گروه دیگر با ۳۶ جهش اختلاف شامل دو هاپلوتایپ از اندونزی و دو هاپلوتایپ از جزایر اندامان می‌باشد. دو هاپلوتایپ از اندونزی و دو هاپلوتایپ از فیلیپین نیز با فاصله‌ی زیادی نسبت به این گروه قرار گرفته‌اند. هاپلوتایپ ماداگاسکار نیز با اختلاف ۳۰ جهش نسبت به نزدیک‌ترین هاپلوتایپ از اندونزی قرار گرفته است (شکل ۶). درخت فیلوژنی جنس *Peronia* با استفاده از ۵۷ توالی استخراج شده از بانک جهانی ژن و ۵ توالی از نمونه‌های ایرانی مطالعه‌ی حاضر ترسیم شد. گونه‌ی *Onchidium typhae* به‌عنوان برون گروه در نظر گرفته شد. جنس پرونیا با ۱۰۰ درصد حمایت یک کلاد مونوفایلیتیک را تشکیل داده است. همه‌ی گونه‌های این جنس نیز در کلادهای مونوفایلیتیک



شکل ۷- درخت فیلوژنی حداکثر احتمال (ML) بر اساس توالی نوکلئوتیدی ژن میتوکندریایی سیتوکروم اکسیداز (COI) برای گونه *P. verruculata* و *P. madagascariensis* سایر گونه‌های خویشاوند، به کمک نرم‌افزار raxmlGUI با ۱۰۰۰ تکرار بوتسترپ. الف. برای توالی‌های مطالعه حاضر و ۳۱ توالی مقایسه‌ای از بانک جهانی ژن (NCBI) استخراج شده (شماره ثبت در درخت قابل مشاهده است).

آفریقا تا شمال غرب اقیانوس هند (خلیج فارس و دریای عمان) می‌باشد. این مطالعه اولین گزارش از حضور آن در آب‌های ایرانی دریای عمان می‌باشد. لازم به ذکر است که این گونه در آب‌های ایران در تمام فصول سال قابل مشاهده است. اندازه‌ی بدنی گونه فوق ۵۰ تا ۹۰ میلی‌متر بوده و رنگ بدن بین جمعیت‌های مختلف متفاوت نیست و عمدتاً به رنگ قهوه‌ای مایل به سبز همراه با لکه‌های تیره‌تر یا

این گونه بیشتر در زمان جزر چسبیده به سطوح سخت سنگ‌ها و در هنگام مد عمدتاً در زیر رسوبات یا شکاف سنگ‌ها قرار می‌گیرد. Dayrat و همکاران (۲۰۲۰) گونه *P. madagascariensis* را از خلیج فارس و دریای عمان گزارش کردند اما به بررسی مولکولی و ریخت‌شناختی جمعیت این گونه در خلیج فارس (بوشهر) و دریای عمان (کشور عمان) اشاره نشده است. پراکنش جهانی این گونه جنوب

نوتوم کاملاً مشخص است. منفذ تناسلی ماده در قسمت راست مخرج و منفذ تناسلی نر بین شاخک راست و لوب دهانی قرار دارد. سوهانک دارای یک ردیف دندان میانی است و دندان‌های میانی به سمت بیرون آرایش یافته که دو خار جانبی دارند که نسبت به بقیه‌ی گونه‌های این جنس تیزی کمی دارند. دندان‌های کناری در ردیف‌های موازی آرایش یافته و هر ردیف حدود یک پنجم طول ردیف بعدی را می‌پوشاند (Liu et al., 2015).

نتایج درخت فیلوژنی با استفاده از ۵۷ توالی استخراج شده از بانک جهانی ژن و نیز ۵ توالی از مطالعه‌ی حاضر نشان داد که جنس *Peronia* در یک کلاد مونوفایلیتیک قرار گرفته که توالی‌های مربوط به گونه‌های *P. verculata* و *P. madagascariensis* در کلادهای مونوفایلیتیک و با درصد حمایت بالا (به ترتیب ۹۸ و ۱۰۰) قرار گرفته‌اند. نمونه‌های این مطالعه در این دو کلاد قرار گرفته‌اند.

Dayrat و همکاران در (۲۰۲۰) این جنس را از نظر مولکولی و ریخت‌شناختی بررسی کردند. در مطالعه‌ی آن‌ها جنس *Peronia* مونوفایلیتیک بوده که درخت‌های مربوط به مارکر هسته‌ای و میتوکندریایی و نیز درخت‌های ترکیب شده، این مورد تأیید شده است. در مطالعه‌ی آن‌ها *P. madagascariensis* در کلاد خواهری *P. pelatei* قرار گرفته است. در این مطالعه نیز جنس *Peronia* مونوفایلیتیک بوده و گونه‌ی *P. madagascariensis* در کلاد خواهری *P. pelatei* قرار گرفته است. دو نمونه از این مطالعه در کلاد *P. madagascariensis* قرار گرفته که یکی مربوط به نمونه‌ی جزیره‌ی هرمز بوده و دیگر مربوط به نمونه‌ی سواحل بندر گواتر.

شبکه‌ی هاپلوتایپی نیز پیچیدگی کلاد *P. madagascariensis* را تأیید کرد به‌صورتی که برای آن، دو گروه هاپلوتایپی شامل هاپلوتایپ‌های دریای عمان و هاپلوتایپی از خلیج فارس و دیگری از اغلب نقاط حوزه‌ی پراکنش این گونه در خود جای داده

روشن‌تری در سطح پشتی و قهوه‌ای مایل به سبز روش در سطح شکمی می‌باشد. سطح پشتی به‌وسیله‌ی شمار زیادی برجستگی‌های زگیل مانند پوشیده شده است. این برجستگی‌ها در نمونه‌هایی با اندازه‌ی بدنی بزرگ تا ۴ میلی‌متر هم طول دارند. در نمونه‌های فیکس شده تشخیص این پاپیلاها از آبشش‌ها به راحتی امکانپذیر نیست. در قسمت نوک بعضی از این برجستگی‌ها لکه‌های چشمی سیاه‌رنگی دیده می‌شود. که تعداد آن‌ها بین ۸ تا ۱۲ عدد متفاوت است (در ۱۰ نمونه‌ی بررسی‌شده در مطالعه‌ی حاضر تعداد این برجستگی ۸ تا ۱۰ تا در افراد مختلف، متفاوت بوده است). آبشش‌های پشتی در این گونه نسبت به گونه‌های دیگر کشیده‌تر و متراکم‌تر می‌باشند. سوهانک در این گونه دارای یک ردیف دندان‌های میانی می‌باشد که دندان‌ها به سمت بیرون برآمده و دارای دو خار تیز هستند. دندان‌های کناری در ردیف‌های موازی قرار گرفته و کمتر از ۱/۸ طول ردیف دندان‌های بعدی را می‌پوشانند.

P. verculata بیشتر در سواحل صخره‌ای-قلوه‌سنگی و به ندرت در سواحل گلی دیده می‌شود. این گونه در هنگام جزر به سطوح سخت سنگ‌ها می‌چسبد و در هنگام مد در شکاف‌های تنگ سنگ‌ها قرار می‌گیرد. پراکنش جهانی این گونه از جنوب آفریقا خلیج فارس می‌باشد (Solanki et al., 2017) و در ایران تاکنون از جزیره‌ی هرمز، بندرلنگه و جزیره‌ی لاوان گزارش شده است (Dayrat et al., 2020; Maniei et al., 2020). در این مطالعه این گونه برای اولین بار در سواحل بندرعباس مشاهده گردیده است. طول بدن این گونه بین ۲ تا ۶ سانتیمتر متفاوت است. بدن سبز مایل به خاکستری دارای تعداد زیادی برجستگی‌هایی که بر روی بعضی از آن‌ها ۳ تا ۷ لکه‌ی چشمی دیده می‌شود، می‌باشند. پا عضلانی بوده و به‌صورت کامل توسط نوتوم پوشیده می‌شود. دو شاخک در قسمت سری (بین نوتوم و پا) چشم‌ها را حمل می‌کنند. مخرج در قسمت انتهایی بدن و بین پا و نوتوم قرار دارد، پنئوستوم در قسمت انتهایی بدن و در سطح داخلی

است. خلیج فارس دو هاپلوتایپ دارد که ۷ جهش با هم اختلاف دارند. از طرفی دریای عمان نیز دارای دو هاپلوتایپ که شش جهش با هم اختلاف دارند، می باشد. یکی از هاپلوتایپ های خلیج فارس در نزدیکی هاپلوتایپی از دریای عمان قرار گرفته که در درخت فیلوژنی ترسیم شده نیز یک زیر کلاد مجزا با ۹۹ درصد حمایت را تشکیل می دهند. هاپلوتایپ دیگر خلیج فارس در نزدیکی هاپلوتایپی از ماداگاسکار قرار گرفته است که در درخت فیلوژنی ترسیم شده نیز چنین نتیجه ای قابل مشاهده است. هاپلوتایپ دیگر دریای عمان در نزدیکی هاپلوتایپ های ماداگاسکار، آفریقای جنوبی و پاناما قرار گرفته است که در درخت فیلوژنی یک توالی از عمان در کنار توالی نمونه های ماداگاسکار و آفریقای جنوبی و پاناما قرار گرفته است. ماداگاسکار نیز دو هاپلوتایپ اصلی دارد که با فاصله ی سه جهش از هم قرار گرفته اند. از این میان فقط نمونه های موزامبیک یک هاپلوتایپ را تشکیل دادند. به صورت کلی نتایج آنالیز K2P، ترسیم شبکه ی هاپلوتایپی و نیز درخت فیلوژنی مؤید همدیگر هستند. آنالیز K2P نیز نشان داد که فاصله ی ژنتیکی بین نمونه های مناطق مختلف حوزه ی پراکنش این گونه کم بوده و بین صفر و یک درصد متغیر است. نمونه های خلیج فارس و دریای عمان یک درصد با هم فاصله ی ژنتیکی دارند و فاصله ی آن ها با نمونه های بقیه ی مناطق یک درصد می باشد.

در مطالعه ی Dayrat و همکاران (۲۰۲۰) توالی های مربوط به نمونه های گونه ی *P. verculata* در کلاد مونوفایلیتیک و با ۹۸ درصد حمایت قرار گرفتند. این کلاد خود شامل چهار زیر کلاد به ترتیب شامل مالزی و سنگاپور، ایران، پاکستان و غرب هند، ماداگاسکار و موزامبیک و در نهایت اندونزی و جزایر اندامان می باشند. در مطالعه ی حاضر نیز *P. verculata* پنج زیر کلاد به ترتیب شامل ایران، پاکستان و غرب هند، ماداگاسکار، فیلیپین و استرالیا، اندونزی و جزایر اندامان می باشند.

در این مطالعه برای اولین بار گونه ی *P. madagascariensis* از آب های ایرانی دریای عمان گزارش شده است. همچنین این مطالعه اولین تصویر الکترونیکی مربوط به سوهانک این گونه را در جمعیت شمال غرب اقیانوس هند ارائه می کند که با نتایج سایر مطالعات همخوانی دارد. نیاز است با توجه به ابهامات ذکر شده در بالا، به صورت بسیار گسترده و نیز با کمک نشانگرهای مولکولی بیشتر جمعیت های این دو گونه در آب های خلیج فارس و دریای عمان بررسی شوند.

در شبکه ی هاپلوتایپی ترسیم شده برای گونه ی

Maniei و همکاران در (۲۰۲۰) یک گونه ی جدید از این جنس را از سواحل جزیره لوان و بندرلنگه معرفی کردند. در مطالعه ی آن ها فقط از نشانگر میتوکندریایی COI استفاده شده و توالی مربوط به همه ی گونه های این جنس در آنالیزهای مولکولی آن ها ارائه نشده است. از طرفی با توجه به انشقاق میتوکندریایی درون گونه ای بسیار بالا در بین اعضای این خانواده (Goulding et al., 2018; Dayrat et al., 2019) نتایج مطالعه ی آن ها چندان قابل اتکا نیست و در مطالعه ی Dayrat و همکاران (با استفاده سه مارکر COI، 16S و 28S) و نیز مطالعه ی حاضر مشخص شد که تمام گونه های سواحل ایران در کلاد مربوط به گونه ی *P. verculata* و در کنار نمونه های پاکستان و غرب هند قرار می گیرند.

در این مطالعه برای اولین بار گونه ی *P. madagascariensis* از آب های ایرانی دریای عمان گزارش شده است. همچنین این مطالعه اولین تصویر الکترونیکی مربوط به سوهانک این گونه را در جمعیت شمال غرب اقیانوس هند ارائه می کند که با نتایج سایر مطالعات همخوانی دارد. نیاز است با توجه به ابهامات ذکر شده در بالا، به صورت بسیار گسترده و نیز با کمک نشانگرهای مولکولی بیشتر جمعیت های این دو گونه در آب های خلیج فارس و دریای عمان بررسی شوند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از خانم طهوری هاشمی مسئول آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه هرمزگان، به جهت همکاری های صمیمانه، کمال تشکر را دارند.

- analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41, 95-98.
- Leigh J.W., Bryant D. 2015. PopART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution* 6(9), 1110-1116.
- Liu C., Wei L., Shen H.D., Zhu H.C., Zhou N. 2015. Complete mitochondrial genome of *Peronia verruculata* (Gastropoda: Pulmonata: Systellommatophora: Onchidiidae). *Mitochondrial DNA* 26(5), 753-754.
- Maniei F., Espeland M., Movahedi M., Wägele H. 2020. Description of a new *Peronia* species (Gastropoda: Eupulmonata: Onchidiidae) from Iran, Persian Gulf. *Zootaxa* 4758(3), 501-531.
- Silvestro D., Michalak I. 2012. RaxML GUI: a graphical front-end for RAML. *Organisms Diversity & Evolution* 12(4), 335-337.
- Solanki D., Kanejiya J., Gohil B. 2017. Studies on ecological status, nutritive values and exploitation of *Peronia verruculata*, Cuvier, 1830 (Gastropoda: Onchidiidae) from Gulf of Khambhat, India. *The Journal of Zoology Studies* 4(3), 24-28.
- 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(10), 2731-2739.
- Villesen P. 2007. FaBox: an online toolbox for Fasta sequences. *Molecular Ecology Notes* 7(6), 965-968.
- منابع
- Bitaab M.A., Ranaei Siadat S.O., Pazooki J., Sefidbakht Y. 2015. Antibacterial and molecular dynamics study of the Dolabellin B2 isolated from sea slug, *Peronia peronii*. *Biosciences Biotechnology Research Asia* 12(3), 2023-2035.
- Dayrat B. 2009. Review of the current knowledge of the systematics of Onchidiidae (Mollusca: Gastropoda: Pulmonata) with a checklist of nominal species. *Zootaxa* 2068(1), 1-26.
- Dayrat B., Goulding T.C., Apte D., Bhave V., Comendador J., Ngô X.Q., Tan S.K., Tan S.H. 2016. Integrative taxonomy of the genus *Onchidium* Buchannan, 1800 (Mollusca, Gastropoda Pulmonata, Onchidiidae). *ZooKeys* 636, 1-40.
- Dayrat B., Goulding T.C., Khalil M., Apte D., Bourke A.J., Comendador J., Tan S.H. 2019. A new genus and three new species of mangrove slugs from the Indo-West Pacific (Gastropoda: Euthyneura: Onchidiidae). *European Journal of Taxonomy* 2019(500), 1-77.
- Dayrat B., Goulding T.C., Khalil M., Apte D., Bourke A.J., Comendador J., Tan S.H. 2020. Systematic revision of the genus *Peronia* Fleming, 1822 (Gastropoda, Euthyneura, Pulmonata, Onchidiidae). *ZooKeys* 972, 1-224
- Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3(5), 294-299.
- Goulding T.C., Tan S.H., Tan S.K., Apte D., Bhave V., Narayana S., Salunkhe R., Dayrat B. 2018. A revision of *Peronia* Plate, 1893 (Gastropoda: Euthyneura: Onchidiidae) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences, morphology, and natural history. *Invertebrate Systematics* 32(4), 803-826.
- Guindon S., Gascuel O. 2003. A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. *Systematic Biology* 52(5): 696-704.
- Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and

Morphological and molecular analysis of the members of genus *Peronia* Fleming, 1822 (mollusks, Gastropoda) along the Iranian waters of the Persian Gulf and the Gulf Oman

Yaser Fatemi¹, Mohammad Reza Taherizadeh*¹, Adnan Shahdadi¹, Hamidreza Esmaili²

¹Department of Marine Biology, Faculty of Marine Sciences and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.

²Department of Biology, School of Science, Shiraz University, Shiraz, Iran.

*Corresponding author: taheeri.1965@gmail.com

Received: 2022/2/16

Accepted: 2022/3/18

Abstract

The genus *Peronia* Fleming, 1822 by having 14 species, is one of the most diverse genera of the Onchidiidae family, which is highly distributed in the waters of the Persian Gulf and the Sea of Oman. Despite their important ecological role in these areas, unfortunately, they have not been well studied so far. In this study, while describing the morphological characteristics of two species of this genus, *Peronia madagascariensis* (Labbé, 1934) and *P. verruculata* (Cuvier, 1830) with the help of a fragment sequence of a cytochrome oxidase gene, their status was determined. In this study, for the first time radulla belonging to the members of this genus in the northwestern Indian Ocean region were photographed and *P. madagascariensis* was reported from Iranian waters of the Oman Sea.

Keywords: Bandar-Abbaas, Gwatr, Biodiversity, Phylogeny.