View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Aquatic Commons

بررسی تنوع ژنتیکی جنس *Crassostrea* در سواحل بندر امام خمینی با روش تعیین توالی ژن 16S rRNA

زینب احمدی[۱]، حسین ذوالقرنین[۱]*، بیتا ارچنگی[۱]، ابراهیم رجب زاده[۲]، عامر کعبی پوزه[۳]

۱. گروه زیست دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر
۲. گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر
۳. گروه علوم پایه، دانشکده مهندسی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۳/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۱/۲۰

چکیده

پلی‌مورفیسم توالی نوکلئوتیدی مربوط به ژن 16S rRNA ژنوم میتوکندریایی صدف خوراکی (Oyster) خلیج فارس (*Crassostrea* sp.)، در ۳۰ نمونه اویستر جمع آوری شده از بندر امام خمینی بررسی شد. مورد بررسی قرار گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلی مراز با یک جفت آغازگر برای تمام نمونه‌ها انجام، سپس محصولات زنجیره‌ای پلی‌مراز، با روش ختم زنجیره، توالی یابی شدند. سپس اطلاعات به دست آمده از طریق برنامه‌ها و نرم افزارهای BioEdit ver 7.0، MEGA Ver 5.0 و DnaSP Ver 5.0 مورد آنالیز شدند قرار گرفتند. برای ژن مورد بررسی تنها ۲ موتاسیون مشاهده شد و تنوع نوکلئوتیدی (Pi) ۰/۰۰۰۶۱ محاسبه گردید. در میان ۳۰ نمونه، تعداد ۳ هاپلوتیپ شناسایی شد و میانگین تنوع هاپلوتیپی (Hd) ۰/۱۹۵ محاسبه گردید. هاپلوتیپ‌های به دست آمده از تحقیق حاضر برای اولین بار در بانک ژنی ثبت شدند گردیدند. رسم درخت‌های فیلوژنی حاصل از داده‌های توالی یابی ژن مورد نظر هیچ جدائی مشخصی را برای نمونه‌های مورد مطالعه در بندر امام خمینی فراهم نکرد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که تمایز توالی پائینی در جمعیت مورد بررسی در بندر امام خمینی وجود دارد.

واژگان کلیدی: 16S rRNA، *Crassostrea* sp.، آغازگر، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، توالی یابی

*نویسنده مسوول، پست الکترونیک: zolgharnein@kmsu.ac.ir

۱. مقدمه

در جهان صدف‌های خوراکی مهم‌ترین رده‌ی دوکفه‌ای‌های کشت شده هستند و با قیمتی بالا به بازار عرضه می‌شوند. غذاهای دریایی مانند صدف‌های خوراکی از دیرباز مورد استفاده قرار می‌گرفتند و جنس *Crassostrea* در سراسر جهان از نظر اقتصادی، گروه ارزشمندی به شمار می آید می‌رود. در کشور چین کشت گونه‌های *Crassostrea*، تاریخچه‌ای حدود ۷۰۰ سال دارد (Lam *et al*., 2003).

گونه‌های *Crassostrea*، موجوداتی هستند که هم کلنی تشکیل می‌دهند و هم طراح اکوسیستم به شمار می‌روند. گونه‌هایی که کلنی تشکیل می‌دهند، باروری بالا و تخم‌ریزی گسترده‌ای دارند. آن‌ها اغلب اولین ارگانیسم‌هایی هستند که در پاسخ به تغییر محیط فیزیکی‌شان آشیان‌های جدیدی را اشغال می‌کنند. طراحان اکوسیستم، محیط فیزیکی را برای بقای بیشتر تغییر می‌دهند و آشیان‌هایشان را می‌سازند. قابلیت سازندگی این صدف‌های خوراکی، آن‌ها را قادر به کنترل اکوسیستم ساخته است. جمع آوری صدف‌ها برای ساخت زیرلایه‌هایی برای نسل‌های آینده و انجام آمیزش بین نسل‌ها (سلول‌های جنسی حاصل از صدف‌های خوراکی مسن‌تر می‌توانند با سلول‌های جنسی صدف‌های خوراکی جوان‌تر لقاح کنند) سبب حفاظت از تنوع ژنتیکی می‌شود. قابلیت طراحی و تشکیل کلنی اجازه می‌دهد که صدف‌های خوراکی در محیط‌های بسیار پویای سواحل دریاها و مصب‌ها که تحت فشار طوفان‌ها و دگرگونی‌های فیزیکی و بالا و پائین رفتن سطوح آب هستند، مقاومت بالایی از خود نشان دهند (Dame, 1996).

اویسترها با سرعت بالایی ستون‌های آبی را فیلتر می‌کنند (Newell and Langdon, 1996). به علت سرعت بالای فیلتراسیون، اویسترها به عنوان حذف کننده‌های زیستی شناخته می‌شوند که آلودگی‌های موجود در سیستم‌های باتلاقی و مصبی را کاهش می‌دهند (Breitburg *et al*., 2000).

از طرفی اویسترها، تجمع دهندگان زیستی بسیار کارآمدی برای فلزات سنگینی مانند سرب و کادمیوم به شمار می‌روند. بررسی ژنتیک و بیوشیمی اویسترها و پاسخ آنها به فلزات سنگین زمینه‌ی فعالی از تحقیقات را به خود اختصاص داده است (Tanguy *et al*., 2001). همچنین اویسترها به میزان قابل توجهی کربنات را رسوب می‌دهند و نقش زیادی در چرخه‌ی کربن دارند و نمونه‌ای برای مطالعات مربوط به معدنی سازی زیستی به شمار می‌روند (Mount *et al*., 2004).

توالی‌های ژنومی آبزیان، زمینه‌ی بهبود محصول را پشتیبانی خواهد کرد و اجازه می‌دهند که ژنتیک جمعیت به هدف نهایی خود که فهم و استفاده از تنوع ژنتیکی است دست یابد (Hedgecock *et al*., 2005).

صدف‌های خوراکی آنیوپلوئید، تریپلوئید و تتراپلوئید به شکل گسترده‌ای تولید می‌شوند (Guo and Allen 1994; Eudeline *et al*., 2000). صدف‌های خوراکی تریپلوئید به علت نداشتن گنادهای پیشرفته و رشد بسیار زیادشان، به طور تجاری کشت می‌شوند. این ذخایر، منابع بیولوژیکی ممتازی برای نقشه برداری‌های ژنی به حساب می‌آیند (Guo and Allen, 1996; Hedgecock *et al*., 2003).

تقارن دو طرفه‌ای در سه شاخه از جانوران کشف شده است: دتروستوما (که شامل بی‌مهرگان است) و دو شاخه از پروتوستوما، Ecdysozoa (که شامل آرتروپودا و نماتودا است) و Lophotrochozoa (که شامل نرمتنان و آنلیدا است). دوکفه‌ای‌ها گروهی از نرمتنان هستند که اویسترها در این گروه جای دارند. صدف‌های خوراکی اقیانوس آرام یکی از کوچک‌ترین ژنوم‌های دوکفه‌ای‌ها را دارند. در ارتباط Lophotrochozoaها بر روی آنالیزهای فیلوژنتیکی جنینی و تنوع طرح بدن (Kourakis and Martindale, 2001) و تکامل مکانیسم‌های مولکولی مربوط به ایمنی و پاسخ به استرس‌ها شامل فلزهای سنگین (Escoubas *et al*., 1999; Tanguy and

(Moraga, 2001; Jenny *et al*., 2002) تأکید شده است. پیشرفت در این زمینه‌ها و دیگر مطالعات مقایسه‌ای، دسترسی به توالی ژنومیکی صدف‌های خوراکی را تسهیل کرده است (Hedgecock *et al*., 2005).

به علت سطوح بالای اشکال فنوتیپی، شاخص‌های مورفولوژیک روش مطمئنی برا بررسی جمعیت‌های مورد مطالعه نمی‌باشند (Boudry *et al*., 1998). امروزه ارزیابی ساختار جمعیتی و محافظت از ذخایر ژنی گونه‌های دریایی، به واسطه پیشرفت نشانگرهای مولکولی DNA امکان پذیر گشته است (Campton, 2004; McAndrew, 2001). به دلیل اینکه mtDNA تنوع قابل توجهی را در میان افراد نشان می‌دهد، به عنوان یک نشانگر کارآمد برای بررسی ساختار جمعیت در محدوده‌های جغرافیایی متفاوت، مورد استفاده قرار می‌گیرد (Avise, 1994).

مناطق دریایی با دارا بودن طیف وسیعی از زیستگاه‌ها دارای بیش‌ترین تنوع بیولوژیکی بر روی سیاره زمین می‌باشند. این تنوع شامل اغلب گونه‌های بی‌مهره است که اکثراً دارای دوره‌های زندگی پیچیده با فازهای لاروی پلانکتونیک هستند (Thorson, 1950). با این وجود، گونه‌های دریایی محدودی در تحقیقات بیولوژیکی و توالی‌یابی ژنومی مورد استفاده قرار گرفته‌اند (مانند ارکین دریایی ارغوانی Stronylocentrotus، اسیدین Ciona)، که دلیل انتخاب این گونه‌ها را می‌توان، مزیت آنها در بررسی روند توسعه و تکامل ژنومی دانست. توالی‌های مربوط به ژنوم گونه‌های *Crassostrea* نه تنها در مطالعات مربوط به مقایسه‌ی ژنومی مورد استفاده قرار می‌گیرد بلکه طیف وسیعی از مطالعات ژنومی مربوط به بیولوژی نرمتنان صدف‌دار از طریق این مدل گونه‌ای امکان پذیر گشته است (Hedgecock *et al*., 2005).

اگرچه دوکفه‌ای‌ها به خاطر نقش اکولوژیکی و اهمیت اقتصادی از جمله‌ی ارگانیسم‌هایی دریایی هستند که مطالعات زیادی روی آنها انجام شده، ولی اطلاعات بسیار کمی در مورد توالی‌های ژنومی گونه‌های صدف خوراکی انجام گرفته است (Flrury *et al*., 2009). از این روش جهت بررسی روابط و تنوع ژنتیکی گونه-های مختلف *Crassostrea* نظیر *Crassostrea gigas* (Hubert و Hedgecock در سال 2003) (Li و همکاران در سال 2003) *Crassostrea rivularis* (Tianfeng و همکاران در سال 2004) (Wang و همکاران در سال 2004) (Aranishi و همکاران در سال 2005) *Crassostrea Ariakensis* (Tianfeng و همکاران در سال 2005) استفاده شده است.

چندین عامل باعث پیشرفت منابع ژنومی صدف‌های خوراکی شده است. این گونه‌ها بیشترین تولید سالیانه را در بین جانوران آبزی دارند و از لحاظ اقتصادی ارزشمند هستند؛ از این رو در مطالعه‌ی ماکرو مولکول‌های بنیادی و مکانیسم‌های ژنتیکی و فیزیولوژِیکی مورد بررسی قرار می‌گیرند. از طرفی فیلوژنی اویسترها در Lophotrochozoa قرار گرفته است که یک شاخه از موجوداتی هستند که تقارن دو طرفه دارند و این اویسترها را برای مطالعات مربوط به تکامل ژنومی بسیار مناسب ساخته است. همچنین اویسترها در حفاظت از مصب‌ها و سواحل دریایی در مواردی مانند افزایش فعالیت‌های انسانی که باعث ایجاد بیماری و استرس در جمعیت‌ها می‌شود، نقش مهمی ایفا می‌کنند. در نهایت این‌که اویسترها اگر در زیستگاه جدید قرار بگیرند می‌توانند به عنوان یک گونه‌ی مهاجم عمل کنند (Ruesink *et al*., 2005).

در نتیجه گونه‌های *Crassostrea* جهت بررسی ساختار ژنومی، ایمونولوژی مقایسه‌ای (Bachere *et al*., 2004)، اکولوژی بیماری (Samain *et al*., 2007)، واکنش به آلودگی‌ها و انگل‌ها (Tanguy *et al*., 2005) ، فیزیولوژی تولید مثل (Fleury *et al*., 2008) و ژنتیک تکاملی (Sauvage *et al*., 2007) مورد استفاده قرار می‌گیرند.

هدف از این تحقیق بررسی تنوع ژنتیکی گونه‌ی *Crassostrea* در منطقه‌ی بندر امام خمینی با روش

تعیین توالی ناحیه 16S rRNA ژنوم میتوکندریایی است.

۲. مواد و روش‌ها

نمونه برداری

پس از بررسی منطقه و تعیین ایستگاه‌ها در آبان ماه سال ۱۳۹۰، تعداد ۳۰ عدد صدف خوراکی از بندر امام خمینی جمع آوری گردید. این صدف‌های خوراکی از تأسیسات نفتی داک سرسره (عرض جغرافیایی "۹ ´۲۵/۴ °۳۰ و طول جغرافیایی "۴۴ ´۴/۹ °۴۹)، اسکله پتروشیمی (عرض جغرافیایی " ۱۵ ´۲۵/۳۵ °۳۰ و طول جغرافیایی "۱۷ ´۶/۳۱ °۴۹)، پتروشیمی گوهری (عرض جغرافیایی "۲۱/۴۷ ´۲۶ °۳۰ و طول جغرافیایی "۴/۸۳ ´۷ °۴۹) جدا گردیدند و بلافاصله پس از برداشت، بافت صدف‌های خوراکی جداسازی و در اتانول ۹۶ درصد تثبیت شد. نمونه‌ها جهت انجام عملیات آزمایشگاهی به آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر انتقال داده شدند. در این مطالعه به منظور استخراج DNA نمونه‌های صدف خوراکی جمع‌آوری شده، از روش CTAB (Shivji *et al*., 1992) استفاده شد. برای بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده و همچنین تعیین خلوص آن، به ترتیب از روش‌های اسپکتروفتومتری و الکتروفورز استفاده گردید.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)

تکثیر جایگاه‌های ژنی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۵ میکرولیتر و شرایطی شامل ۱۰۰ نانوگرم DNA، ۵۰ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۱۰۰ میکرومول از هر کدام از آغازگرها (F:CGCCTGTTTAACAAAAACAT و R:CCGGTCTGAACTCAGATCACGT)، ۱۰ میلی‌مولار dNTP، ۵ واحد بین المللی Taq DNA Polymerase، بافر 10X PCR و آب مقطر تا رسیدن به حجم انجام گرفت.

سیکل حرارتی داده شده به دستگاه PCR عبارت بود از ۳ دقیقه در ۹۴ سانتی‌گراد، در ادامه ۳۰ سیکل شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، درجه حرارت اتصال (۵۱ درجه سانتی‌گراد) ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، با یک بسط نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳ دقیقه. بعد از اتمام چرخه‌ها، تیوب‌ها از دستگاه خارج و در یخچال ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. برای بررسی کمیت و کیفیت محصول PCR و همچنین تعیین خلوص آن، به ترتیب از روش‌های اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد استفاده گردید.

آنالیز آماری

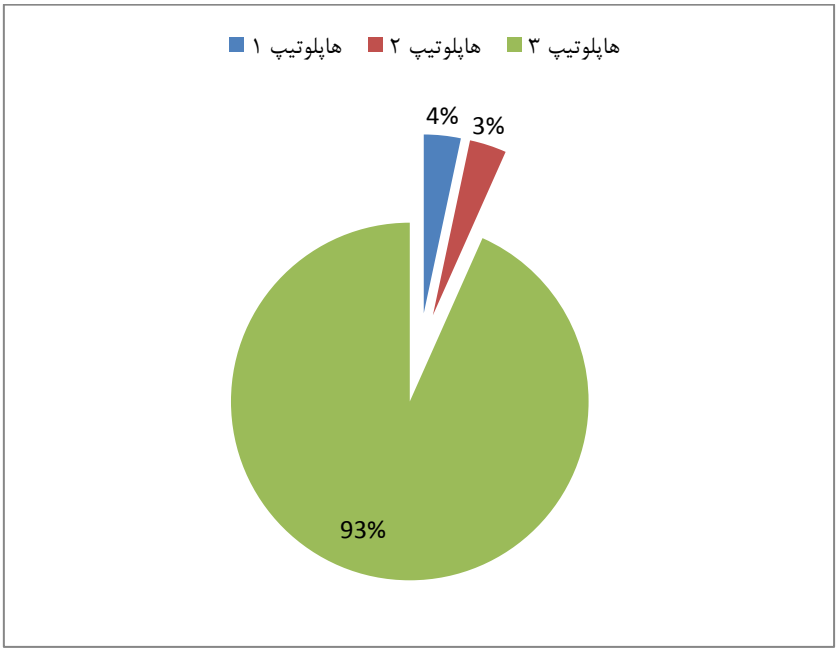
تعیین توالی ژنوم توسط شرکت تکاپوزیست به روش توالی‌یابی خودکار و توسط دستگاه Automated sequencing 3700 ABI machine انجام گردید. پس از تعیین توالی اطلاعات به دست آمده از طریق برنامه‌ها و نرم افزارهای BioEdit ver 7.0 (Hall, 1999)، MEGA ver 5.0 (Tamura *et al*., 2007) و DnaSP ver 5.0 (Rozas, 2003) مورد آنالیز قرار گرفتند.

به منظور مقایسه‌ی توالی‌های 16S rRNA مربوط به گونه‌ی مورد نظر در منطقه‌ی بندر امام خمینی در ابتدا توالی‌ها با استفاده از برنامه CLUSTAL W در نرم افزار BioEdit Ver 7.0 هم‌تراز شدند؛ سپس به صورت دستی برای به حداقل رساندن بازهای ناجور، مورد بازبینی قرار گرفتند. برای اندازه‌گیری مکان‌های پلی‌مورفیسم و تنوع ژنتیکی و محاسبه‌ی شاخص‌هایی همچون تنوع نوکلئوتیدی، تنوع و فراوانی هاپلوتیپ‌ها، از نرم افزار DnaSP ver 5.0 استفاده گردید.

درخت تبارزایی به روش پیوند همجواری (NJ) با استفاده از نرم افزار MEGA Ver 5.0 رسم شد. همچنین آنالیز Bootstrap برای شاخه‌ها ۱۰۰۰ بار تکرار شد. قابل ذکر است توالی مربوط به 16S *Ostrea chilensis*، که از که از نظر رده بندی فاصله قابل قبولی با اویستر مورد مطالعه دارد، به عنوان برون گونه استفاده شد.

۳. نتایج

با مقایسه‌ی توالی‌های ژن 16S rRNA با طول تقریبی ۵۰۰ جفت باز در بندر امام خمینی توسط CLUSTAL-W، تنها ۲ مکان متغیر و تعداد ۲ موتاسیون مشاهده شد که از نوع جانشینی منفرد بودند. همچنین برای ژن مورد بررسی، تعداد ۳ هاپلوتیپ مشاهده شد. هاپلوتیپ‌های به دست آمده از تحقیق حاضر با شماره ژنی HF549037، HF549038 و HF549039 برای اولین بار در بانک ژنی ثبت شدند. تنوع هاپلوتیپی (Hd) در ایستگاه بندر امام خمینی ۰/۱۹۵ و تنوع نوکلئوتیدی (Pi)، ۰/۰۰۰۶۱ تخمین زده شد. همچنین درخت‌های تبارزایی حاصل از داده‌های توالی‌یابی ژن 16S rRNA هیچ جدائی مشخصی را برای نمونه‌های نواحی مورد مطالعه در خلیج فارس، فراهم نکرد.



شکل ۱. فراوانی هر یک از هاپلوتیپ‌های بدست آمده از ایستگاه بندر امام خمینی

شکل ۲. درخت تبارزایی اویستر خلیج فارس (*Crassostrea* sp.) بر اساس مقایسه‌ی توالی 16S rRNA به روش NJ.

۴. بحث و نتیجه گیری

هاپلوتیپ‌ها شاخصی هستند که برای نشان دادن تفاوت ژنتیکی جمعیت‌ها استفاده می شود. تراز تنوع ژنتیکی یا تنوع هاپلوتیپی می‌تواند از صفر (تمام افراد جمعیت دارای هاپلوتیپ یکسان) تا یک (همه‌ی افراد جمعیت دارای هاپلوتیپ متفاوت) متغیر باشد

(Aboim *et al*., 2005). در تحقیق حاضر تنوع هاپلوتیپی ۰/۱۹۵ محاسبه گردید. بر این اساس می‌توان گفت تنوع هاپلوتیپی در بندر امام خمینی پائین است. همچنین تنوع نوکلئوتیدی ۰/۰۰۰۶۱ محاسبه شد که این تغییر از نوع جانشینی منفرد بود. تعداد و درصد پائین جایگاه‌های پلی‌مورف و تعداد کم هاپلوتیپ‌ها نشان می‌دهد که تنوع ژنوم میتوکندریایی اویستر *Crassostrea* sp. در منطقه‌ی مورد مطالعه پائین است. از طرفی در مطالعات فیلوژنتیکی دیگری که بر روی نواحی کد شونده‌ی mtDNA مربوط به جمعیت‌های وحشی و کشت شده‌ی صدف‌های خوراکی اقیانوس آرام و از طریق آنالیز PCR-RFLP مربوط به ژن‌های COI و 16S rRNA (Boudry *et al*., 1998) و از طریق آنالیز توالی نوکلئوتیدی ژن‌های COI و 16S rRNA (Boudry *et al*., 2003) صورت گرفت، نتایج بدست آمده از این مطالعات بسیار متناقض بودند. مطالعه‌ی آخر آشکار ساخت که تنها ۳ و ۱ مکان متغیر از قطعات COI و 16S rRNA بدست آمد، بنابراین فرکانس نسبی تغییر نوکلئوتیدی تنها ۰/۵۴ درصد و ۰/۲۴ درصد تخمین زده شد. با توجه به این یافته‌ها آشکار شد که قطعه‌ی غیر کد شونده D-loop تنوع توالی نوکلئوتیدی بالاتری را نشان می دهد و قطعات کد شونده‌ی mtDNA که پلی‌مورفیک کمتری دارند از حفاظت و ثبات بیشتری برخوردار هستند (Aranishi *et al*., 2005).

شاخص دیگری که در مطالعه‌ی حاضر جهت تعیین فاصله ژنتیکی جمعیت *Crassostrea* sp. در منطقه‌ی مورد بررسی از آن استفاده شد، رسم درخت‌های تبارزایی بود. درخت‌های تبارزایی مسیرهای تکاملی را نشان می‌دهند و جهت تعیین روابط تکاملی می‌توان از آن‌ها بهره‌جست. هرچه موجودات مورد بررسی شباهت بیشتری در مولکول‌های توارثی داشته باشند، از خویشاوندی بیشتری برخوردارند. لذا در بیشتر موجودات زنده از داده‌های مربوط به توالی DNA، جهت تعیین روابط تکاملی استفاده می‌شود (Lundrigan *et al*., 2005). درخت تبارزایی بر اساس روش پیوند همجواری (NJ)، رسم شد. درخت تبارزایی رسم شده بر اساس داده‌های توالی‌یابی ژن 16S rRNAتمایز توالی پائینی را در نمونه‌های مورد مطالعه نشان داد و لذا نمونه‌های مورد نظر بدون جدائی مشخص در کنار یکدیگر قرار گرفتند.

عوامل زیادی ساختار ژنتیک جمعیت را در موجودات دریایی تحت تأثیر قرار می‌دهد از جمله، عوامل طبیعی مانند نوسانات آب و هوایی و جریانات دریایی و تغییر سطح آب (Rocha *et al*., 2008) و عواملی نظیر توانایی محدود پراکنش به واسطه‌ی سدهایی از جمله دما، شوری و جریانات اقیانوسی است که جریان ژنی را تحت تأثیر قرار می‌دهند و در نهایت سبب کاهش تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها می شوند (Launey *et al*., 2002). از آنجایی که خلیج فارس محیط نسبتاً بسته‌ای دارد، تفاوت اندک ژنتیکی در منطقه‌ی مورد بررسی نیز دور از انتظار نیست. همچنین می‌توان به نقش پدیده‌ی سازش گونه‌ای و انتخاب طبیعی نیز اشاره کرد. شرایط ویژه‌ی خلیج فارس از جمله شوری بالا و نوسانات دمایی سبب شده است که قسمت عمده‌ای از گونه‌های مهاجم ورودی قادر به ادامه حیات نباشند. در واقع حضور این گونه‌ها در مخزن آب توازن نشان دهنده‌ی مقاومت بالای این گونه‌ها در برابر شرایط نامساعد مخزن است. شرایط ناسازگاری از قبیل تاریکی، غذای محدود در دسترس، مدت زمان طولانی مسیر طی شده موجب کاهش تنوع و فراوانی گونه‌ای و در نتیجه استقرار گونه‌های مقاوم می‌گردد (Yoshida *et al*., 1996; Chu *et al*., 1997). همچنین می‌توان گفت عواملی چون درون‌زائی در کاهش تنوع ژنتیکی افراد جمعیت مورد نظر دخالت داشته است که در نهایت سبب گشته است که جمعیت *Crassostrea* sp. در این منطقه به شکل هموژن در آید.

جهت مقایسه و اطمینان از نتایج این تحقیق، بکارگیری روش‌های ژنتیکی دیگر و طراحی آغازگرهای اختصاصی، به منظور مطالعه ساختار

جمعیتی صدف‌های *Crassostrea* sp. در خلیج فارس پیشنهاد می شود.

منابع

Aboim, M. A., Menezes, G. M., Sehlitt. T. and Rogers, A.D. 2005. Genetic structure and history of population of the deep-sea fish *Helicolenus dactylopterusinferred* from mtDNA sequence analysis. Mol. Ecol. 14: 1343- 1354.

Aranishi, F. and Okioto, T. 2005. Sequence polymorphism in novel noncoding region of Pacific oyster mitochondrial DNA. J. Appl. Gen. 46(2), 201-206 pp.

Bachere, E., Gueguen, Y., Gonzalez, M., de Lorgeril, J., Garnier, J. and Romestand, B. 2004. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas.* Immunol. Rev, 198:149-168.

Boudry, P., Heurtebise, S., Collet, B., Cornette, F. and Gerard, A. 1997. Differentiation between populations of the Portuguese oyster, *Crassostrea angulata* (Lamark) and the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), revealed by mtDNA RFLP Analysis. Elsevier. 226: 279-291.

Boudry, P., Heurtebise, S., Collet, B., Cornette, F. and Ge´rard, G. 1998. Differentiation between populations of the Portuguese oyster, Crassostrea angulata (Lamarck) and the Pacific oyster, Crassostrea gigas (Thunberg), revealed by mtDNA RFLP analysis. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 226: 279–291.

Breitburg, D.L., Coen, L.D., Luckenbach, M.W., Posey, M. and Wesson, J.A., 2000. Oyster reef restoration: Convergence of harvest and conservation strategies. J Shellfish Res, 19(1): 371-377.

Campton, D. E. 2004. Sperm competition in salmon hatcheries: the need to institutionalize genetically benign spawning protocols.Trans. Am. Fish. Sos. 133: 1277 –1289.

Chu, K. H., Tam, P. F., Fung, C. H. and Chen, Q. C. 1997. A biological survey of ballast water in container ships entering Hong Kong. Hydrobiologia. 352: 201–206.

Dame, R.F. 1996. Ecology of Marine Bivalves: An ecosystem approach. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Fleury, E., Fabioux, C., Lelong, C., Favrel, P. and Huvet, A. 2008. Characterization of a gonad-specific transforming growth factor-beta superfamily member differentially expressed during the reproductive cycle of the oyster *Crassostrea gigas*. Gene. 410:187-196.

Fleury, E., Huvet, A., Lelong, C., de Lorgeril, J., Boulo, V., Gueguen, Y., Bachère, E., Tanguy, A., Moraga, D., Fabioux, C., Lindeque, P., Shaw, J., Reinhardt, R., Prunet, P., Davey, G., Lapègue, S., Sauvage, C., Corporeau, C., Moal, J., Gavory, F., Wincker, P., Moreews, F., Klopp, C., Mathieu, M., Boudry, P., Favrel, P. 2009. Generation and analysis of a 29,745 unique Expressed Sequence Tags from the Pacific oyster (Crassostrea gigas) assembled into a publicly accessible database: the GigasDatabase. BMC Genomics. pp: 10- 341.

Hall, T. A. 1999. BIOEDIT: A user-friendly biological sequence aligment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp. Ser. 41: 95-98.

Hedgecock, D., Gaffney, P.M., Goulietquer, P., Guo, X., Reece, K. and Warr, G.W. 2005. The case for sequencing the Pacific oyster genome. J Shellfish Res, Vol. 24, No. 2: 429–44.

Hubert, s. and Hedgecock, D., 2003. Linkage maps of microsatellite DNA markers for the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Genetics, 168: 351–362.

Lam, K. and Morton, B., 2003. Mitochondrial DNA and morphological identification of a new species of Crassostrea (Bivalvia: Ostreidae) cultured for centuries in the Pearl River Delta, Hong Kong, China. Aquaculture, 228: 1 –13.

Launey, S., Ledu, C., Boudry, P., Bonhomme, F. and Naciri-Graven, Y. 2002. Geographic structure in the European flat oyster (*Ostrea edulis* L.) as revealed by microsatellite polymorphism. J Hered. 93:331–338.

Li, G., Hubert, S., Bucklin, K., Ribes, V. and Hedgecock, D., 2003. Characterization of 79 microsatellite DNA markers in the Pacific oysters *Crassostrea gigas.* Mol. Ecol. Notes, 3: 228–232.

Lundrigan, T.A ., Reist, J.D., Ferguson, M.M. 2005. Microsatellite genetic variation within and among Arctic charr (Salvelinus alpinus) from aquaculture and natural populations in North America. Aquaculture. 244: 63–75.

McAndrew, B. 2001. Rapid genetic improvement in aquaculture? In: Coimbra, J. (Ed.), Modern Aquaculture in the Coastal

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutioary Genetic Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evo. 24: 1596-1599.

Tanguy, A. and Moraga, D., 2001. Cloning and characterization of a gene coding for a novel metallothionein in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (CgMT2): a case of adaptive response to metal-induced stress? Gene, 273: 123–130.

Tanguy, A., Boutet, I., Laroche, J. and Moraga, D. 2005. Molecular identification and expression study of differentially regulated genes in the Pacific oyster Crassostrea gigas in response to pesticide exposure. Febs J. 272(2): 390-403.

Tianfeng, S., Shigui, J., Caiyan, Z. and Jinfeng, W., 2004. Genetic Diversity of Crassostrea rivularis in Zhenhai Bay by Analyzing mtDNA 16S rRNA Gene Sequence. Journal of Zhanjiang Ocean University, 24(4): 1-5.

Tianfeng, S., Shigui, J., Caiyan, Z., Falin, Z. and Pimao, C., 2005. Genetic diversity of {\sl Crassostrea} from Qinzhou Bay in Guangxi using mtDNA 16S rRNA gene fragment sequence analysis. J Fishery Sciences of China, 12(1): 1-4.

Thorson, G. 1950. Reproductive and larval ecology of marine bottom invertebrates. Biol. Rev. 25: 1–45.

Wang, H., Gue, X., Zhang, G. and Zhang, F., 2004. Classification of jinjiang oysters Crassostrea rivularis (Gould, 1861) from China, based on morphology and phylogenetic analysis. Aquaculture, 242: 137–155.

Yoshida, M., Fukuyo, Y., Murase, T. and Ikegami, T. 1996. On-board observations of phytoplankton viability in ships' ballast tanks under critical light and temperature conditions. In: Yasumoto, T., Oshima, Y., Fukuyo, Y. (Eds.), Harmful and Toxic Algal Blooms. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris. pp: 205– 208.

Zone- Lessons and Opportunities. IOS Press, Amsterdam, Netherlands. pp: 212–230.

Mount, A.S., Wheeler, A.P., Paradkar, R.P and Snider, D., 2004. Hemocytemediated shell mineralization in the eastern oyster. Science, 304:297–300.

Newell, R.I.E. and Langdon, C.J., 1996. Mechanisms and physiology of larval and adult feeding. *In:* V.S. Kennedy, R.I.E. Newell and A.F. Eble, (eds). The Eastern Oyster *Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant College, University of Maryland, College Park, Maryland. pp. 185-229.

Rocha, L. A., Rocha, C. R., Robertson, D. R. and Bowen, B. W. 2008. Comparative phylogeography of Atlantic reef fishes indicates both origin and accumulation of diversity in the Caribbean. BMC Evol Biol. 8-157.

Rozas, J., Sanchez-Delbarrio, J. C., Messeguer, X., and Rozas, R. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analysis by the coalescent and other methods. Bioinformatics. 19: 2496-2497.

Ruesink, J. L., Lenihan, H. S., Trimble, A. C., Heiman, K. W., Micheli, F., Byers, J. E. and Kay, M. C. 2005. Introduction of non-native oysters: Ecosystem effects and restoration implications. Ann. Rev. Ecol. Evol. Syst. 36: 643-689.

Samain, J. F., Dégremont, L., Soletchnik, P., Haure, J., Bédier, E.,Ropert, M. *et al*. 2007. Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection process. Aquaculture. 268(1– 4): 227-243.

Sauvage, C., Bierne, N., Lapegue, S., Boudry, P. 2007. Single Nucleotide polymorphisms and their relationship to codon usage bias in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Gene. 406(1–2): 13-22.

Shivji, M. S., Rogers, S. O., and Stanhope, M. J. 1992. Rapid isolation of high molecular weigh8 DNA from marine macroalgae. Marine Ecol. Prog. Ser. 84197-203.

Genetic diversity of Crassostrea genus using 16S rRNA from coastal of Emam Khomayni Port

Ahmadi, Zaynab[1]., Zolgharnein, Hossein[1]., Archangi, Bita[1]., Rajabzadeh. Ebrahim[2]., Kabi, Amer[3]

1. Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, University, Khorramshahr, Iran
2. Department of Marine natural Source, Faculty of Marine natural Source, University, Khorramshahr, Iran
3. Department of Basic Science, Faculty of Marine Economy, University, Khorramshahr, Iran

Abstract

Nucleotide sequence polymorphism associated with 16S rRNA gene of mitochondrial genome of the Persian Gulf Oyster (*Crassostrea* sp.), examined in 30 samples collected from Bandar-e Emam Khomeini. Polymerase chain reaction was performed by a pair of primer for all samples and PCR products were sequenced using dideoxy chain termination method . Then the obtained data were analyzed usig MEGA Ver 5.0, BioEdit Ver 7.0 and DnaSP Ver 5.0 programs and software. The results showed 2 mutation and Nucleotide diversity (Pi) 0.00061 observed in studied genes. Among the 30 samples, 3 haplotypes were detected and average haplotype diversity (Hd) 0.195 were calculated. The haplotypes obtained in this study were submitted in the Gene Bank for the first time. Phylogeny trees derived from 16S rRNA gene sequencing showed no significant separation of the samples in the Imam Khomeini port. The results of this study also showed that there is low sequence differentiation in the study population in Imam Khomeini port.

Keywords: 16S rRNA, *Crassostrea*, Primer, Polymerase chain reaction, sequencing.