بررسی مولکولی جمعیت صدف‌های خوراکی *Saccostrea cucullata* در سواحل شمالی خلیج فارس و دریای عمان

• **سیامک یوسفی**، عضو هیأت علمی سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی
• **غلامحسین وثوقی**، عضو هیأت علمی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران
• **ساسان رضایی**، عضو هیأت علمی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران

تاریخ دریافت: بهمن ماه ۱۳۸۳ تاریخ پذیرش: فروردین ماه ۱۳۸۴

E.mail: Siamak. yousefi@gmail.com

چکیده

برای اولین بار در ایران تنوع ژنتیکی در صدف *Saccostrea cucullata* در سواحل شمالی خلیج فارس و دریای عمان از طریق استخراج DNA و RAPD-PCR با انتخاب ۶ ایستگاه و مجموع ۳۰۰ نمونه آنالیز و بررسی گردید. از شش پرایمر استفاده شده در طول انجام تحقیق ۲ پرایمر با مشخصات GCG-ATC-CCC-A (پرایمر۱) و GTC-CAC-ACG-C (پرایمر ۵) به آزمایش جواب مثبت دادند که با نتایج حاصل از بررسی‌های مورفومتریک نیز همسویی داشت. تعداد باندهای تولید شده در دو پرایمر مذکور مربوط به ایستگاه‌های استان سیستان و بلوچستان با تعداد باندهای تولید شده در ایستگاه‌های استان بوشهر و ایستگاه‌های استان هرمزگان متفاوت بود، که نشان دهنده تنوع ژنتیکی بین نمونه‌ها می‌باشد. نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای (Cluster analysis) نیز مبین این ادعاست. نتایج نشان داد که می‌توان جمعیت صدف‌های مورد بررسی را در دو خوشه مجزا از هم تقسیم و در یک خوشه نمونه‌های استان‌های بوشهر و هرمزگان را قرار داده و در خوشه مجزای دوم نمونه‌های استان سیستان و بلوچستان را قرار داد. بررسی‌های دقیق تر نشان داد که در خوشه اول نیز دو زیر خوشه وجود دارد، در یک زیر خوشه بوشهر و دیر و در زیر خوشه دوم قشم و بندرلنگه قرار دارد که علت این امر را می‌توان در خصوصیات فیزیکی بسترهای مورد مطالعه، خصوصیات فیزیکوشیمیایی آب و ویژگی‌های مربوط به اقلیم هریک از زیستگاه‌ها دانست.

کلمات کلیدی: RAPD، PCR و صدف خوراکی (*Saccostrea cucullata*)

Pajouhesh & Sazandegi No 66 pp: 2-7

Genetic diversity of *Saccostrea cucullata* in the northern coast lines of the Persian Gulf and the Sea of Oman

By: S.Yousefi, Member of Faculty of Agricultural Research and Education Organization.
Vosoughy,Gh. Member of Scientific Board of Veterinary Faculty of Tehran University.
Rezaee, S. Member of Scientific Board of Health Faculty of Medical Sience of Tehran University.

Genetic diversity of *Saccostrea cucullata* in the northern coast lines of the Persian Gulf and the Sea of Oman were determined using DNA extraction and RAPD - PCR. A total of 300 samples were collected from 6 station along the

coastline. Two out of six primers showed positive results, namely, GCG - ATC - CCC - A (Primer 1) and GTC - CAC - ACG - C (Primer 5) which were in accordance with morphometric analysis. The number of bands in the two above - mentioned primers in Khor - Tang and Chabahar station (Province of Sistan and Balouchestan) was significantly different from the number of produced bands in Dayer and Bushehr station (Province of Bushehr) as well as Gheshm and Bandar - Lengeh station (Province of Hormozgan). The cluster analisys was used to confirm the above variations. The results showed that the oyster population can be divided into two separate clusters. The first cluster included Bushehr, Dayer, Gheshm and Bandar - Lengeh species. The second cluster included Khor - Tang and Chabahar species. The analysis also showed that the first cluster can be divided into two Sub – cluster. Bushehr and Dayer belong to one Sub - cluster whereas Gheshm and Bandar - Lengeh from the other Sub – cluster. The formation of different cluster can be related to Physico - Chemical properties of water and climatic variations in different habitats along the Persian Gulf and the Sea of Oman.

Key words: RAPD, PCR, *Saccostrea cucullata*.

مقدمه

گرچه تاریخچه علم نرم‌تن شناسی به قرن هجدهم میلادی برمی‌گردد لیکن قرن نوزدهم مصادف با اولین نمونه برداری‌های انجام شده در خلیج فارس و دریای عمان در ارتباط با نرمتنان بوده است. *S. cucullata* اویستر خوراکی از راسته (Ferussac,۱۸۲۲) Ostreoida و از فوق خانواده (Rafinesque, ۱۸۱۵) Ostreacea و از خانواده Ostreidae یا True oysters می‌باشد. نام علمی این اویسترها (Born, ۱۷۷۸) *Saccostrea cucullata* می‌باشد. تنوع در شکل ظاهری اویسترها باعث می‌شود که شناسایی و تشخیص این گروه از دو کفه‌ایها بسیار مشکل گردد و این امر ممکن است منجر به اشتباهاتی در تشخیص بوم ریخت (Ecomorph) شود (Oliver, ۱۹۸۹). بدین منظور تحقیق ذیل جهت شناسایی ژنتیکی این گونه صورت پذیرفته است. این اویستر خوراکی دارای جاذبه فراوان اقتصادی است. کشت و پرورش این صدف در نقاط بسیاری از جهان مثل تایلند و استرالیا دارای شهرت و اهمیت زیاد می‌باشد. اهمیت غذایی این گونه در طعم مطلوب آن و مواد معدنی بسیار مفید آن است که انسانها آن را از گذشتگان خود به ارث برده‌اند و اویسترها جایگاه ویژه‌ای را در تامین غذای بشر در طول قرن‌های متمادی داشته‌اند. این اویستر علاوه بر مصارف غذایی دارای خواص دارویی نیز می‌باشد به نحوی که در بهبود برخی از بیماری‌ها کاربرد دارد. برای مثال از کبد، ماده‌ای به دست می‌آید که به عنوان نوعی مسهل در پزشکی مصرف می شود. همچنین پوسته آنها منبع مناسبی از کلسیم برای پرورش دهندگان طیور است (Kotpal،۱۹۹۶). از کاربردهای دیگر این گونه، استفاده از آنها در امور تحقیقاتی و آزمایشگاهی می‌باشد (۳).

تکنولوژی PCR که مبتنی بر استفاده از آنزیم DNA پلیمراز مقاوم به حرارت است، نخستین بار در سال ۱۹۸۸ ابداع شد. این تکنیک یکی از مفیدترین و همگانی‌ترین روش‌ها است که برای اهداف متعددی از علوم زیستی، پزشکی و غیر آن کاربرد دارد. با استفاده از این روش می‌توان قطعه یا قطعات خاصی از اسید نوکلئیک را تا حد میلیون‌ها و حتی میلیاردها کپی به طور دقیق و کاملاً مساوی با اسید نوکلئیک اصلی تکثیر کرد، بدون این که نیازی به سلول زنده باشد. در واقع PCR تکنیکی است که با استفاده از آن به صورت درون شیشه‌ای (in vitro) قطعه ژن خاصی را آن قدر تکثیر داد که بتوان به راحتی آن را ارزیابی کرده و یا کارهای دیگری نظیر هیبریدسازی، RFLP یا تعیین توالی روی آن انجام داد (۱۰).

Patwary در طی بررسی‌های خود برای شناسایی سطح گونه‌های بی مهرگان بویژه دوکفه‌ایها، استفاده از تکنیک‌های جدید را گسترش داد. وی نشان داد که در این راه می‌توان از مارکرهای ژنتیکی و روش RAPD جهت شناسایی گونه‌های منحصر به فرد دوکفه‌ای‌ها استفاده نمود (۹).

مواد و روش‌ها

نمونه برداری

نمونه‌برداری از ۶ زیستگاه این آبزی واقع در سواحل شمالی خلیج فارس و دریای عمان انجام شد (نقشه شماره ۱) به طوری که در هر یک از ۶ ایستگاه مورد بررسی در فواصل ۵ کیلومتری با استفاده از قاب فلزی از پیش ساخته شده و قلم و چکش، نمونه‌ها جمع‌آوری گردید. بدین صورت که ابتدا قاب را بر روی صخره‌های پوشیده از اویسترها گذاشته و تمام اویسترهای موجود در محیط قاب برداشت می‌شدند. سپس اویسترها جمع‌آوری شده از هر نقطه با یکدیگر پس از شناسایی گونه‌های مخلوط شده و در نهایت ازهر ایستگاه ۵۰ اویستر به صورت تصادفی جمع‌آوری و جهت بررسی خصوصیات زیست سنجی (اندازه‌گیری طول و عرض) در داخل یونولیت‌های عایق حرارتی که در آن پودر یخ به‌همراه خاک اره ریخته شده بودند به تهران منتقل شدند.

پس از زیست‌سنجی‌های لازم اویسترها شکسته شده و مقداری از عضلات آنها در داخل شیشه‌ای حاوی الکل خالص با درجه ۹۹/۹۵ درصد تثبیت شده و سپس جهت استخراج DNA به آزمایشگاه منتقل شدند.

استخراج DNA

به منظور جداسازی DNA از اویسترهای جداشده در یک نمونه‌برداری تصادفی تعداد ۱۰ اویستر از ۵۰ اویستر جمع‌آوری شده از هر ایستگاه برای جداسازی DNA در نظر گرفته شد. استخراج DNA توسط روش Phenol- chloroform -SDS انجام پذیرفت (۷). DNA تغلیظ شده با روش اسپکتروفوتومتری مورد سنجش واقع شد. لازم به تذکر است به منظور کسب

اطمینان از نتایج به دست آمده مجدداً تعداد ۱۰ اویستر از مجموعه ۴۰ اویستر باقیمانده از هر ایستگاه به صورت تصادفی انتخاب و تمامی مراحل فوق در مورد آنها تکرار گردید. بنابراین در کل روی ۲۰ نمونه در هر ایستگاه به صورت مجزا کار شده است.

واکنش زنجیرهای پلیمراز(PCR)

پرایمرها، توسط شرکت MWG - Biotech آلمان سنتز و از شرکت نماینده خریداری شدند. مشخصات پرایمرها به شکل روبرو است

پرایمر اول: (P۱) GCG-ATC-CCC-A)،

پرایمر دوم: (P۲) GGA-GAG-GGA-G،

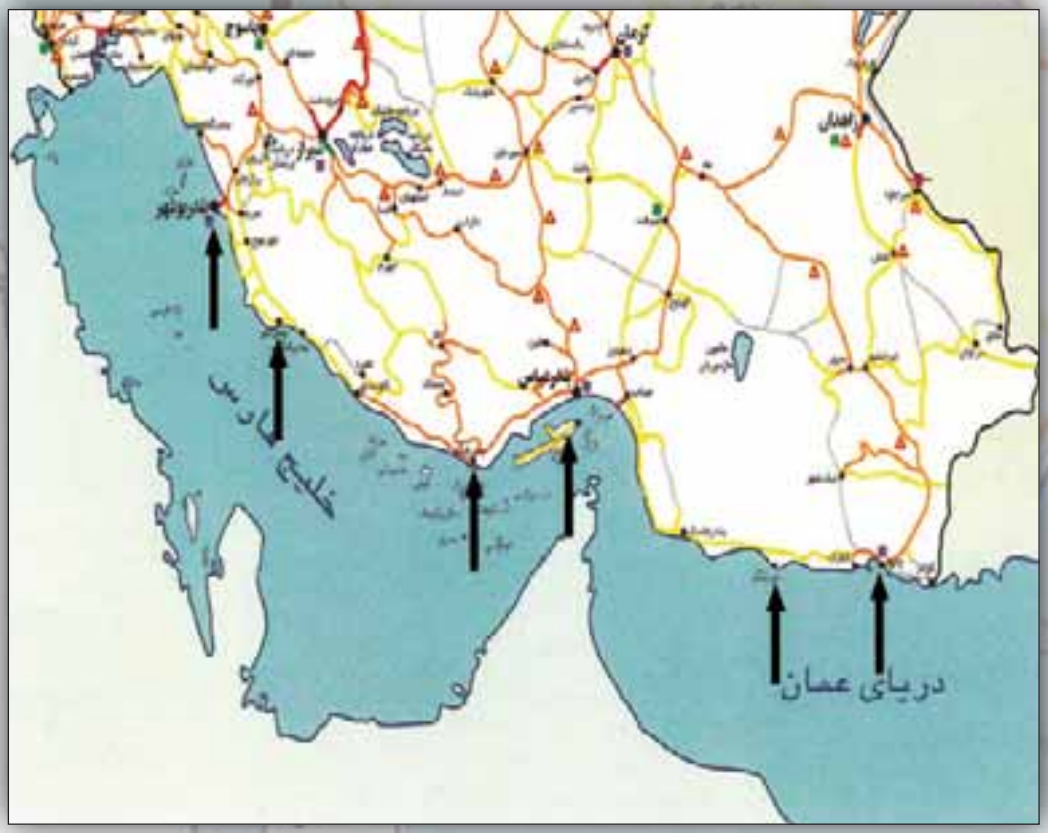
پرایمر سوم: (P۳) GGG-TAA-CGC-C،

پرایمر چهارم: (P۴) GTt-TCG-CTC-C،

پرایمر پنجم: (P۵) GTC-CAC-ACG-C،

پرایمر ششم: (P۶) GTC-GAT-GTC-G،

جهت انجام PCR هر کدام از موارد فوق الذکر طوری محاسبه و برداشته شد که غلظت نهائی مواد به قرار زیر باشد: بافر PCR ۲/۵ میکرو لیتر، dNTP ۱ ۱ میکرولیتر، آنزیم Taq polymerase ۰/۲ میکرو لیتر، کلرور منیزیم ($MgCl_2$) ۱/۲۵ میکرولیتر، پرایمر ۵ میکرولیتر، نمونه DNA صدف ۴ میکرو لیتر، آب دیونیزه ۱۱/۰۵ میکرولیتر. مقادیر فوق‌الذکر بسیار اندک بوده و اگر برای هر نمونه بخواهیم این موارد را جداگانه اضافه نمائیم ضمن این که وقت زیادی را می طلبد، مقادیر زیادی مواد مصرفی نیز دور ریز خواهد شد و به علاوه دقت کافی نیز نخواهد داشت. برای حل این مشکلات و به منظور یکسان نمودن همه آزمایش‌ها، ابتدا مخلوط اصلی (Master mix) تهیه می‌شد. این مخلوط شامل مواد فوق‌الذکر بوده که مقدار هر یک در تعداد نمونه ضرب شده بود. سپس با توجه به حجم نهایی و اکنش، پس از محاسبه مقدار هر ماده و جمع‌بندی آنها، آن قدر آب اضافه شده تا حجم نهایی واکنش به دست آید. پس از تهیه مخلوط اصلی به هرتیوپ PCR، مقدار مورد نظر از مخلوط اصلی اضافه شده تا به عنوان الگویی برای تکثیر قطعه مورد نظر عمل نماید. تکثیر یک رشته DNA مستلزم ۳ مرحله Denaturation، Annealing و Extention است. ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR (محتویات داخل لولهPCR) الکترولیز گردیده با استفاده از دستگاه UVP مورد مطالعه قرار می‌گرفت. با این تفاوت که اولاً در این جا از آگارز ۱/۵ درصد استفاده می‌شد و ثانیاً با توجه به این که وزن قطعات DNA در این

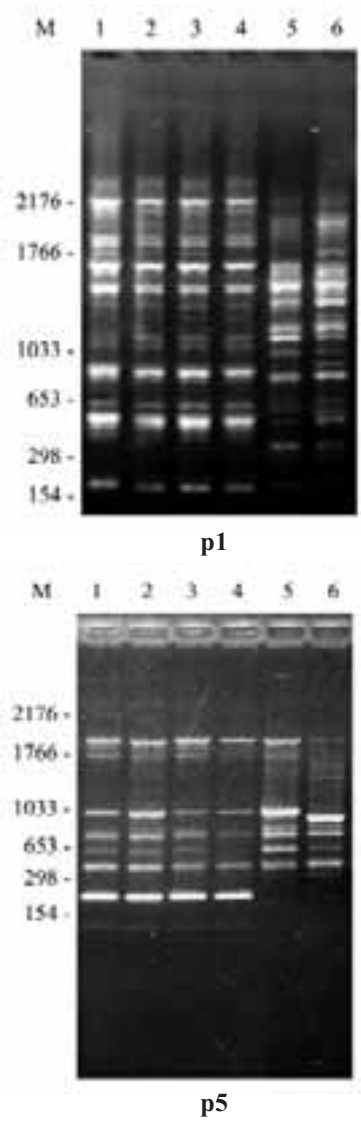


شکل شماره۱- نمایی از ایستگاه‌های مورد بررسی

جا بسیار کمتر از DNA ژنومی است، از مارکرهای سبک‌تر استفاده شد. مازاد محصولات PCR در فریزر و در دمای ۲۵- درجه سانتیگراد نگهداری گردید.

نتایج

نتایج حاصل از این تحقیق در مراحل آزمایش اولیه و تکرار نشان می‌دهد که الکتروفورز محصول PCR در رابطه با پرایمر اول و پنجم به مکان‌های مورد مطالعه پاسخ مثبت داده است به طوری که فتوگراف‌های شماره ۱ نیز نشان می‌دهد باندهای ایجاد شده مربوط به صدف‌های جمع‌آوری شده از استان‌های بوشهر با هرمزگان تقریباً مشابه بوده ولی تمایز و افتراقی با باندهای ایجاد شده مربوط به استان سیستان و بلوچستان وجود دارد.



فتوگراف شماره ۱- الکتروفورز محصول PCR مربوط به پرایمر اول (P1) و پنجم (P5)،M: شاخص وزن مولکولی مارکر(۱ (bp: بوشهر۲ : دیر ۳ : قشم ۴ : بندر لنگه ۵ : خورتنگ ۶ : بندر چابهار

با توجه به این که از هر منطقه ۲۰ نمونه PCR شده است. نتایج همچنین نشان می‌دهد که الکتروفورز محصول PCR با پرایمر دوم، سوم، چهارم و ششم به مکان‌های مورد مطالعه پاسخ منفی داده است به طوری که فتوگراف‌های شماره ۲ نیز نشان می‌دهد باندهای ایجاد شده مربوط به صدف‌های جمع‌آوری شده از استان‌های بوشهر با هرمزگان و سیستان و بلوچستان تقریباً مشابه بوده و تمایز و افتراقی بین باندهای ایجاد شده وجود ندارد.

شکل شماره ۲ نشان می‌دهد که در یک تقسیم‌بندی کلی مکان‌های مورد بررسی را می‌توان به دو کلاستر (خوشه) طبقه‌بندی نمود. به طوری که چابهار و خورتنگ در یک کلاستر و قشم، بندر لنگه، دیر و بوشهر نیز در یک کلاستر قرار گرفته‌اند.

کلاستر دوم را می‌توان به نوبه خود به دو زیر کلاستر (زیر شاخه) تقسیم کرد به نحوی که زیر شاخه یک شامل بوشهر و زیر شاخه دو شامل قشم، بندرلنگه و دیر منظور نمود.

بحث

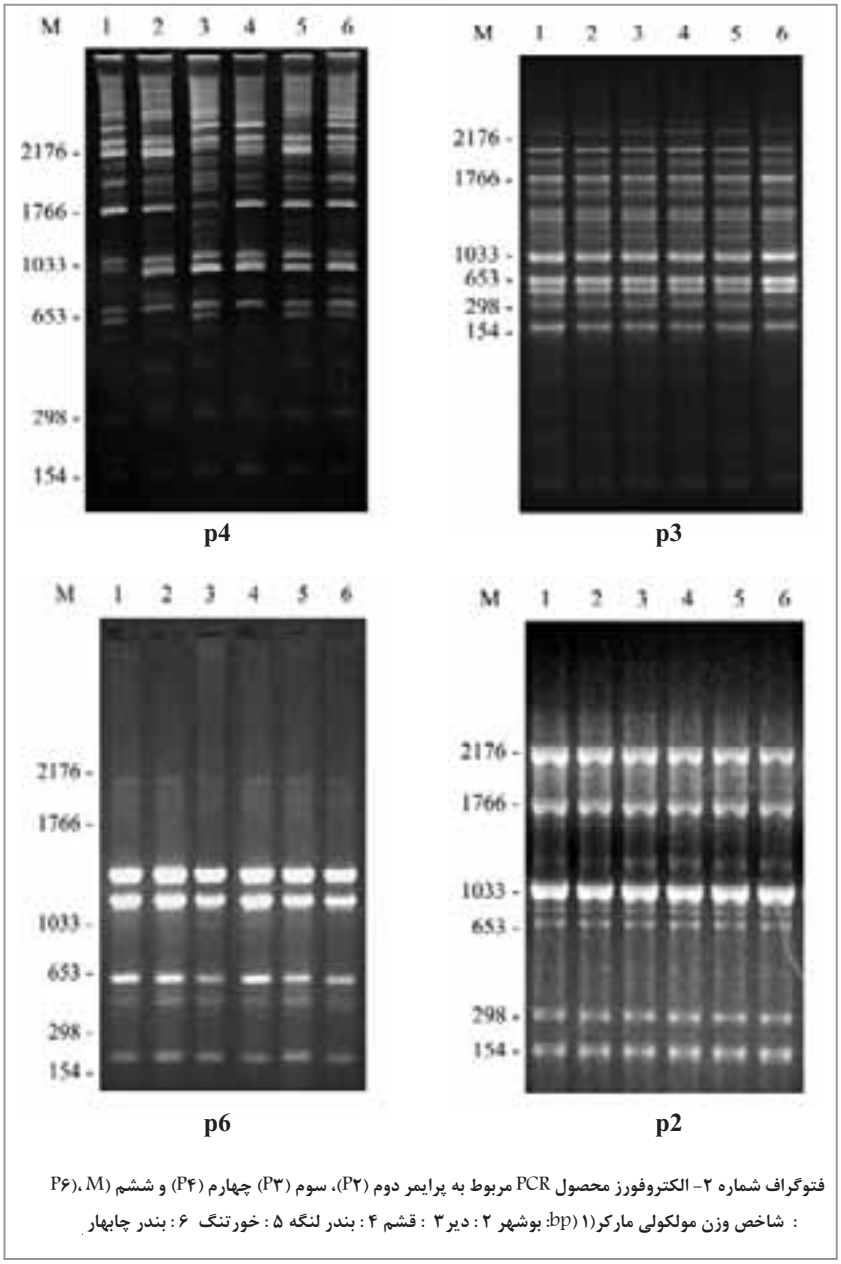
با عنایت به این نکته که مطالعه بر روی تنوع ژنتیکی در نرم‌تنان سواحل شمالی خلیج فارس و دریای عمان برای اولین بار در کشور صورت پذیرفت، هیچگونه پرایمر اختصاصی برای این کار وجود نداشت. بنابراین انتخاب پرایمرها با استفاده از منابع موجود صورت گرفت.

از بین ۶ پرایمر استفاده شده برای انجام این طرح، پرایمر ۱ و پرایمر ۵ به آزمایشات پاسخ مثبت دادند که علت این امر را می‌توان در این مطلب بیان نمود که سایر پرایمرهای رد شده به دلیل این که باندهای یکسانی در نمونه‌های برداشت شده از ایستگاه‌های مختلف بوجود آوردند، بنابراین برای تشخیص افتراقی نمونه‌های جمع‌آوری شده مناسب نبودند.

در پرایمر۱ و پرایمر ۵ با توجه به فتوگراف‌های بدست آمده، باندهای متفاوتی مشاهده می‌شود که بسته به ایستگاه مورد بررسی، حضور و یا عدم حضور باندها، به عنوان یک فاکتور تعیین کننده عمل میکند.

در مورد پرایمر ۱، می‌توان جمعیت صدف‌های مورد بررسی را در دو خوشه مجزا از یکدیگر تقسیم‌بندی نمود. به طوری که در یک خوشه قشم، بندرلنگه، دیر و بوشهر قرار می‌گیرد و در خوشه مجزای دوم خورتنگ و چابهار واقع می‌شوند. پس در یک نگاه ابتدایی می‌توان جمعیت‌های این دو خوشه را از هم تمایز داد. در نگاه دقیق تر ایستگاه‌های مورد مطالعه در خوشه یک را می‌توان به نوبه خود به دو زیر خوشه، یکی بوشهر و دیگری شامل ایستگاه‌های قشم، بندرلنگه و دیر تقسیم‌بندی نمود.

از سوی دیگر نتایج حاصل از آنالیز کلاستر در مورد پرایمر ۵ نشان داد که جمعیت‌های مورد بررسی همانند پرایمر ۱ به دو خوشه اصلی و مجزا از هم تقسیم می‌گردند به طوری که در یک خوشه قشم، بندرلنگه، دیر و بوشهر قرار دارد و در خوشه دوم خورتنگ و چابهار قرار گرفته است. ولی از نتایج پرایمر ۱ و پرایمر ۵ این گونه استنباط می‌شود که هر دو پرایمر برای افتراق گونه‌ها مناسب هستند. ولی پرایمر ۱ با قدرت بیشتری این افتراق را انجام داده است به نحوی که قشم، بندرلنگه و دیر را در یک زیر خوشه و بوشهر را در زیر خوشه مجزا تقسیم‌بندی کرده است. با توجه به آنالیز کلاستر ترکیب داده‌های مربوط



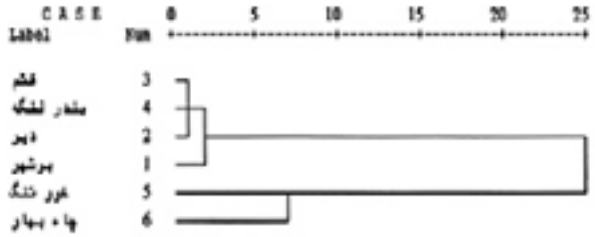
فتوگراف شماره ۲- الکتروفورز محصول PCR مربوط به پرایمر دوم (P۲)، سوم (P۳) چهارم (P۴) و ششم (P۶)، M: شاخص وزن مولکولی مارکر(۱ (bp: بوشهر ۲ : دیر ۳ : قشم ۴ : بندر لنگه ۵ : خورتنگ ۶ : بندر چابهار

بـه پرایمرهـای ۱ و ۵، اطلاعات حاصل از پرایمر ۱ را با قدرت بیشـتری تائید می‌نماید. بنابراین در بین این دو پرایمر، پرایمر ۱ برای افتراق بین گونه‌های و حتی زیر گونه‌های قابل اعتمادتر است.

افتـراق نمونه‌هـا در پرایمـر ۱ و پرایمر ۵ را می‌توان به علت شـرایط مختلف زیست محیطی و اکولوژیکی بین ایستگاه‌های مورد بررسی دانست. چرا که اکوسیسـتم‌های خلیج فارس و دریای عمان و حتی سواحل شرقی تـا غربی آنها با یکدیگر دارای اختلاف می‌باشـند. این اختلافات را می‌توان در خصوصیات فیزیکی بسترهای مورد مطالعه، خصوصیات فیزیکوشیمیایی آب و ویژگی‌هـای اقلیمی دانسـت. با این ادلـه و با توجـه به اصل تطابق در موجـودات، نمونه‌هـای *S. cucullata* بـه دلیل قرار گرفتن در شـرایط محیطـی نامسـاوی در طی سـالیان متمـادی تکثیـر شـده و تبدیل به زیرگونه‌های مختلفی شده است.

همچنین با توجه به نتایج به دست آمده از داده‌های مورفومتریک می‌توان این گونه بیان کرد که در یک نگاه کلی دو خوشـه مسـتقل وجود دارد. به طوری که یک خوشه شامل قشم، بندرلنگه، بوشهر و دیر و خوشه دیگر شامل خورتنگ و چابهار اسـت. ولی در نگاه دقیق تر می‌توان خوشـه اول را به دو زیر خوشه مستقل تقسیم نمود که در یک زیر خوشه قشم و بندرلنگه و در زیر خوشه دیگر بوشهر و بندردیر قرار گرفته است.

همچنیـن با توجه به نتایج حاصل از ترکیب آنالیز خوشـه‌ای داده‌های مربوط به پرایمر ۱ و ۵ و داده‌های مورفومتریک، می‌توان با جرات بیشـتری



شکل شماره۲- دندروگرام مکان‌های مورد مطالعه با استفاده از پرایمرهای ۱ و ۵ (P1,P5)

بیان کرد که نمونه‌های هر استان با استان مجاور دارای اختلاف می‌باشد. به طوری که نمونه‌های استان هرمزگان و استان بوشهر قرابت نزدیکتری به هم داشته ولی نمونه‌های جمع‌آوری شده از استان سیستان و بلوچستان، قرابت کمتری با دو استان دیگر دارد.

با توجه به داده‌های مربوط به اردلان (۷۵-۱۳۷۲)، رضایی (۷۲-۱۳۷۴) و تجلی پور (۲) استنباط می‌شود که صدف‌های سواحل استان سیستان و بلوچستان دارای طول و عرض بیشتری نسبت به صدف‌های جمع‌آوری شده از سایر سواحل جنوبی ایران بودند، که دلیل این امر ممکن است ویژگی‌های اکولوژیک حاکم بر منطقه باشد. نتایج حاصل از این بررسی نیز نشان می‌دهد که بین صدف‌های مورد مطالعه ازسیستان و بلوچستان با دو استان دیگر اختلاف وجود دارد.

از سوی دیگر نمونه‌های صدف جمع‌آوری شده از استان هرمزگان (ایستگاه‌های قشم و بندرلنگه) نسبت به سایر صدف‌های جمع‌آوری شده از ایستگاه‌های دیگر دارای ضخامت بیشتری بودند. این امر به دلیل وجود سواحل آهکی در این استان می‌باشد. نتایج حاصل از مطالعه فوق نیز گویای این مطلب است که هر استان دارای زیر گونه مربوط به خود می‌باشد.

مطالعات Heipel و همکارانش در سال ۱۹۹۸ بر روی جمعیت اسکالپ ژاپنی (*Patino pectin yessoensis*) در سه ناحیه ژاپن، روسیه و کانادا حاکی از تفاوت ژنتیکی در جمعیت آبزی فوق بوده ولی علت این امر را مجموعه‌ای از محدودیتهای مرتبط با محلهای مورد مطالعه عنوان نمود (۶).

Klinbunga و همکارانش در سال ۲۰۰۰ مطالعاتی بر روی صدف اسکالپ خور (*Argo pecten Lrradians*) انجام دادند , نشان دادند که تفاوتهای جغرافیایی باعث بروز اختلاف زیادی در شکل گونه‌های خواهد شد که از تفاوت شرایط زیست محیطی حاصل شده است (۷).

در مطالعه دیگری که توسط Felsenstein در سال ۱۹۹۳ که بر روی اسکالپ انجام شده وی اعلام نمود که تنوع و تفاوت جغرافیایی نه تنها در شکل ظاهری بلکه بر روی خصوصیات ژنتیکی نیز تأثیرگذار بوده است. یافته‌های حاصل از طرح مذکور با نتایج افراد یاد شده مطابقت‌دارد(۵).

سپاسگزاری

از سرکار خانم دکتر فریده زینی و آقایان دکتر محمدرضا فاطمی، دکتر امین کیوان، دکتر عباس اسماعیلی ساری، دکتر عباس متین فر، دکتر نور محمدی، دکتر بدری‌فر، دکتر شاه حسینی، دکتر غلامحسین ریاضی، مهندس عبدالرسول غفاری که در انجام این پروژه همکاری داشته تشکر و قدردانی به عمل می‌آید. از دانشگاه آزاد اسلامی و واحد علوم و تحقیقات، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران که در طول این پروژه از حمایت‌های بخش‌های متفاوت بهره برده شد، کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

منابع مورد استفاده

۱ - اردلان، آ. ۱۳۷۲؛ شناسایی و بررسی پراکنش دوکفه‌ای‌های مناطق جزر و مد خلیج و چابهار و سواحل اطراف آن. پایان‌نامه کارشناسی ارشد بیولوژی ماهیان دریا. دانشگاه آزاد اسلامی. تهران. ۲۴۳ ص.

۲- تجلی‌پور، م، گ. تجلی‌پور. ۱۳۷۳؛ بررسی تکمیلی سیستماتیک و انتشار نرم‌تنان سواحل ایرانی خلیج فارس. سازمان تحقیقات و آموزش شیلات ایران. تهران. ۴۰۳ ص.

۳ - حسین زاده صحافی، ه ـ ۱۳۶۹؛ اطلس نرم‌تنان خلیج فارس. مؤسسه تحقیقات شیلات ایران. مرکز تحقیقات شیلات دریای عمان. ۱۱۲ ص.

۴ - رضایی، ح. ۱۳۷۴؛ گزارش نهایی پروژه بررسی پراکنش نرم‌تنان در آبهای مشرف برخی از جزایر فارور و هندورابی ایستگاه تحقیقات شیلاتی نرم‌تنان خلیج فارس. مؤسسه تحقیقات شیلات ایران.

5 -Felsenstein. J. 1993; PHYLIP (Priylogenetic Inference Packnge) Version 3.5c. Seattle :Department of genetics , University of Washington , Distributed by the auther

6 -Heipel, D. A., Bishop, J.D.D., Brand, A. R., and Thorpe, J. P., 1986; Population genetics differentiation of the great scallop in western Britain investigated by randomly amplified polymorphic DNA. M ar Ecol Prog Ser 162:163-171.

7 -Klinbunga, S., Boonyapakdee, A., Partomachat, B., 2000;Genetics diversity and spices diagonstic markers of mud crab in eastern Thiland determined by RAPD analysis .Mar Biotechnol 2:180-187

8-Koptal. P. I. 1996; A text book of zoology Phylum mollusca. Meerut College. Pub . Rakesh Kumar Ralstagi for Rastogi publications, Printed at national press, Meerut , India. 240p.

9 -Oliver, A. P. H. 1989; Seashells of the world Hamlyn pad. Hongkong.

10-Patwary, M.U.,Kenchington, E. L., Bird, C. I., and Zourus , E. 1994; The use of random amplified polymorphic DNA markers in genetic studied of the sea scallop. J. Shellfish Res 13:547-553.

11- Spitzar.ED. B. A. Lasker.1989; Use of mitochondrial and ribosomal DNA polymorphisms.

12 -Spitzer. ED, Lasker BA. 1989; Use of mitochondrial and ribosomal DNA polymorphisms to classify clinical and soil isolates of Histoplasma capsulatum , Infect Immune, 57 : 1909-12.