بررسی ساختار جمعیتی خیار دریایی گونه *Holothuria parva* در سواحل خلیج‌فارس منطقه بوشهر و هلیله با استفاده از نشانگر 16S rRNA میتوکندریال

محمد خلیل پذیر[۱]
اشکان اژدری[۲]
سید احمد قاسمی[۳]

۱. پژوهشکده میگوی کشور، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی (AREO)، بوشهر، ایران.
۲. تحقیقات شیلاتی آب‌های دور، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی (AREO)، چابهار، ایران.
۳. گروه بیوتکنولوژی دریا، مرکز مطالعات و پژوهش‌های خلیج‌فارس، دانشگاه خلیج‌فارس بوشهر، ایران.

***مسئول مکاتبات:**
dr.pazir@gmail.com

کد مقاله: ۱۳۹۹۰۱۰۷۹۷
تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۲/۲۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۱۱
مقاله برگرفته از طرح پژوهشی است.

چکیده

جهت بررسی ساختار جمعیتی خیار دریایی گونه *Holothuria parva* در سواحل خلیج‌فارس منطقه بوشهر و هلیله، از روش توالی یابی ژن 16SrRNA ژنوم میتوکندریال در طول فصول پائیز و زمستان ۱۳۹۸ استفاده شد. از مجموع ۳۷۴ جایگاه نوکلئوتیدی در هر دو جمعیت بوشهر و هلیله به ترتیب تعداد ۲ و ۴ هاپلوتیپ شناسایی شد که هاپلوتیپ ۲ در جمعیت بوشهر از بیشترین فراوانی برخوردار بود و به‌عنوان هاپلوتیپ مشترک با جمعیت هلیله مشاهده شد. همچنین میانگین تنوع هاپلوتیپی در ساحل بوشهر و هلیله به ترتیب ۰/۵ و ۱ بود لیکن میزان تنوع نوکلئوتیدی در دو جمعیت فوق به ترتیب ۰/۰۰۱۳ و ۰/۰۰۵۳ محاسبه گردید. به دلیل وجود میزان جریان ژنی بالا در جمعیت‌های موردبررسی و پائین بودن فاصله ژنتیکی، میزان تمایز ژنی (F_{st}) در دو جمعیت بوشهر و هلیله ۰/۱۱۱- بود. لذا با توجه به نتایج به‌دست‌آمده احتمال دارد که خیارهای دریایی گونه *H. parva* جمع‌آوری‌شده از سواحل بوشهر و هلیله از یک جمعیت یکسان باشند.

واژگان کلیدی: *Holothuria parva*، هاپلوتایپ، 16S rRNA، بوشهر، خلیج‌فارس.

مقدمه

خیارهای دریایی متعلق به رده خارپوستان زیرشاخه خارزیان (Echinozoa) (Rawson and Hoagland, 2019) و دارای بدنی کشیده، گوشتی و نرم بوده که اغلب آن‌ها رسوب خوار و برخی نیز معلق خوار هستند (Conand, 2018). این موجودات معمولاً در هر محیط و عمقی یافت می‌شوند، اما بیشترین تنوع آن‌ها در آب‌های کم‌عمق گرمسیری و مناطق بین جزر و مدی است (Huang *et al*., 2018) (Sloan and Bodungen, 1980). ازجمله ویژگی‌های اختصاصی خیارهای دریایی وجود اسپیکول‌های میکروسکوپی و ساختارهای حلقه‌ای آهکی و تنتاکل‌های دهانی است که در شناسایی مورفورلوژیک آن‌ها مورداستفاده قرار می‌گیرند (Kerr *et al*., 2005). تاکنون از این رده بالغبر ۱۴۰۰ گونه شناسایی‌شده (Pawson, 2007) در سواحل خلیج‌فارس و دریای عمان جنس‌های متنوعی از خیار دریایی گزارش‌شده اما جمعیت غالب

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]

خیارهای دریایی بومی به خانواده هولوتوریاده (Holothuriidae) تعلق دارند و تا کنون ۲۰ گونه شناسایی شده است (Uthicke and Benzie 2003; Mashjoor and Yousefzadi, 2019).

هر چه تنوع موجود در ژنوم بیشتر باشد تنوع جاندارن نیز بیشتر خواهد شد. از این رو در یک جمعیت توالی نوکلئوتیدها به جز در برخی از جایگاه‌های معین در بین افراد جمعیت یکسان است. با این حال تفاوت‌های اندک، عامل اصلی بروز صفات متفاوت در بین افراد جمعیت می‌باشد. رایج‌ترین نوع این تفاوت‌ها، چندشکلی تک نوکلئوتیدی (Single-nucleotide polymorphism) است که در هر جایگاه، بیش از یک نوع نوکلئوتید بر روی ژنوم افراد مختلف جمعیت مشاهده می‌شود. ژنوم هر فرد ترکیبی از دو هاپلوتیپ به ارث رسیده از والدین است که این ترکیب را اصطلاحاً ژنوتیپ فرد می‌نامند. لذا یک هاپلوتیپ درواقع نشان‌دهنده توالی نوکلئوتیدهای ژنوم یک فرد بر روی تعدادی از جایگاه‌های چندشکلی تک نوکلئوتیدی می‌باشد (Yang *et al*., 2019b; Chapman, 2009).

امروزه مطمئن‌ترین راه برای شناسایی ساختارهای جمعیتی استفاده از اطلاعات ژنتیکی بر پایه بهره‌گیری از نشانگرهای مولکولی به‌منظور دستیابی به تنوع ژنتیکی، آنالیز ساختار جمعیت، ارتباطات گونه‌ای، جهت طبقه‌بندی موجودات است (Yang *et al*., 2019a). نشانگرها معیارهایی هستند که با استفاده از آن‌ها می‌توان اعضاء یا جمعیت‌های یک‌گونه یا جنس را از هم تفکیک نمود. امروزه نشانگرها به سه دسته، نشانگر مورفولوژیکی، سیتوژنتیکی و مولکولی تقسیم‌بندی می‌شوند. پایه و اساس نشانگرهای مورفولوژیک توالی‌های ژنتیکی می‌باشد (Chawla, 2002)؛ بنابراین مطالعه بر روی ویژگی‌های ژنتیکی جمعیت‌های مختلف یک‌گونه و تجزیه‌وتحلیل ارتباطات ژنتیکی بین آن‌ها می‌تواند ابزار مناسبی برای مدیریت شناسایی و افتراق‌های ژنتیکی در برنامه‌های تنوع ژنتیکی باشد (Ravago-Gotanco and Kim, 2019). نشانگرهای میتوکندریایی در مقایسه با نشانگرهای دیگر به دلیل عدم وقوع نوترکیبی، وراثت مادری، هاپلوئید بودن، کوچک بودن ژنوم، نرخ بالای جهش (۱۰ برابر بیشتر از ژنوم هسته) باعث شده که به‌عنوان یک ابزار مفیدی برای آنالیزهای فیلوژنی و تعیین روابط مورداستفاده قرار گیرند. در این رابطه Yang و همکاران (۲۰۱۹b) با ترسیم نقشه کامل ژنوم میتوکندری گونه *Holothuria leucospilata* با طول کل ۱۵۹۰۴ جفت باز که حاوی ۱۳ ژن پروتئین کد کننده، ۲ ژن rRNA، 22 ژن tRNA و ۱ منطقه کنترل‌شده عنوان نمودند که از اطلاعات ژنوم میتوکندریایی می‌توان برای تعیین روابط ژنتیکی میان گونه‌ای مختلف خیار دریایی استفاده کرد.

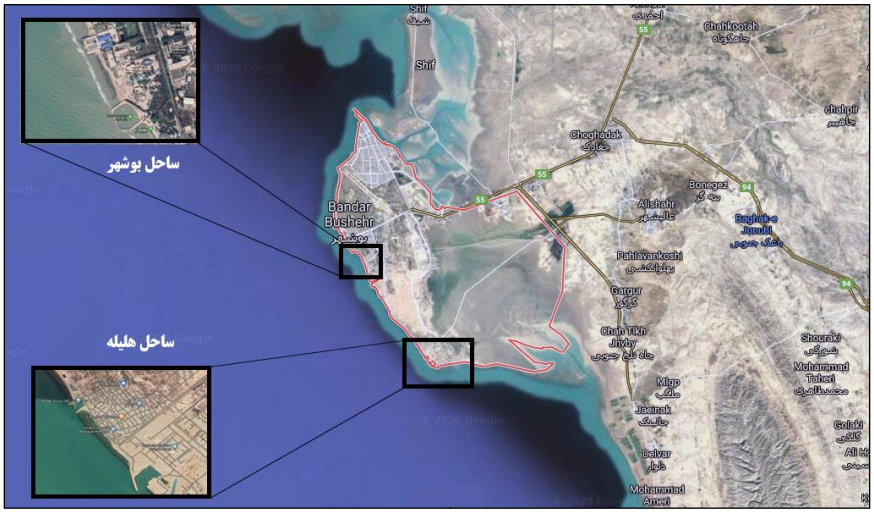
عالمی‌نیسی و همکاران (۱۳۹۴) پس از بررسی جمعیت‌های خیار دریایی *H. parva* در سواحل شمالی خلیج‌فارس با استفاده از ژنوم میتوکندریایی 16S rRNA از مجموع ۴۱۷ جایگاه نوکلئوتیدی بررسی‌شده درمجموع ۴ هاپلوتیپ شناسایی نمودند که ۳ هاپلوتیپ مربوط به بندر بستانه و ۲ هاپلوتیپ مربوط به بندر دیر بود و یکی از هاپلوتیپ‌های شناسایی‌شده بین دو جمعیت مشترک بود. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده آن‌ها عنوان نمودند که نمونه‌های بررسی‌شده در بندر بستانه و دیر از یک جمعیت یکسان می‌باشند که به دلیل جریان ژنی بالا بین دو منطقه تمایز زیادی از هم ندارند. این در حالی بود که توسل پور (۱۳۸۷) به مطالعه ژنتیکی خیار دریایی گونه *H. atra* در مناطق بستانه و نایبند به روش مولکولی RAPD پرداخت. آن‌ها دو جمعیت مجزا از همدیگر را شناسایی نمودند. در مطالعه صورت گرفته بر روی خیار دریایی گونه *H.leucospilota* جمع‌آوری‌شده از مناطق بوشهر، بندرعباس و چابهار عنوان شد که بیشترین و کمترین تمایز ژنتیکی (F_{st}) به ترتیب میان جمعیت‌های بوشهر – چابهار و بندرعباس – بوشهر وجود دارد (صفری و همکاران، ۱۳۹۷). همچنین Ehsanpour و همکاران (۲۰۱۶) از طریق نشانگرهای مولکولی 16S eRNA عنوان نمودند که خیارهای دریایی جداسازی شده از بندر بستانه متعلق به گونه *H. parva* است. Kamarudin و همکاران (۲۰۱۱) با استفاده از نشانگر سیتوکروم اکسیداز I ساختار جمعیتی و رابطه فیلوژنی خیار دریای گونه *H.leucospilota* در سواحل مالزی را موردبررسی قرارداد. با توجه به وجود زیستگاه‌های مختلف خیار دریای گونه *H. parva* در سواحل صخره‌ای شهرستان بوشهر شامل بندر بوشهر و روستای هلیله (نیامیمندی و همکاران، ۱۳۹۸) در این مطالعه علاوه بر شناسایی ساختار جمعیتی این‌گونه روابط فیلوژنی آن‌ها با یکدیگر و با سایر اطلاعات ثبت‌شده ازاین‌گونه

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]

در مرکز ملی اطلاعات زیستی (NCBI) به‌منظور شناسایی جمعیت‌های مختلف، تنوع ژنتیکی و فاصله ژنتیکی این‌گونه از طریق توالی یابی ژن زیر واحد ۱۶ اس ریبوزومال میتوکندری (16S rRNA) موردبررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

بررسی الگوی پراکنش خیار دریایی گونه *H. parva* در سواحل جزر و مدی شهرستان بوشهر حاکی از شناسایی زیستگاه‌های این‌گونه در سواحل بوشهر و هلیله به ترتیب با مختصات جغرافیایی ″۲۷ ′۵۴ °۲۸ شمالی – ″۱۳ ′۴۹ °۵۰ شرقی و ″۲۵ ′۵۰ °۲۸ شمالی – ″۲۲ ′۵۲ °۵۰ شرقی بود (نیامیمندی و همکاران، ۱۳۹۸) (شکل ۱). لذا در طول فصول پائیز و زمستان ۱۳۹۸ پس از نمونه‌گیری از ۵۰ عدد خیارهای دریایی مناطق فوق و تثبیت آن‌ها در الکل اتانول ۷۰ درجه، جهت شناسایی جنس و گونه بر اساس ساختار اسپیکول‌ها به آزمایشگاه زیست‌سنجی پژوهشکده میگوی کشور انتقال داده شدند (Kerr *et al*., 2005). به‌منظور استخراج ماده ژنتیکی DNA پس از شکافتن و تخلیه محتویات شکمی نمونه‌ها، ۵۰ میلی‌گرم از بافت ماهیچه‌ای جدا گردید. پس از خروج الکل از نمونه‌ها در هوای آزاد استخراج DNA با استفاده کیت تجاری IQ2000 انجام شد (LO *et al*., 1996).



شکل ۱: موقعیت جغرافیایی مکان‌های نمونه‌گیری از خیار دریایی گونه *H.parva* در سواحل بوشهر و هلیله (سال ۱۳۹۸).

کیفیت DNA های استخراج‌شده بر اساس وجود یا عدم وجود باند و شارپ بودن آن‌ها با استفاده از ژل آگاروز ۱ درصد از طریق دستگاه الکتروفورز افقی Aplex و کمیت آن‌ها با استفاده از دستگاه نانو درآپ A&E در طول‌موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و معادله $\frac{۲۶۰}{۲۸۰}$ تعیین شد (Soto-Hernandez and Grijalva-Chon, 2005). تکثیر ژنوم میتوکندریایی در ناحیه 16S rRNA توسط آغازگرهای ژن موردنظر با طول ۵۲۹ جفت باز (Base per) توسط دستگاه ترمال‌سایکلر PCR MAX انجام شد (جدول ۱). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جهت تکثیر ژنوم 16S rRNA با استفاده از ۱ میکرو لیتر DNA الگو (۱۰۰ نانوگرم)، ۱ میکرو لیتر از هر آغازگر اختصاصی پیشرو و پسرو با غلظت ۱۰ پیکومول، ۱۲/۵ میکرو لیتر بافر Master PCR (10X) و افزودن ۹/۵ ماکرو لیتر آب مقطر دیونیزه تا رسیدن به حجم ۲۵ ماکرو لیتر همراه با شرایط دمایی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه برای یک چرخه مرحله اول شامل واسرشت شدن اولیه (Per denature)، مرحله دوم شامل واسرشت شدن

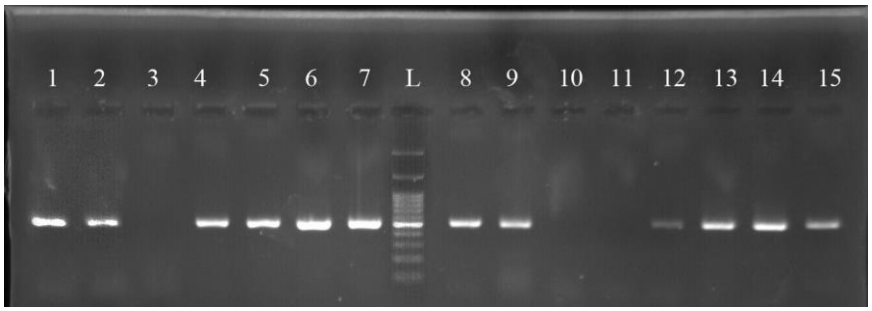
[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]

(Denature) در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال آغازگر به قطعه هدف (Annealing) در درجه حرارت ۵۶ درجه سانتی‌گراد و تکثیر قطعه موردنظر (Extension) در درجه حرارت ۷۲ درجه سانتی‌گراد هرکدام به مدت ۶۰ ثانیه برای ۳۵ چرخه صورت گرفت. در انتها بسط نهایی در درجه حرارت ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه در یک چرخه صورت پذیرفت (Ehsanpour *et al*., 2016) (Borrero-Pérez *et al*., 2019).

جدول ۱: توالی پیشرو و معکوس ژنوم 16S rRNA میتوکندریال خیارهای دریایی گونه *Holothuria parva*.

نام آغازگر	توالی نوکلئوتیدی آغازگر
16S-Forward	5'-GGTATCTTGACCGTGCAAAG -3'
16S-Reverse	5'-CYCCGGTTTKWACTCAGATC -3'

کیفیت محصولات PCR به‌دست‌آمده با استفاده از الکتروفورز نمودن نمونه‌ها به مدت ۴۰ دقیقه بر روی ژل آگاروز ۲ درصد و مشاهده باندهایی با طول ۵۲۹ جفت باز موردبررسی قرار گرفت (SolÍs-marÍn *et al*., 2018) (شکل ۲). در ادامه توالی یابی محصولات PCR به‌دست‌آمده با حجم ۲۰ ماکرو لیتر توسط شرکت دانش‌بنیان توپاز ژن بر اساس روش Sanger و همکاران (۱۹۷۷) با استفاده از توالی یاب اتوماتیک ABI 377 (Applied Biosystems Inc.) به‌صورت دوطرفه انجام شد.



شکل ۲: بررسی کیفیت محصول PCR نمونه‌های مختلف بر روی ژل آگاروز ۲ درصد (سال ۱۳۹۸).

پس از دریافت توالی‌ها با هم‌ردیفی موضعی (blastin–Nucleotide BLAST) توالی‌های به‌دست‌آمده و جستجو در پایگاه توالی‌های نوکلئوتیدی مرکز ملی اطلاعات زیستی صحت توالی‌های موردبررسی قرار گرفتند. در ادامه با استفاده از نرم‌افزارهای Chromas Pro و BioEdite طول کامل هر نمونه بازسازی و ذخیره گردید. سپس باهدف محاسبه ترکیب بازی توالی‌ها و نسبت جانشینی ترانزیشن به ترانسورژن، از طریق هم‌ردیفی چندگانه کلاستال (Clustal-W Multiple Aligment) محاسبه شد (Zhong *et al*., 2019). به‌منظور دستیابی به ماتریکس فاصله ژنتیکی از روش Kimura-2-parameter با در نظر گرفتن جهش‌های ترانزیشن و ترانسورژن و الگوی هموژن بین افراد با استفاده از نرم‌افزار MEGA X انجام گردید. ساخت درخت تبار زایشی (Phylogenetic tree) بر اساس الگوریتم Neighbor-Joining با پشتوانه تکرار (Bootstrap) ۱۰۰۰ صورت گرفت (Kimura, 1980). در ادامه تجزیه‌وتحلیل شاخص‌های تنوع ژنتیکی از قبیل تعداد هاپلوتیپ‌ها، تنوع هاپلوتیپی، تنوع نوکلئوتیدی، مکان‌های چندشکلی (Poly-morphism) و تک‌شکلی (Mon-morphism) به همراه واریانس بر اساس مدل Nei (Nei, 1978)، توسط نرم‌افزارهای BioEdite، MEGA X و DnaSP مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفت (Rozas *et al*., 2003).

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]

نتایج

نتایج حاصل از تعیین توالی منطقه 16S rRNA میتوکندریال توسط نرم‌افزار Chromas Pro حاکی از قرار گرفتن منطقه توالی یابی شده در محدوده ۵۲۹ جفت باز بود. پس از بر هم‌ردیفی موضعی توالی‌های نوکلئوتیدی به‌دست‌آمده در سایت مرکز ملی اطلاعات زیستی مشاهده شد که توالی‌های مربوط به سواحل بندر بوشهر و هلیله با توالی‌های ناحیه میتوکندریال 16s rRNA گونه *H.parva* ثبت‌شده در مرکز ملی اطلاعات زیستی به ترتیب به میزان ۱۰۰، ۹۹/۷۳ و ۱۰۰، ۹۹/۶۵ همپوشانی (Coverage) و همسانی (Identity) دارند. با استفاده از نرم‌افزار MEGA X تعداد جایگاه‌های حفاظت‌شده، متغیر، پارسیمونی و سینگلتونی تعیین گردید (جدول ۲).

جدول ۲: مقادیر جایگاه‌های نوکلئوتیدی حفاظت‌شده و متغیر گونه *Holothuria parva* شناسایی‌شده در مناطق مختلف (سال ۱۳۹۸).

زیستگاه	جایگاه نوکلئوتیدی	جایگاه حفاظت‌شده	جایگاه متغیر	پارسیمونی	سینگلتونی
ساحل بوشهر	۳۷۴	۳۷۲	۱	۰	۱
ساحل هلیله	۳۷۴	۳۶۹	۴	۱	۳

بر اساس اطلاعات به‌دست‌آمده بیشترین و کمترین نسبت بازی به ترتیب مربوط به نوکلئوتید A و G بود. همچنین بررسی فراوانی هر یک از نوکلئوتیدها به ترتیب در سواحل بوشهر و هلیله شامل نوکلئوتیدهای A (۲۹/۴۹، ۲۹/۱۹ درصد)، T (۲۶/۰۷، ۲۶/۲۴ درصد)، C (۲۳/۹۹، ۲۲/۹۶ درصد) و G (۲۱/۴۵، ۲۱/۶۱ درصد) و نسبت ترانزیشن به ترانسورژن برای پورین‌ها (K_1) و برای پریمیدین‌ها (K_2) به ترتیب معادل با ۱، ۷۶۵/۷۳۷ و ۱۰۰۰، ۱۰۰۰ تخمین زده شد. از سوی دیگر گرایش ترانزیشن به ترانسورژن سرتاسری نیز معادل با R به میزان ۲۴۰/۰۹۲ و ۴۳۴/۲۹۷ به ترتیب برای دو جمعیت‌های سواحل بوشهر و هلیله محاسبه گردید (جدول ۳).

جدول ۳: نسبت نوکلئوتیدهای مختلف در توالی‌های به‌دست‌آمده از ناحیه 16S rRNA میتوکندریال در نمونه‌های بررسی‌شده (سال ۱۳۹۸).

زیستگاه	درصد بازها						
	T(U)	C	A	G	GC	AT	Total
ساحل بوشهر	26.07	22.98	29.49	21.44	44.43	55.56	373
ساحل هلیله	26.19	22.92	29.30	21.57	44.49	55.50	373

تخمین حداکثر احتمال ترکیب (Maximum Composite Likelihood) الگوی جانشینی نوکلئوتیدی برای هر یک از بازها مربوط به جمعیت‌های مناطق مختلف بدین‌صورت بود که بیشترین میزان جانشینی ترانزیشن و ترانسورژن به ترتیب مربوط به باز تیمیدین با سیتوزین (۲۹/۲۲) و آدنین با تیمیدین و سیتوزین (۳/۴۲) می‌باشد (جدول ۴).

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]

جدول ٤: تخمین حداکثر احتمال ترکیب الگوی جانشینی نوکلئوتیدی برای بازهای گونه *Holothuria parva* مناطق مختلف (سال ۱۳۹۸).

	A	T	C	G
A	-	۳/۱۳	۲/۶۸	۹/۴
T	۳/۴۲	-	۲۵/۰۷	۲/۵
C	۳/۴۲	۲۹/۲۲	-	۲/۵
G	۱۲/۸۶	۳/۱۳	۲/۶۸	-

تجزیه‌وتحلیل جفت بازهای توالی 16S rRNA ژنوم میتوکندری جمعیت‌های مختلف خیار دریایی گونه *H.parva* جمع‌آوری‌شده از مناطق مختلف با استفاده از نرم‌افزار DnaSP نشان داد که بیشترین تعداد هاپلوتیپ‌های شناسایی‌شده در میان جمعیت‌های مختلف مربوط به نمونه‌های جمع‌آوری‌شده از ساحل هلیله می‌باشد. همچنین نتایج حاکی از آن بود که علیرغم منفی بودن مقادیر شاخص Tajima's D و Fu's Fs برای جمعیت بوشهر و هلیله هیچ‌گونه اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده نشد. لذا به دلیل ناهمگنی نرخ جهش در طول توالی نوکلئوتیدی این ژن‌ها، منفی‌ترین مقدار Fs معنی‌دار مربوط به‌توالی به‌دست‌آمده از ساحل هلیله بود (جدول ۵).

جدول ٥: میزان شاخص‌های ژنتیکی در جمعیت‌های مختلف خیار دریایی گونه *Holothuria parva* در مناطق مختلف (سال ۱۳۹۸).

زیستگاه	ساحل بوشهر	ساحل هلیله
تعداد هاپلوتیپ	۲	۴
G+C	۴۴٪/۴۳	۴۴٪/۴۹
تنوع هاپلوتیپی	۰/۰±۵/۲۶	۰±۱/۱۷
تنوع نوکلئوتیدی	۰/۰±۰۰۱۳/۰۰۱	۰/۰±۰۰۵۳/۰۰۵
*(P) Tajima's D	−۰/۶۱۲۳۷ (P>0.10)	−۰/۷۸۰۱ (P>0.10)
*(P) Fu's Fs	۰/۱۷۲ (۰/۴۱۹)	−۱/۸۷۲ (۰/۱۳۳)

بیشترین فراوانی هاپیلوتایپ‌های شناسایی‌شده در جمعیت ساحل بوشهر مربوط به هاپلوتایپ ۲ بود. لیکن فراوانی هاپلوتیپ‌های ۱ در جمعیت‌های جمع‌آوری‌شده از ساحل هلیله صفر بود (جدول ۶).

جدول ٦: تعداد هاپلوتایپ‌های شناسایی‌شده در جمعیت‌های مختلف خیار دریایی گونه *Holothuria parva* (سال ۱۳۹۸).

هاپلوتایپ	ساحل بوشهر	ساحل هلیله
۱	۱	۰
۲	۳	۱
۳	۰	۱
۴	۰	۱
۵	۰	۱

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]

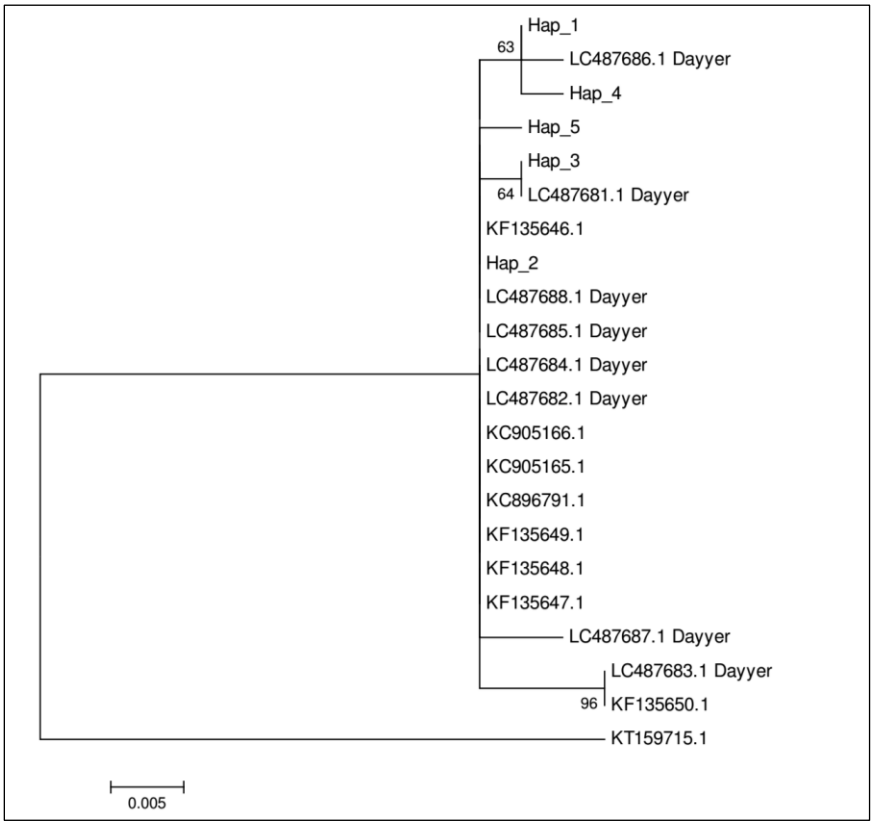
میزان تمایز ژنی (F_{st}) در نمونه‌های جمع‌آوری‌شده از سواحل بوشهر و هلیله ۰/۱۱۱- بود که ازلحاظ آماری هیچ‌گونه اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد. همچنین میزان جریان ژنی میان جمعیت‌های مختلف بر اساس اطلاعات هاپلوتیپ‌های موجود ۶ (Nei, 1973) و بر اساس اطلاعات به‌دست‌آمده از توالی یابی صورت گرفته ۲/۵ (Nei, 1982) بود. این در حالی بود که میزان نرخ واگرائی (میانگین تعداد جانشینی نوکلئوتید در هر جایگاه بین جمعیت‌ها) میان نمونه‌های جمع‌آوری‌شده از سواحل بوشهر و هلیله با کمترین میزان ۰/۰۰۳ محاسبه شد. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده بیشترین ماتریکس فاصله ژنتیکی به‌طور معنی‌داری میان هاپلوتیپ ۴ با ۳ و ۵ و کمترین ماتریکس فاصله ژنتیکی میان هاپلوتیپ ۲ با ۱، ۳ و ۵ وجود داشت (جدول ۷).

جدول ۷: ماتریس فاصله ژنتیکی هاپلوتیپ‌های جمعیت‌های مختلف خیار دریایی (*Holothuria parva*) جمع‌آوری‌شده از مناطق مختلف (رنگ مشکی) و مقادیر احتمال (p-value) آن‌ها (رنگ آبی) (سال ۱۳۹۸).

	هاپلوتیپ ۱	هاپلوتیپ ۲	هاپلوتیپ ۳	هاپلوتیپ ٤	هاپلوتیپ ٥
هاپلوتیپ ۱		۰/۰۰۳	۰/۰۰۴	۰/۰۰۳	۰/۰۰۴
هاپلوتیپ ۲	۰/۰۰۳		۰/۰۰۳	۰/۰۰۴	۰/۰۰۳
هاپلوتیپ ۳	۰/۰۰۶	۰/۰۰۳		۰/۰۰۵	۰/۰۰۴
هاپلوتیپ ۴	۰/۰۰۳	۰/۰۰۶	۰/۰۰۸		۰/۰۰۵
هاپلوتیپ ۵	۰/۰۰۶	۰/۰۰۳	۰/۰۰۶	۰/۰۰۸	

نتایج حاصل از ترسیم درخت تبار زایشی هاپلوتیپ‌های شناسایی‌شده بر اساس الگوریتم‌های Neighbor-Joining با تکرار ۱۰۰۰ برابر حاکی از آن بود که شباهت هاپلوتیپ ۴، ۱ با هاپلوتیپ به‌دست‌آمده از توالی ثبت‌شده در بانک جهانی ژن با شماره LC487686 متعلق به سواحل بندر دیر ۶۳ درصد و هاپلوتیپ ۳ با هاپلوتیپ LC487681 متعلق به سواحل بندر دیر ۶۴ درصد بود. لیکن هاپلوتیپ ۲ و ۵ شباهت زیادی با دیگر هاپلوتیپ‌های گونه *H.parva* ثبت‌شده در بانک جهانی ژن از سواحل شمالی خلیج‌فارس داشتند (شکل ۳).

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]



شکل ۳: درخت تبار زایشی هاپلوتیپ‌های شناسایی‌شده در منطقه 16S rRNA ژنوم میتوکندریال جمعیت‌های *Holothuria parva* و مقایسه آن‌ها با هاپلوتیپ‌های ثبت‌شده در بانک جهانی ژن بر اساس الگوریتم Neighbor-Joining (سال ۱۳۹۸).

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر از ژن 16s rRNA میتوکندریایی برای تعیین ساختار جمعیتی و رابطه فیلوژنی میان جمعیت‌های مختلف خیار دریایی در سواحل خلیج‌فارس شهرستان بوشهر استفاده شد. بررسی درصد نوکلئوتیدهای مختلف نشان داد که بیشترین درصد GC مشاهده‌شده در نمونه‌های جمع‌آوری‌شده از ساحل بوشهر و هلیله ۴۴/۴ درصد است. این در حالی بود که در مطالعه صورت گرفته بر روی گونه *H.parva* جداسازی شده از بندر بستانه و دیر توسط این مقادیر ۴۳/۶ درصد عنوان گردید (عالمی‌نیسی و همکاران، ۱۳۹۴).

در بازنگری انجام‌شده بر روی ژنوم میتوکندریایی در جمعیت‌های مختلف *H.parva* مشاهده شد که نرخ جهش‌های ترانسورژن (متقاطع یا تراگشتی) بر ترانزیشن (انتقالی یا هم‌گشتی) برتری دارد. به‌طوری‌که نسبت هم‌گشتی به تراگشتی (R) در این مطالعه با به‌کارگیری ژن، 16s rRNA معادل ۴۲۳/۳۷۹ بود. همچنین با توجه به شناسایی ۵ هاپلوتیپ در مطالعه فوق مشاهده شد که بیشترین فراوانی هاپلوتیپ مربوط به نمونه‌های جمعیت‌های جمع‌آوری‌شده از سواحل هلیله با ۴ عدد می‌باشد لیکن از این تعداد، هاپلوتیپ ۲ در هر دو جمعیت مشابه بود که با توجه به اطلاعات به‌دست‌آمده نمی‌توان آن‌ها را به‌عنوان دو جمعیت متفاوت تلقی نمود. Alami Naysi و همکاران (۲۰۱۶) در مطالعه مشابه پس از بررسی ساختار جمعیتی خیار دریایی گونه *H. parva* با استفاده از توالی یابی ژن ریبوزومال میتوکندری 16S rRNA در سواحل خلیج‌فارس (بندر دیر و بستانه) درمجموع تعداد ۵ هاپلوتیپ شناسایی نمودند که از این تعداد ۳ هاپلوتیپ مربوط به نمونه‌های جمع‌آوری‌شده از بندر بستانه و

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]

۲ هاپلوتیپ مربوط به بندر دیر بود. شایان‌ذکر است که بر اساس نتایج به‌دست‌آمده هاپلوتیپ ۲ و ۴ باهم مشترک بودند. این الگوی تنوع ژنتیکی می‌تواند منجر به توسعه و بروز هاپلوتایپ های اختصاصی شده و نشان‌دهنده نگهداری و حفظ جهش‌های نوین است (Afkhami *et al*., 2012).

با توجه متغیر بودن مقادیر تراز تنوع هاپلوتایپی بین صفر (همه افراد دارای هاپلوتایپ یکسان) تا یک (هر فرد دارای هاپلوتایپ متفاوت) (Aboim *et al*., 2005) مشاهده شد که میانگین تنوع هاپلوتیپی *H. parva* در ساحل بوشهر و هلیله به ترتیب ۰/۵ و ۱ می‌باشد. این در حالی بود که در مطالعه مشابه میانگین تنوع هاپلوتایپی در منطقه بستانه و دیر به ترتیب ۰/۸۴ و ۰/۵ بود (Alami Naysi *et al*., 2016). با توجه به مقادیر به‌دست‌آمده برای جمعیت‌های بررسی‌شده در دو منطقه موردمطالعه حاکی از بالا بودن این مقادیر است (زارعی و علی پناه، ۱۳۹۲). شایان‌ذکر است که در مطالعات دیگر نیز نتایج مشابهی از طریق به‌کارگیری ژن 16s rRNA خیار دریایی همراه با تنوع هاپلوتایپی بالا دیده‌شده بود (Vargara Chen *et al*., 2010). از سوی دیگر مشاهده شد که میزان تنوع نوکلئوتیدی جمعیت‌های مختلف *H. parva* نمونه‌گیری شده از ساحل بوشهر و هلیله به ترتیب ۰/۰۰۱۳ و ۰/۰۰۵۳ می‌باشد. این در حالی بود که مقادیر به‌دست‌آمده توسط Alami Naysi و همکاران (۲۰۱۶) میزان تنوع نوکلئوتیدی در بندر بستانه و دیر به ترتیب ۰/۰۰۷ و ۰/۰۰۲ برآورد شد. لذا با توجه به مقادیر به‌دست‌آمده نرخ تنوع نوکلئوتیدی در هر دو مطالعه در مناطق مختلف پایین گزارش شد. گفتنی است که مقادیر تنوع نوکلئوتیدی به‌دست‌آمده در مطالعه حاضر قابل‌مقایسه با بررسی‌های سایر پژوهشگران روی دیگر خارتنان است (Uthicke and Benzie, 2003).

نتایج واگرایی تکاملی نمونه‌های جمع‌آوری‌شده باهم و با دیگر نمونه‌های موجود در مرکز ملی اطلاعات زیستی حاکی از واگرایی ناچیز در توالی‌های ژن 16S rRNA میتوکندریال می‌باشد. ازاین‌رو می‌توان این‌گونه عنوان نمود که مهاجرت یکی از عوامل اصلی واگرایی ژنتیکی کم در بین نمونه‌های بررسی‌شده می‌باشد ولی به‌تنهایی نمی‌تواند عامل اصلی این پدیده به‌حساب آید. لذا ممکن است پدیده رؤیت شده ناشی از اثر کاهش در اندازه جمعیت مؤثر در سال‌های اخیر باشد (Calderon and Aquilabs., 2008). Grant و Bowen (۱۹۹۸) عنوان نمودند که جمعیت‌ها با تنوع هاپلوتایپی بالا (h >۰/۵) و تنوع نوکلئوتیدی پایین (pi < ۰/۵ درصد) به این صورت تفسیر می‌شوند که این جمعیت‌ها اخیراً در شرایط تنگنا قرارگرفته‌اند و درنهایت یک رشد جمعیتی سریع را پشت سرنهاده‌اند. به‌طورکلی با توجه به پارامترهای اساسی تنوع ژنتیکی شامل تعداد هاپلوتایپ (h)، تنوع هاپلوتایپی (Hd)، تنوع نوکلئوتیدی (Pi)، تعداد جایگاه‌های پلی‌مورف (S) و تعداد جایگاه‌های منومورف (M) در گونه‌های بررسی‌شده مشاهده شد که به دلیل شباهت بالایی ژنتیکی جمعیت‌های بررسی‌شده به دلیل تنوع هاپلوتایپی بالا و تنوع نوکلئوتیدی پایینی میزان تنوع ژنتیکی هر یک از گونه‌ها به میزان قابل‌توجهی کاهش‌یافته بود.

به دلیل شباهت بالای ژنتیکی میان دو جمعیت بررسی‌شده نتایج حاصل از تمایز ژنتیکی حاکی از وجود مقادیر بسیار ناچیز بود که بر اساس نتایج به‌دست‌آمده احتمالاً به دلیل نامحدود بودن بوم سازگارهای دریایی و فاصله جغرافیایی اندک بین دو منطقه و برقراری یک جریان ژنی بالا (۶) بین هاپلوتیپ‌ها، سبب پدید آمدن چنین ساختار ژنتیکی شده است. در برخی بررسی‌ها نیز عنوان‌شده که تمایز ژنتیکی معنی‌داری درنتیجه محدودیت در جریان ژنی وجود دارد (Uthicke and Benzie 2003) که بیشتر مربوط به تفاوت در زیستگاه‌ها لاگونی در برابر ساحلی و وجود موانع ریز جغرافیایی بوده است. در این رابطه Vargara Chen و همکاران (۲۰۱۰) نتایج مشابهی به دست آوردند. بنا بر نتایج به‌دست‌آمده می‌توان تخمین زد که تداوم جریان ژنی بالا بین هر دو منطقه، مانع از تمایز ژنتیکی می‌شود. بااین‌وجود در مطالعه مشابه شاخص ژنتیکی تمایز ژنتیکی (Fst) ناچیز (۰/۰۰۰) و نرخ واگرائی (Dxy) ۰/۰۰۴۸ و جریان ژنی (Nm) بالا ۱۸۷۴ بین دو منطقه بستانه و دیر برآورد گردید (Alami Naysi *et al*., 2016)؛ بنابراین عوامل مختلف زیست‌محیطی شامل نیروهای گزینشی مانند دما، شوری، جریانات آبی و نوع چرخه زندگی و عوامل محدودکننده جریان ژنی ازجمله این عوامل تأثیرگذار بر روی ساختار ژنتیکی جانداران دریایی هستند (Vergara-Chen *et al*., 2010).

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]

عموماً انتظار می‌رود در بی‌مهرگان دریایی که دارای توانایی پراکنش بالایی هستند و دوره‌های زندگی با فاز پلاژیک و اندازه جمعیت بزرگی دارند، شاهد سطح بالای جریان ژنی و ساختار ژنتیکی جمعیتی ضعیف در مقیاس‌های جغرافیایی کوچک باشیم (Garoia *et al*., 2004). با توجه به اینکه خیارهای دریایی دارای لاروهای پلاژیک بوده و از یک دوره ۱۳ تا ۲۶ روزه برخوردارند (Ivy and Giraspy 2006). همچنین در مطالعه صورت گرفته بر روی ۱۵ جمعیت خیار دریایی گونه *H. scabra* موجود در سراسر مجمع‌الجزایر فیلیپین با استفاده از ۱۱ نشانگر ریز ماهواره‌ای عنوان شد که فاصله ژنتیکی ایجادشده بین جمعیت‌های موجود تا حد زیادی ناشی از جریان‌های اقیانوسی است که بر روی ساختار ژنتیکی خیارهای دریایی تأثیر می‌گذارد (Ravago-Gotanco and Kim, 2019)؛ بنابراین مطالعه حاضر تأییدکننده وجود ارتباط ژنتیکی بالای میان آن‌ها بود. نتایج مقایسه و هم‌ترازی توالی‌های به‌دست‌آمده در بررسی کنونی در مرکز ملی اطلاعات زیستی و ترسیم درخت‌های تکاملی ازنظر مولکولی حاکی از تأیید وجود گونه *H.parva* در دو منطقه بوشهر و هلیله بود؛ بنابراین می‌توان گفت که ژن میتوکندریایی 16s rRNA نشانگر مناسبی برای شناسایی این‌گونه در خلیج‌فارس می‌باشد. با توجه به اینکه در درخت‌های تبار زایشی ترسیم‌شده، فواصل ژنتیکی به‌دست‌آمده نمایانگر جمعیت‌های مجزایی نبودند، این احتمال وجود دارد که نمونه‌های مربوط به گونه *H. parva* جمع‌آوری‌شده از ساحل بوشهر و هلیله به دلیل جریان ژنی بالا و وجود هاپلوتایپ مشترک از یک جمعیت یکسان باشند.

منابع

توسل پور، ز.، ۱۳۸۷. بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت خیار دریایی *Holothuria atra* در مناطق بستانه و نایبند با استفاده از روش RAPD. پایان‌نامه کارشناسی ارشد دانشگاه علوم و فنون خرمشهر. ۱۰۰ ص.

صفری، ر.، قاسمی، س. ا.، رضوانی گیلکلایی، س. و غفاری، ه.، ۱۳۹۷. بررسی ساختار جمعیتی خیار دریایی گونه *Holothuria leucospilota* در سواحل شمالی خلیج‌فارس و دریای عمان با استفاده از روش توالی یابی DNA. نشریه علوم آبزی‌پروری. ۷(۱۲)، صفحات ۴۳-۵۱.

عالمی‌نیسی، ل.، سالاری علی‌آبادی، م. ع.، ذوالقرنین، ح. و پاشا زانوسی، ح.، ۱۳۹٤. بررسی ساختار جمعیتی خیار دریایی *Holothuria parva* با استفاده از توالی یابی ژن ریبوزومال میتوکندری (16S rRNA) در سواحل شمالی خلیج‌فارس. مجله علوم و فنون دریایی. ۱۴(۴)، صفحات ۳۴-۴۳.

نیامیمندی، ن.، کیمرام، ف.، صالحی، ح.، ولی‌نسب، ت.، عوفی، ف.، شعبانی، م. ج.، اسماعیلی، ع. ر.، آئین جمشید، خ.، حسنی شبانکاره، ح.، پذیر، م. خ.، اژدهاکش‌پور، ا.، حسین‌زاده، ه.، پورکاظمی، م. و رضوانی گیلکلائی، س.، ۱۳۹۸. ارزیابی ذخایر و تعیین الگوی پراکنش گونه‌های غالب خیار دریایی در آب‌های ساحلی استان بوشهر. گزارش علمی مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور. شماره ثبت: ۵۶۹۷۱. ۴۳ ص.

Aboim, M. A., Menezes, G. M., Schlitt, T. and Rogers, A. D., 2005. Genetic structure and history of populations of the deep-sea fish *Helicolenus dactylopterus* (Delaroche, 1809) inferred from mtDNA sequence analysis. Molecular Ecology, *14*(5):1343-1354.

Afkhami, M., Ehsanpour, M., Khazaali, A., Kamrani, E., Mokhlesi, A., Bastami, K. D., 2012. Sea cucumber fisheries of Qeshm Island, Persian Gulf. SPC Beche-de-mer Information Bulletin, 32: 60-61.

Alami Naysi, L., Salari Aliabadi, M., Zolgharnean, H. and Pasha Zanousi, H., 2016. Population structure of sea cucumber *Holothuria parva* using 16S mitochondrial rRNA gene sequences in the northern coast of Persian Gulf. Journal of Marine Science and Technology, *14*(4): 34-43.

Borrero-Pérez, G. H. and Vanegas-González, M. J., 2019. Holothuria (Mertensiothuria) viridiaurantia sp. nov.(Holothuriida, Holothuriidae), a new sea cucumber from the Eastern Pacific Ocean revealed by morphology and DNA barcoding. ZooKeys, 893: 1.

Calderon, J. L. and Aquilabs, SA Co., 2008. Composition of hypochlorous acid and its applications. U.S. Patent 7,323,118.

Chapman, A. D., 2009. Numbers of living species in Australia and the world.

Chawla, H. S., 2002. Introduction to Plant Biotechnology. Second edn. Printed in India.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]

Conand, C., 2018. Tropical sea cucumber fisheries: Changes during the last decade. Marine pollution bulletin, 133:590-594.

Ehsanpour, Z., Archangi, B., Salimi, M., Salari, M. A. and Zolgharnein, H., 2016. Morphological and Molecular Identification of *Holothuria* (Selenkothuria) *parva* from Bostaneh Port, Persian Gulf.

Garoia, F., Guarniero, I., Ramšak, A., Ungaro, N., Landi, M., Piccinetti, C., Mannini, P. and Tinti, F., 2004. Microsatellite DNA variation reveals high gene flow and panmictic populations in the Adriatic shared stocks of the European squid and cuttlefish (Cephalopoda). Heredity, *93*(2), pp.166-174.

Grant, W. A. S. and Bowen, B. W., 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. Journal of heredity, *89*(5), pp.415-426.

Huang, W., Huo, D., Yu, Z., Ren, C., Jiang, X., Luo, P., Chen, T. and Hu, C., 2018. Spawning, larval development and juvenile growth of the tropical sea cucumber Holothuria leucospilota. Aquaculture, 488: 22-29.

Ivy, G. and Giraspy, D. A. B., 2006. Development of large-scale hatchery production techniques for the commercially important sea cucumber *Holothuria scabra* veriscolor(Conand, 1986) in Queensland, Australia. Beche-de-Mer information bulletin, (24), pp.28-34.

Kamarudin, K. R., Rehan, A. M., Hashim, R., Usup, G., Ahmad, H. F., Anua, M. H. and Idris, M. Y., 2011. Molecular phylogeny of *Holothuria* (Mertensiothuria) *leucospilota* (Brandt 1835) as inferred from cytochrome C oxidase I mitochondrial DNA gene sequences. Sains Malaysiana, *40*(2), pp.125-133.

Kerr, A. M., Janies, D. A., Clouse, R. M., Samyn, Y., Kuszak, J. and Kim, J., 2005. Molecular phylogeny of coral-reef sea cucumbers (Holothuriidae: Aspidochirotida) based on 16S mitochondrial ribosomal DNA sequence. Marine Biotechnology, *7*(1): 53-60.

Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of molecular evolution, 16: 111-120.

Lo, C. F., Leu, J. H., Ho, C. H., Chen, C. H., Peng, S. E., Chen, Y. T., Chou, C. M., Yeh, P. Y., Huang, C.J., Chou, H. Y. and Wang, C. H., 1996. Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. Diseases of aquatic organisms, *25*(1-2): 133-141.

Mashjoor, S. and Yousefzadi, M., 2019. Cytotoxic effects of three Persian Gulf species of Holothurians. Iranian journal of veterinary research, 20(1): 19.

Nei, M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics, 89: 583-590.

Pawson, D. L., 2007. Phylum echinodermata. Zootaxa, *1668*(1): 749-764.

Ravago-Gotanco, R. and Kim, K. M., 2019. Regional genetic structure of sandfish *Holothuria* (Metriatyla) *scabra* populations across the Philippine archipelago. Fisheries Research, 209: 143-155.

Rawson, K. and Hoagland, P., 2019. Sea cucumbers in a pickle: the economic geography of the serial exploitation of sea cucumbers. Ecology and Society, 24(4).

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

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences, 74: 5463-5467.

SolÍs-marÍn, F. A., Arriaga-Ochoa, J. A., Villa, C. M. G. and Laguarda-Figueras, A., 2018. Lissothuria imbricata sp. nov., a new species of sea cucumber (Echinodermata: Holothuroidea) from the central-eastern Pacific Ocean. Zootaxa, 4438(2): 373-380.

Sloan, N.A. and Von Bodungen, B., 1980. Distribution and feeding of the sea cucumber *Isostichopus badionotus* in relation to shelter and sediment criteria of the Bermuda platform. Marine Ecology Progress Series, *2*(11): 257-264.

Soto-Hernandez, J. and Grijalva-Chon, J., 2005. Genetic differentiation in hatchery strains and wild white shrimp *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei* (Boone, 1931) from northwest Mexico. Aquaculture International 12: 593-601.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]

Uthicke, S. and Benzie, J. A. H., 2003. Gene flow and population history in high dispersal marine invertebrates: Mitochondrial DNA analysis of *Holothuria nobilis* (Echinodermata: Holothuroidea) populations from the Indo-Pacific. Molecular Ecology, *12*(10): 2635-2648.

Vergara-Chen, C., González-Wangüemert, M., Marcos, C. and Pérez-Ruzafa, A., 2010. Genetic diversity and connectivity remain high in *Holothuria polii* (Delle Chiaje 1823) across a coastal lagoon-open sea environmental gradient. Genetica, *138*(8): 895-906.

Yang, Q., Lin, Q., Wu, J., Tran, N.T., Huang, R., Sun, Z., Zhu, Z., Lu, Z., Li, S. and Zhou, C., 2019a. Complete mitochondrial genome of *Holothuria leucospilata* (Holothuroidea, Holothuriidae) and phylogenetic analysis. Mitochondrial DNA Part B, 4(2): 2751-2752.

Yang, Q., Lin, Q., Yang, F., Wu, J., Lu, Z., Li, S. and Zhou, C., 2019b. Characterization of the complete mitochondrial genome of a holothurians species: *Holothuria hilla* (Holothuroidea: Holothuriidae). Mitochondrial DNA Part B, 4(2): 2847-2848.

Zhong, S., Liu, Y., Huang, L., Zhao, Y. and Huang, G., 2019. The complete mitochondrial genome of black sea cucumber Holothuria leucospilota (Aspidochirotida holothuriidae). Mitochondrial DNA Part B, 4(2):3377-3378.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]