بررسی ملکولی و شناسایی توتیای دریایی (*Echinometra sp.*) در خلیج‌فارس با استفاده از ژنوم میتوکندریایی 16SrDNA

مریم طلا [۱]

سعید تمدنی جهرمی[۲]*

۱. استادیار گروه شیلات، واحد قشم، دانشگاه آزاد اسلامی، قشم، ایران.

۲. دانشیار پژوهشکده اکولوژی خلیج‌فارس و دریای عمان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرعباس، ایران.

***مسئول مکاتبات:**

Stamadoni@gmail.com

کد مقاله: ۱۴۰۱۰۴۰۹۷۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۱۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۳/۱۵

این مقاله پژوهشی و برگرفته از طرح پژوهشی است.

چکیده

الگوهای فیلوژنی و پراکندگی توتیای دریایی از جنس *Echinometra* (*Echinodermata*, *Echinoidea*) به‌طور گسترده به‌عنوان یک مدل برجسته برای گونه‌زایی دریایی مورداستفاده قرارگرفته است. در این مطالعه شجره شناسی این جنس در منطقه خلیج‌فارس (سواحل جزیره هرمز) در پاییز سال ۱۴۰۱ انجام و بعد استخراج DNA و توالی یابی با استفاده ژن 16SrDNA، فاصله ژنتیکی این جنس با دیگرگونه‌های گزارش‌شده از نقاط دیگر دنیا مورد مقایسه و تجزیه‌وتحلیل قرار گرفت. این مطالعه درجه بالایی از پلی مورفیسم و مقادیر بالایی از تنوع ژنتیکی را بین جنس *Echinometra* و دیگرگونه‌ها ازجمله در گونه *Echinus esculentus* بافاصله ژنتیکی بیش از ۳۲ درصد نشان داد. در این مطالعه، تجزیه‌وتحلیل ژنتیکی توالی‌ها تائید کرد که گونه‌هایی ازجمله *H.tubervulata*، *H. erythrogromma*، *H. australiae*، *Heliocidaris crassispina*، *Paracentrotus lividus*، *Loxechinus albus*، *Sterechinus neumayeri*، *Pseudocentrotus depressus*، *Heliocidaris bajulus* و نیز *Echinus esculentus* از مناطقی مانند کانادا، استرالیا، کره جنوبی، ژاپن، نیوزلند و انگلستان در کلاید اول قرار گرفتند. همچنین توالی جدید به‌دست‌آمده از جنس *Echinometra* با توالی‌های گزارش‌شده از گونه‌های مختلف دیگری مانند *Tripneustes gratili*، *Sphaerechinus granularis*، *Toxopneustes pileolus* از مناطقی از اقیانوس اطلس مانند پاناما و نیز مالزی، کره جنوبی و فرانسه در کلاید دوم خود را نشان دادند. در تحقیق حاضر درخت تکاملی نشان‌دهنده یک هاپلوتایپ جدید از جنس *Echinometra* با اختلاف ژنتیکی بالا بوده که از دیگر نمونه‌های ثبت‌شده در بانک جهانی ژن متمایز گردید.

واژگان کلیدی: توتیای دریایی، 16SrDNA، خلیج‌فارس.

مقدمه

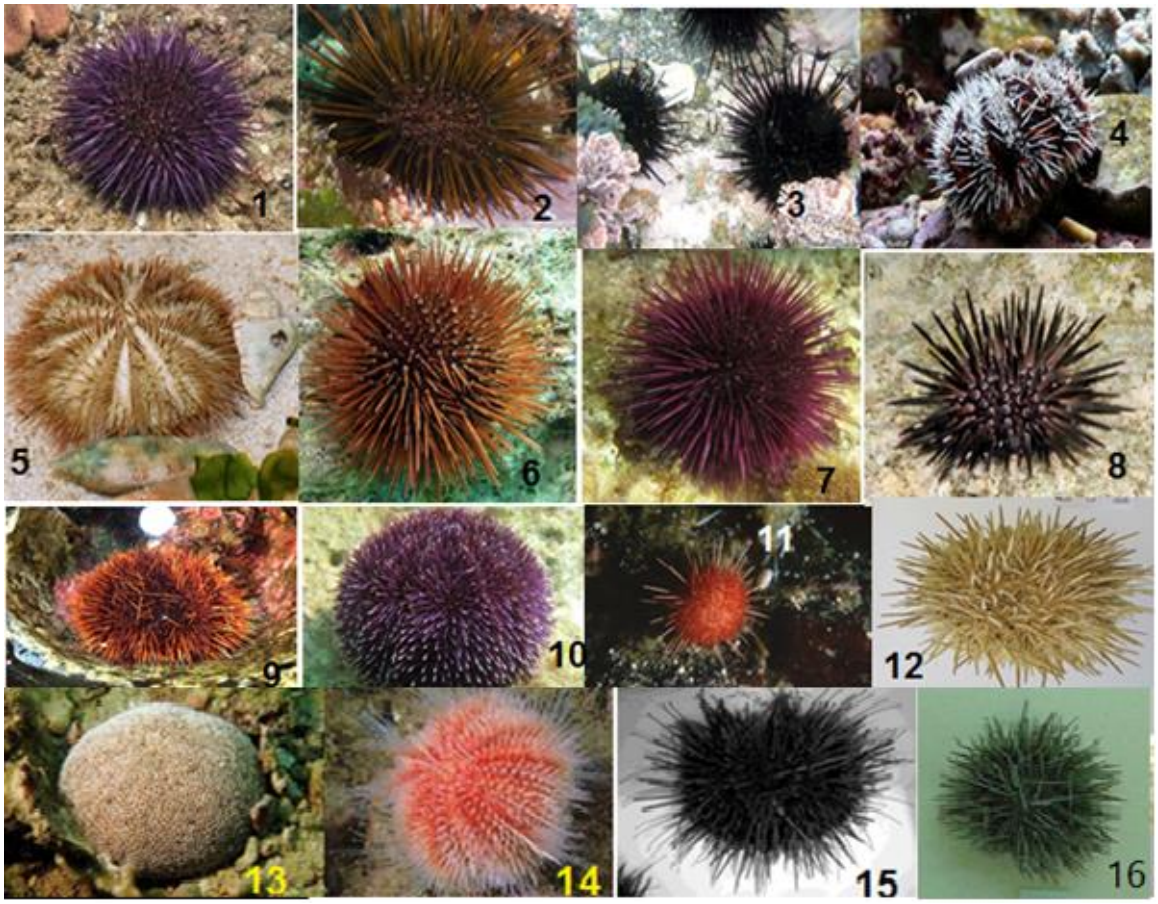
خارپوستان یک گروه خواهری از فایلوم Chordate هستند .این گروه بیش از ۵۰۰ میلیون سال پیش و در دوره کامبرین از این فایلوم قبل از منشعب شده است. توتیای دریایی بیش از ۱۵۰ سال به‌عنوان یک ارگانیسم نمونه در زیست‌شناسی تکاملی استفاده‌شده است .با استفاده از این جانوران، دانشمندان توانسته‌اند مکانیسم‌های کنترل چرخه سلولی و چسبندگی سلولی، لقاح، سیگنال دهی کلسیم، تمایز سلولی و مرگ را به‌تفصیل توصیف کنند. توالی موازی عظیم ژنوم توتیای دریایی رمزگشایی اجزای اصلی شبکه‌های تنظیم‌کننده ژن را در طول فعال شدن مسیرهای سیگنال دهی جنینی امکان‌پذیر کرد. توتیای دریایی به‌راحتی در آزمایشگاه تکثیر می‌شود، جنین شفاف است و ساختار ساده‌ای دارد و نیز به دست آوردن کشت های هم‌زمان جنین و القای جنین زایی در توتیای دریایی سریع آسان است. توالی یابی ژنوم و توصیف شبکه‌های پیچیده تنظیم‌کننده ژن در طول جنین‌هایی در توتیای های دریایی، بررسی این جانور را برای مطالعه تنظیم بیان ژن ضروری ساخته است (Adonin *et al*., 2021).

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-09]

توتیای دریایی (*Echinodermata*: *Echinoidea*) به دلیل توانایی در تغییر ترکیب و پویایی منابع جلبکی توسط چرای خود، جانوران اصلی در مناطق ساحلی هستند (Elmasry *et al*., 2013). شکل ۱ تصویری از تنوع مورفولوژیکی گونه‌های مختلف توتیای دریایی را نشان می‌دهد. مطالعات در مورد وضعیت جمعیت‌های اکینوئید در حوضه خلیج‌فارس ازجمله داده‌های اساسی مانند فیلوژنتیک و ساختار جمعیت، توزیع و پویایی و وضعیت شیلات کمیاب است. کالدرون و همکاران (۲۰۱۰) اظهار داشتند که برخی از گونه‌های خارپشت دریایی دارای تنوع زیادی در رنگ‌دانه هستند .این تنوع ممکن است نتیجه انعطاف‌پذیری فنوتیپی باشد یا ممکن است با واگرایی ژنتیکی بین مورف ها همراه باشد و گونه‌های دارای چندرنگ ممکن است در مسیر تبدیل‌شدن به گونه‌های جدید از طریق گونه‌زایی سیمپتریک (در اثر عدم وجود موانع فیزیکی خاص) باشند. اکینوئیدها به‌راحتی با اسکلت‌های پوشیده از ستون فقرات که از صفحات متعدد به‌هم‌پیوسته تشکیل‌شده است، تشخیص داده می‌شوند. اندکی بیش از ۱۰۰۰ گونه زنده تا به امروز با تنوعی که ریشه آن حداقل به پرمین بازمی‌گردد توصیف‌شده است (Kroh, 2020). اگرچه تلاش زیادی برای روشن کردن درخت اکینوئید زندگی با استفاده از انواع داده‌های مورفولوژیک انجام‌شده است، تلاش‌های مولکولی تنها بر تعداد معدودی از ژن‌ها متکی بوده‌اند. شواهد فسیلی نشان می‌دهد که این جنس و همچنین تنوع عظیمی از خویشاوندان منقرض‌شده، منشأ خود را به اوایل پالئوزوئیک می‌رسانند (Paul and smith, 1984). امروزه، توتیاهای دریایی ساکنان برجسته قلمرو دریایی هستند و در تمام زیستگاه‌های اعماق دریا از قطب ها تا استوا و از مناطق جزر و مدی تا مناطق پرتگاهی زندگی می‌کنند و نقش مهمی در سلامت و پویایی صخره‌های مرجانی دارند (Emlet and Hoegh-Guldberg, 1997). در این حال مکانیسم‌های حاکم بر واگرایی تکاملی در سیستم‌های دریایی به‌خوبی شناخته‌نشده‌اند، جایی که موانع واضح برای جریان ژنی غیرمعمول است و ارگانیسم‌ها به‌طورکلی قابلیت‌های پراکندگی بالایی از خود نشان می‌دهند. (Takeuchi *et al*., 2020). . توتیای های دریایی مهندسین حیاتی اکوسیستم در سراسر جهان هستند، به‌ویژه در زیستگاه‌های ساحلی کم‌عمق، جایی که چرا آن‌ها نقش مهمی در فرسایش زیستی و کنترل جلبک ایفا می‌کند (مک کلاناهان و موتیگا ۲۰۰۷). اکینومترها در آب‌های کم‌عمق (عمق ۱ تا ۳ متر) زندگی می‌کنند و در آب‌هایی تا عمق ۲۰ متری یافت می‌شوند (McClanahan and Muthiga, 2007). درمجموع، این صفات این‌گونه را به‌عنوان یک ارگانیسم عالی برای درک بهتر این است که چگونه استراتژی‌های مختلف تاریخ زندگی می‌توانند تکامل مولکولی را هدایت کنند. خلیج‌فارس نمونه‌ای از یک محیط دریایی است که با تنگه باریک (۴۲ کیلومتری) هرمز از خلیج عمان و اقیانوس هند جداشده است و یکی از گرم‌ترین دریاهای جهان است که میانگین روزانه دمای تابستان به‌طور منظم بیش از ۳۵ درجه سانتی‌گراد و بیش از ۳۷ درجه سانتی‌گراد است . برای درک بهتر این اکوسیستم‌های متنوع، بررسی گونه‌هایی با ویژگی‌ها و تاریخچه زندگی مختلف (به‌عنوان‌مثال، اندازه جمعیت، سیستم‌های جفت‌گیری، فیلوژنی و زمان‌بندی تولیدمثل) بسیار مهم است، زیرا این ویژگی‌ها ممکن است تأثیرات جریان ژن و رانش ژنتیکی را واسطه کنند. به دلیل اهمیت آن‌ها، توتیای دریایی به‌عنوان سیستم‌های مطالعه برای تعیین پتانسیل سازگاری با شرایط محیطی استرس‌زا مورداستفاده قرارگرفته‌اند (Pespeni *et al*., 2013). تا به امروز، هیچ مطالعه ژنومی خاصی در مورد گونه توتیاهای دریایی در منطقه خلیج‌فارس انجام‌نشده است و تنوع‌گونه‌ای و فیلوژنی مولکولی اکثر گونه‌های اکینوئید در ایران ناشناخته است ولی به‌تازگی در یک مطالعه روابط فیلوژنتیکی در جمعیت‌های متعلق به یکی از فراوان‌ترین گونه‌های جنس اکینومترا در خلیج‌فارس با استفاده از ژنوم COI انجام گرفت. تجزیه‌وتحلیل نشان داد که تمام نمونه‌ها از دو محل نمونه‌برداری یک کلاد تک فیلتیک اما مجزا قرار گرفتند (Kalantarian *et al*., 2022). از اواسط قرن نوزدهم، تحقیقات روی توتیای های دریایی نقش عمده‌ای در مدل‌سازی درک ما از لقاح حیوانات و جنین‌شناسی ایفا کرده است (Edmunds *et al*., 2001). با تبدیل‌شدن بسیاری از گونه‌ها به ارگانیسم‌های نمونه درزمینه‌ی زیست‌شناسی تکاملی، این شیوه از تحقیقات اخیراً از طریق استفاده از روش‌های توالی یابی به‌طور بنیادی گسترش‌یافته است، که منجر به پیشرفت‌های بزرگی در درک ما از سازمان‌دهی ژنوم و شبکه‌های تنظیم‌کننده ژنی می‌شود که زیربنای جنین‌زایی هستند (Davidson *et al*. 2006). جنس *Echinometra* در حال حاضر شامل هشت گونه است که دو گونه از آن‌ها هنوز توصیف نشده است و طبقه‌بندی در سطح گونه این جنس هنوز تکمیل‌نشده است (Reich *et al*., 2005). اگرچه مطالعات اولیه

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-09]

Echinometra نشان داد که تنها یک‌گونه از این جنس، *E. mathaei*، در اقیانوس آرام هند غربی گزارش‌شده است. (Thompson *et al.*, 2017). آرایه مورفولوژیک از خصوصیات مورداستفاده برای ترسیم گونه‌های اکینومتر شامل: طول، عرض و ارتفاع آزمایش، رنگ خارها، حلقه‌های آسیاب شده می‌باشد که متأسفانه کلیدهای مورفولوژیک موجود در حال حاضر در توانایی آن‌ها برای مشخص کردن همه گونه‌های این جنس محدود هستند و ماتریس‌های فیلوژنومیک محصول تاریخچه‌های تکاملی پیچیده‌ای هستند که تنها تا حدی توسط مدل‌های کنونی تکامل مولکولی ما ثبت‌شده‌اند. . در مطالعه حاضر توالی یابی ژنوم 16SrDNA برای توصیف الگوهای ژنی این جنس در گونه‌های موجود در خلیج‌فارس و نیز نمونه‌های گزارش‌شده از نقاط دیگر دنیا مورد مقایسه قرار گرفت. تنوع ژنتیکی و تجزیه‌وتحلیل جریان ژنی راه را برای درک الگوهای مهاجرت این جنس در منطقه خلیج‌فارس در مقایسه با گونه‌های دیگر در سایر نقاط جهان آسان‌تر می‌کند. این مطالعه به درک ما از تمایز ژنتیکی در بی‌مهرگان دریایی در زیستگاه‌های متفاوت ازنظر زیست‌محیطی و چگونگی ارتباط آن با آب‌وهوای در حال تغییر کمک می‌کند.



شکل ۱: تنوع مورفولوژیک گونه‌های مختلف توتیای های دریایی به ترتیب شامل گونه‌های:

1-Heliocidaris erythrogramm, 2- Heliocidaris tuberculata, 3- Heliocidaris crassispina, 4- Tripneustes gratilla, 5-Lytechinus variegatus, 6- Heliocidaris tuberculata,7- Paracentrotus lividus, 8- Echinometra sp, 9- Pseudocentrotus depressus, 10-Sphaerechinus granularis, 11-Sterechinus neumayeri, 12-Heliocidaris australiae, 13-Toxopneustes_pileolus 14-E. Echinus esculentus, 15-Loxechinus albus, 16-Paracentrotus gaimardi. (Froese and Pauly 2023).

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-09]

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از این جنس در منطقه خلیج‌فارس (سواحل جزیره هرمز) در پاییز ۱۴۰۱ انجام و به آزمایشگاه ژنتیک مولکولی پژوهشکده اکولوژی خلیج‌فارس و دریای عمان منتقل گردید. در این مطالعه پس از استخراج DNA، غلظت DNA با استفاده از بیوفتومتر ارزیابی گردید. تولید محصول PCR با استفاده از یک جفت پرایمر طراحی‌شده از ناحیه ریبوزومی 16SrDNA با استفاده از پرایمر فوروارد 16SA-R 5′-CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT-3′ و نیز پرایمر ریورس 16SB-R 5′-GCC GGT CTG AAC TCA GAT CAC GT-3′ (Palumbi *et al.*, 1991) انجام گردید. . شرایط PCR برای هر دو نشانگر شامل مرحله دناتوره اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه، ۳۵ سیکل (۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه، ۴۸ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه) و مرحله نهایی در ۷۲ بود. درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه بود. اندازه محصول PCR با الکتروفورز ژل روی ژل آگارز ۱/۵ درصد بررسی شد. پنج میکرو لیتر از محصول PCR تمامی نمونه‌ها به همراه مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت باز (Fermentas GmbH, Germany) در ژل آگارز دو درصد الکتروفورز و بقیه آن به همراه ۵۰ میکرو لیتر از پرایمر مورداستفاده با غلظت ۱۰ پیکومول به‌منظور تعیین توالی پس از ارسال به بخش مولکولی شرکت آمیتیس ژن، خالص‌سازی و به‌عنوان DNA الگو برای توالی یابی استفاده شدند. واکنش‌های توالی یابی DNA به همراه آغازگر forward با بسته BigDye، Foster City، Applied Biosystems، (BigDye kit v3.1, CA, USA) و توسط دستگاه DNA analyzer مدل XL3730 (Applied Biosystems, USA) انجام شد. پس از توالی یابی با استفاده از نرم‌افزار BioEdit و ابزار قدرتمند Blast و رویه Blastern در پایگاه NCBI میزان همولوژی توالی‌های به‌دست‌آمده سنجیده شد. پس از دریافت توالی‌ها، بازنگری توالی‌های مشابه با نرم‌افزار Chromas 2.23 انجام شد. به‌منظور شناسایی اختلاف میان توالی‌ها، نمونه‌های توالی یابی شده با نرم‌افزار Clustal W هم‌ردیف شدند (Thompson, 1994). درخت تکاملی به روش نزدیک‌ترین هم‌جواری (Neighbor-Joining) بر اساس مدل Kimura 2-parameter، با استفاده از نرم‌افزار MEGA 7 رسم گردید (Kimura, 1980). تنوع هاپلوتیپی با استفاده از نرم‌افزارهای DnaSP (Rozas *et al.*, 2003) و Median-Joining networks (Bandelt *et al.*, 1999) محاسبه شد.

نتایج

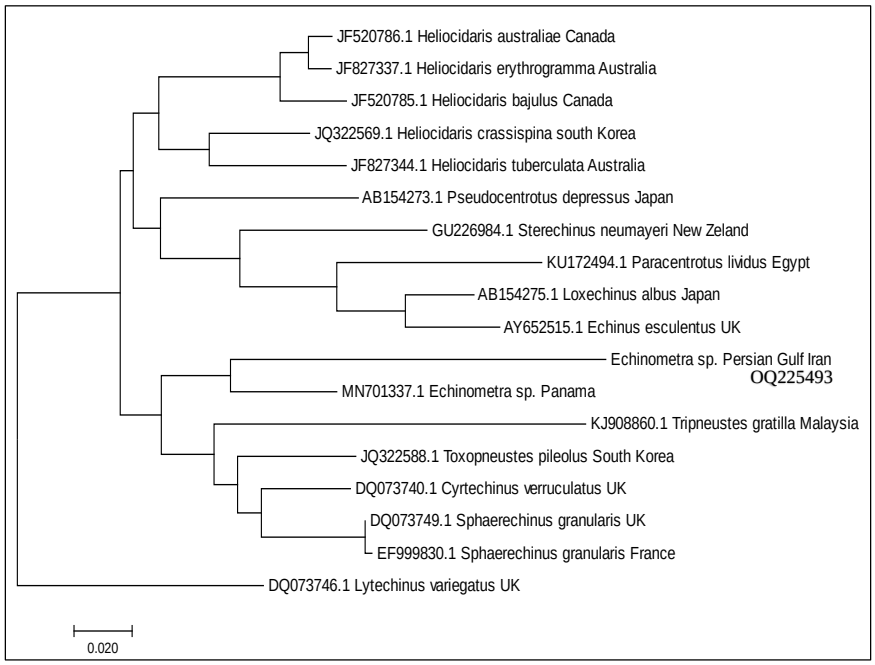
بهینه‌سازی واکنش PCR جهت تکثیر ژن 16SrRNA با استفاده از گرادیانت دمایی ۶۰- ۴۸ درجه سانتی‌گراد نشان داد که مناسب‌ترین دما برای اتصال آغازگر، دمای ۴۸ درجه سانتی‌گراد است. آغازگرهای امکان تکثیر بخشی از ژن COI به طول تقریبی ۶۴۵ جفت باز را فراهم نمودند. الگوی باندی محصول PCR روی ژل آگارز دو درصد در شکل زیر نمایش داده‌شده است. با استفاده از نشانگر 16SrDNA، ۵۱۵ جفت باز، برای نمونه به‌دست‌آمده از جنس *Echinometra* تعیین توالی شده و در بانک جهانی ژن (NCBI) با شماره دسترسی OQ225493 ثبت گردید (شکل ۲). ترازها الگوهای واضحی از تفاوت بین هرگونه را نشان داد. درخت فیلوژنتیک به‌دست‌آمده با گروه‌های برون گروهی با استفاده از درخت فیلوژنتیک با پارامترهای همسایگی (Neighbor Joining)، گونه‌های را به‌عنوان کلاسترهای جداگانه در یک کلاید برای هرگونه نشان داد. در این مطالعه درجه بالایی از پلی مورفیسم و مقادیر بالایی از تنوع ژنتیکی را بین چنس*Echinometra* و دیگرگونه ازجمله *Echinus esculentus* با بیش از ۳۲ درصد و کمترین فاصله ژنتیکی را با نمونه‌هایی از همین جنس از منطقه پاناما با ۱۶ درصد مشاهده گردید (جدول ۱). توالی به‌دست‌آمده از گونه توتیای های دریایی با استفاده از نرم‌افزارBioedit ویرایش و هم‌تراز تراز شده و درخت فیلوژنتیک با پارامترهای همسایگی (NJ) با استفاده از برنامه MEGA 6 با ۱۰۰۰ بوت استرپ با استفاده از مدل ۳ پارامتری محاسبه شدند (Tamura *et al.*, 2013). تجزیه‌وتحلیل ژنتیکی توالی‌ها با استفاده از نشانگر میتوکندری SrDNA۱۶ تائید کرد که گونه‌هایی ازجمله *H.tubervulata*، *H.*

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-09]

erythrogromma، *Paracentrotus lividus*، *Sterechinus neumayeri*، *Loxechinus albus*، *Pseudocentrotus depressus*، *Heliocidaris crassispina*، *Heliocidaris bajulus*، *H. australiae* و نیز *Echinus esculentus* از مناطقی مانند کانادا، استرالیا، کره جنوبی، ژاپن، نیوزلند و انگلستان جداگانه خود را در قالب توالی‌های برون گروهی دیگر در کلاید اول قرار گرفتند. همچنین توالی جدید به‌دست‌آمده در این مطالعه از جنس *Echinometra* با توالی‌های گزارش‌شده از گونه‌های مختلف دیگری مانند *Tripneustes gratili*، *Sphaerechinus granularis*، *Toxopneustes pileolus* از مناطقی از اقیانوس اطلس مانند پاناما و نیز مالزی، کره جنوبی و فرانسه در کلاید دوم خود را نشان دادند.

جدول ۱: فاصله ژنتیکی جنس *Echinometra* در مقایسه با گونه‌های دیگر در این مطالعه (پاییز ۱۴۰۱).

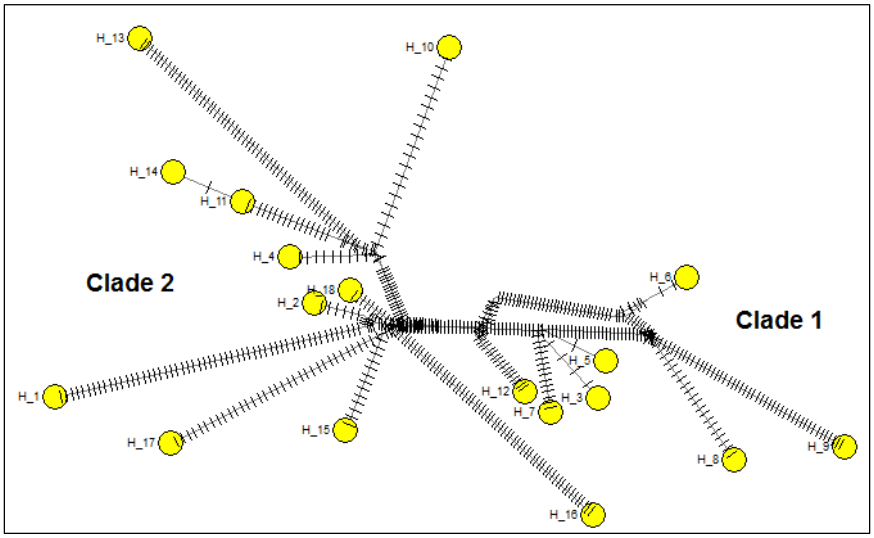
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1. Echinometra sp. Persian Gulf Iran																		
2. MN701337.1 Echinometra sp. Panama	0.166																	
3. JF520786.1 Heliocidaris australiae Canada	0.234	0.128																
4. DQ073740.1 Cyrtechinus verruculatus UK	0.206	0.129	0.144															
5. JF827337.1 Heliocidaris erythrogramma Australia	0.235	0.131	0.016	0.143														
6. JQ322569.1 Heliocidaris crassispina south Korea	0.235	0.150	0.102	0.161	0.102													
7. JF520785.1 Heliocidaris bajulus Canada	0.232	0.128	0.042	0.149	0.039	0.124												
8. JF827344.1 Heliocidaris tuberculata Australia	0.257	0.145	0.124	0.180	0.114	0.082	0.136											
9. AB154273.1 Pseudocentrotus depressus Japan	0.256	0.173	0.155	0.156	0.155	0.137	0.154	0.143										
10. JQ322588.1 Toxopneustes pileolus South Korea	0.231	0.126	0.152	0.072	0.151	0.148	0.145	0.172	0.142									
11. DQ073749.1 Sphaerechinus granularis UK	0.232	0.120	0.141	0.066	0.143	0.164	0.132	0.180	0.161	0.095								
12. GU226984.1 Sterechinus neumayeri New Zeland	0.279	0.169	0.156	0.188	0.170	0.152	0.171	0.172	0.181	0.186	0.175							
13. KJ908860.1 Tripneustes gratilla Malaysia	0.272	0.231	0.226	0.169	0.220	0.234	0.226	0.255	0.232	0.182	0.174	0.275						
14. EF999830.1 Sphaerechinus granularis France	0.235	0.123	0.143	0.069	0.146	0.167	0.135	0.182	0.164	0.092	0.002	0.178	0.177					
15. AB154275.1 Loxechinus albus Japan	0.304	0.205	0.193	0.198	0.190	0.168	0.205	0.201	0.163	0.193	0.214	0.125	0.290	0.217				
16. DQ073746.1 Lytechinus variegatus UK	0.290	0.184	0.202	0.209	0.199	0.195	0.208	0.178	0.200	0.212	0.217	0.231	0.276	0.220	0.225			
17. KU172494.1 Paracentrotus lividus Egypt	0.312	0.216	0.210	0.220	0.210	0.187	0.236	0.214	0.168	0.236	0.231	0.184	0.326	0.234	0.122	0.260		
18. AY652515.1 Echinus esculentus UK	0.324	0.212	0.196	0.214	0.193	0.179	0.208	0.211	0.172	0.203	0.215	0.142	0.309	0.218	0.056	0.238	0.122	



شکل ۲: درخت فیلوژنتیک با استفاده از پارامترهای همسایگی (NJ) تولیدشده از هم‌ترازی توالی‌های 16SrRNA میتوکندری (پاییز ۱۴۰۱).

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-09]

ژن 16SrRNAگونه‌های مختلف توتیاهای دریایی در منطقه خلیج‌فارس در مقایسه با نمونه‌های گزارش‌شده از مناطق دیگر به ترتیب در کلاید شماره ۱ هاپلوتایپ هایی از جنس *Echinometra* از خلیج‌فارس، به همراه هاپلوتایپ های از مناطقی مانند اقیانوس اطلس مانند پاناما و نیز مالزی، کره جنوبی انگلستان و فرانسه شامل توالی‌های گزارش‌شده از گونه‌های مختلف مانند *gratilia*، *granularis*، *vernuculatus*، *pileolus* و در نیز در کلاید دوم گونه‌های ازجمله *albus*، *lividus*، *neumayeri*، *bajulus*، *tubervulata*، *depressus*، *crassispina*، *erythrogromma*، *australiae* و نیز *esculentus* از مناطقی مانند کانادا، استرالیا، کره جنوبی، ژاپن، نیوزلاند و انگلستان. خطوط مورب نشان‌دهنده تعداد جابجایی‌های نوکلئوتیدی است. هاپلوتایپ شماره ۱۶ (*leytechinus vereiegatus*) به‌عنوان Out Group در نظر گرفته‌شده است (شکل ۳).



شکل ۳: ارتباط هاپلوتایپی توالی‌های موردبررسی بر اساس Median-joining haplotype network (Bandelt *et al*., 1999).

بحث و نتیجه‌گیری

اخیراً توجه محققان به تغییرات ژنتیکی زمانی و مکانی در بسیاری از موجودات دریایی جلب شده است (Calderon *et al*., 2010). Harley و همکاران (۲۰۰۶) در مورد مشکل ایجاد الگوهای ساختار ژنتیکی در بسیاری از موجودات دریایی که پلی کروماتیسم را نشان می‌دهند بحث کرده و اذعان داشتند که در برخی موارد، مورفوتیپ های رنگی دارای تنوع ژنتیکی هستند و حتی ممکن است گونه‌های جداگانه‌ای را نشان دهند. Xiao و Sha (۲۰۲۲) توالی ژنوم کامل میتوکندری (میتوژنوم) چهار گونه از توتیاهای دریایی اعماق دریا (*Echinoidea*) را تعین کردند. نتایج نشان دادند که محتوای ژن و آرایش ژنومی در میتوژنوم اکینوئیدها بسیار حفاظت‌شده هستند و اشاره کردند که موقعیت دودمان‌های اعماق دریا نشان‌دهنده نقش مهم دریاهای عمیق در ایجاد تنوع فعلی کلاس *Echinoidea* است. اولین توالی ژنوم توتیای دریایی *Strongylocentrotus purpuratus* حفاظت گسترده‌ای از مجموعه ژنی آن‌ها را آشکارکرده و به‌عنوان پشتیبان برای شفاف‌سازی شبکه‌های تنظیم‌کننده ژن عمل کرد

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-09]

(Marletaz *et al*., 2023). در مطالعه حاضر، تجزیه‌وتحلیل ژنتیکی توالی نشانگر میتوکندری 16SrDAN تائید کرد که گونه‌هایی ازجمله *H.tubervulata*، *H. erythrogromma*، *Paracentrotus lividus*، *Sterechinus neumayeri*، *Pseudocentrotus depressus*، *Loxechinus albus*، *Heliocidaris crassispina*، *H. australiae*، *Heliocidaris bajulus* و نیز *Echinus esculentus* از مناطقی مانند کانادا، استرالیا، کره جنوبی، ژاپن، نیوزلند و انگلستان جداگانه خود را در قالب توالی‌های برون گروهی دیگر در کلاید اول قرار گرفتند. همچنین توالی جدید به‌دست‌آمده در این مطالعه از جنس *Echinometra* با توالی‌های گزارش‌شده از گونه‌های مختلف دیگری مانند *Toxopneustes pileolus*، *Tripneustes gratili*، *Sphaerechinus granularis* از مناطقی از اقیانوس اطلس مانند پاناما و نیز مالزی، کره جنوبی و فرانسه در کلاید دوم خود را نشان دادند. این مطالعه، ادعای Calderon و همکاران (۲۰۱۰) را تأیید می‌کند که مورفوتایپ‌های مختلف از این جنس به هم مرتبط هستند و به نظر می‌رسد که مورفو تایپ یافت شده از جنس *Echinometra* در خلیج‌فارس ظاهراً ارتباط خوبی با جمعیت اقیانوس اطلس، مالزی و کره جنوبی دارند. در این حال جدایی جغرافیایی مهم‌ترین عامل شکل‌گیری ساختار ژنتیکی بین‌گونه‌ای و نیز در بین جمعیت‌ها است. بخشی از تنوع به وجود آمده بین گونه‌های مختلف به علت فاصله مکانی است. همچنین فاصلهٔ جغرافیایی زیاد بین جمعیت‌ها تأثیر مهمی روی ساختار ژنتیکی و جریان ژنی دارد (Wang *et al*., 2008). *Echinometra* گسترده‌ترین جنس خارپشت دریایی است و تمرکز طیف گسترده‌ای از مطالعات در اکولوژی، گونه‌زایی و تولیدمثل بوده است .بااین‌حال، داده‌های ژنتیکی موجود برای این جنس به‌طورکلی محدود به چند مکان منتخب است. با توجه به اینکه بسیاری از آن‌ها ازنظر جنسی خیلی دیر بالغ می‌شوند و فصل تولیدمثل آن‌ها محدود است، به دست آوردن نسل‌های بعدی در آزمایشگاه دشوار بوده است و درنتیجه در تحقیقات ژنتیک اخیر به‌عنوان ارگانیسم‌های مدل شناخته نمی‌شوند (Yaguchi and Yaguchi, 2022). ولی گسترش فناوری‌های توالی یابی، به‌ویژه توالی یابی کامل ژنوم، به‌طور چشمگیری ترکیب ژنوم ها را برای همه گونه‌ها، به‌ویژه آن‌هایی که دارای هتروزیگوسیته بالا و/یا محتوای تکراری هستند، بهبود بخشیده است .این پیشرفت‌ها به‌ویژه برای گونه‌هایی که در آن‌ها ژنوم مرجع نزدیک به هم وجود ندارد یا تعداد کمی وجود دارد و برای گونه‌هایی با اندازه‌های جمعیت بزرگ که تنوع نوکلئوتیدی معمولاً زیاد است، تأثیرگذار است. هردوی این عوامل برای بی‌مهرگان دریایی مشترک هستند (Ketchum *et al*., 2022). از طرف دیگر برخی از گونه‌های توتیا های دریایی دارای تنوع زیادی در رنگ‌دانه هستند. این تنوع ممکن است نتیجه انعطاف‌پذیری فنوتیپی باشد یا ممکن است با واگرایی ژنتیکی بین مورف‌ها همراه باشد. برای مثال گونه *Paracentrotus gaimardi* (شکل ۱ شماره ۱۶) در پنج شکل رنگی (صورتی، قهوه‌ای، سبز، خاکستری و سیاه) وجود دارند که اغلب در کنار هم‌روی یک سنگ دیده می‌شوند (Calderon *et al*., 2010). علاوه بر این نکته Calderon و همکاران (۲۰۱۰) واگرایی ژنتیکی بین این اشکال را در سه جمعیت در سواحل برزیل را مطالعه کردند. در تجزیه‌وتحلیل ژنوم میتوکندریایی تمایز ژنی بین رنگ صورتی و همه شکل‌های دیگر مشخص بود و تقریباً در تمام مقایسه‌های زوجی بین مورف‌های رنگ، تفاوت‌های معنی‌داری در فراوانی‌های آللی نیز مشاهده شد. در این حال در این مطالعه به نظر می‌رسید درجاتی از جفت‌گیری ترکیبی در مورفو تایپ‌های این‌گونه اتفاق می‌افتد (Calderon *et al*., 2010). مطالعات نشان می‌دهد که اکینوئیدها تقریباً ۳۰۰ میلیون سال پیش ظهور کردند، از رویداد انقراض دسته‌جمعی پرمو–تریاس که شدیدترین بحران تنوع زیستی در تاریخ زمین بوده جان سالم به دربردند و به دنبال آن به‌سرعت متنوع شدند. این یافته‌ها به رفع شکاف در دانش ناشی از کمبود نسبی شواهد فسیلی برای این تنوع اولیه کمک می‌کند Koch و همکاران (۲۰۲۲) بر اساس منابع مولکولی موجود و ۱۸ مجموعه داده ژنومی جدید، بزرگ‌ترین ماتریس مولکولی موجود را برای اکینوئیدها ایجاد کردند. با استفاده از این مجموعه داده، آن‌ها توانستند روابط فیلوژنتیکی و زمان‌های واگرایی و شجره اصلی اکینوئیدهای زنده را بازسازی کنند. آن‌ها این کار را با استفاده از تکنیک «ساعت مولکولی» در مجموعه داده‌های خود انجام دادند که به‌موجب آن سرعت انباشته شدن جهش در ژنوم‌های اکینوئید به زمان در علوم زمین‌شناسی با استفاده از شواهد فسیلی تخمین زده می‌شود و به محققان این امکان را می‌دهد تا تعیین کنند که چه زمانی شجره‌های مختلف برای اولین بار متنوع شدند. تحلیل‌های آن‌ها نشان می‌دهد که اجداد اکینوئیدهای احتمالاً در دوران پرمین اولیه

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-09]

پدیدار شده‌اند و دوره پرمین– تریاس پس از یک رویداد انقراض دسته‌جمعی به‌سرعت متنوع شده‌اند. در مطالعه حاضر نیز رسم شبکه هاپلوتایپی گونه‌های موردمطالعه بیانگر تفرق هاپلوتایپی نمونه موردمطالعه نسبت به هاپلوتایپ‌های دیگر مناطق است (شکل ۴). یکی از علل اصلی وجود تفاوت‌های ژنتیکی در جمعیت‌های جانداران دریایی، توانایی گسترش و پراکندگی آن‌ها است. لذا درصورتی‌که یکی از مراحل زندگی موجودات دریایی حالت پلانکتونی داشته باشد، گسترش آن‌ها ممکن است در فواصل مختلف اتفاق بیفتد. همچنین شرایط هیدرولوژیک مناطق و همچنین توانایی گسترش و پراکندگی آن‌ها بر میزان جریان ژنی تأثیرگذار هستند. مطالعاتی که روی توتیای دریایی *Paracentrotus lividus* که به‌صورت تجاری برداشت‌شده بود، تمایز ژنتیکی رابین اقیانوس اطلس و دریای مدیترانه و بین دریای آدریاتیک و سایر حوضه‌های مدیترانه نشان داد و عدم وجود ساختار ژنتیکی در حوضه‌ها را گزارش کرد. تخمین زده می‌شود که واگرایی بین حوضه‌های اقیانوس اطلس و مدیترانه بین ۲۷۰۰۰۰ تا ۳۷۰۰۰۰ سال پیش آغازشده باشد (Penant *et al.*, 2013). علاوه بر این در تحقیق حاضر، ترسیم درخت تکاملی دارای یک نکته قابل‌توجه بود و آن شناسایی یک هاپلوتایپ جدید از گونه *Echinometra* با اختلاف ژنتیکی بالا است که از دیگر نمونه‌های ثبت‌شده در بانک جهانی ژن متمایز گردید. توالی موردمطالعه از جنس *Echinometra* پس از بلاست کردن در بانک ژن NCBI ۹۶ درصد با توالی مرجع گزارش‌شده توسط Wang و همکاران (۲۰۱۲) از کشور چین همپوشانی داشت. ازاین‌رو می‌توان استنباط کرد که پراکنش این‌گونه می‌تواند تحت تأثیر مهاجرت احتمالی این‌گونه نیز قرار گیرد. در این حال جمع‌آوری نمونه‌های بیشتر از منطقه خلیج‌فارس و دریای عمان و نیز اقیانوس هند به‌منظور تعیین محدوده جغرافیایی حضور این‌گونه ضروری است. شناسایی دقیق گونه‌های بومی با توجه به پراکنش ذخایر ژنتیکی این‌گونه به‌منظور اعمال مدیریت بهینه صید و پایداری طولانی‌مدت ذخایر این‌گونه کمک می‌کند و منجر به حفاظت از اکوسیستم منطقه می‌شود. شایان‌ذکر است که رفتار مهاجرت، یک فاکتور مهم تأثیرگذار بر میزان جریان ژنی و ساختار جمعیتی به‌حساب می‌آید. دراین‌ارتباط می‌توان گفت که یکی از مهم‌ترین عواملی که می‌تواند در تنوع و ساختار ژنتیکی جمعیت گونه‌های مختلف منطقه دخالت داشته باشد، وجود سدهای فیزیکی و یا گیاهی در مناطق موردبررسی می‌باشد. درنهایت، مطالعات بیشتری برای ارزیابی کامل وضعیت جمعیت این جنس از توتیای های دریایی به‌منظور اجرا و اجرای دقیق اقدامات نظارتی برای حفظ ذخایر در معرض خطر انقراض توتیای های دریایی موردنیاز است. علاوه بر این، ضروری است که برای به دست آوردن اطلاعات بیشتر در مورد مورفوتیپ‌های مختلف توتیای های دریایی، تحقیقات مولکولی بیشتری با وضوح بالاتر مانند مارکر های مولکولی ریز ماهواره برای درک تنوع و تکامل توتیای های دریایی در خلیج‌فارس با جزئیات بیشتر اجرا گردد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از حمایت‌های بی‌دریغ دانشگاه آزاد اسلامی واحد قشم و نیز پژوهشکده اکولوژی خلیج‌فارس و دریای عمان در اجرای این تحقیق تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

Adonin, L., Drozdov, A. and Barlev, N. A., 2021. Sea urchin as a universal model for studies of gene networks. Frontiers in genetics, 11: 627259.

Bandelt, H. J., Forster, P. and Röhl, A., 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Molecular Biology and Evolution, 16(1): 37-48.

Calderon Moreno, I., Palacín Cabañas, C. and Turon Barrera, X., 2009. Microsatellite markers reveal shallow genetic differentiation between cohorts of the common sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck) in northwest Mediterranean. Molecular Ecology, 18(14): 3036-3049.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-09]

Calderon, I., Ventura, C. R. R., Turon, X. and Lessios, H. A., 2010. Genetic divergence and assortative mating between colour morphs of the sea urchin *Paracentrotus gaimardi*. Molecular Ecology, 19(3): 484-493.

Davidson, E. H., 2006. The sea urchin genome: where will it lead us? Science, 314:939–40.

Elmasry, E., Razek, F. A. A., El-Sayed, A. F. M., Omar, H. and El Sayed, A. E., 2015. Abundance, size composition and benthic assemblages of two Mediterranean echinoids off the Egyptian coasts: *Paracentrotus lividus* and *Arbacia lixula*. The Egyptian Journal of Aquatic Research, 41(4): 367-374.

Emlet, R. B. and Hoegh-Guldberg, O., 1997. Effect of Egg Size on Post-Larval Performance: Experimental Evidence from a Sea Urchin, Evolution, 51: 141–152.

Edmunds, P. J. and Carpenter, R. C., 2001. Recovery of Diadema antillarum reduces macroalgal cover and increases abundance of juvenile corals on a Caribbean reef. Proceedings of the National Academy of Sciences, 98: 5067–71.

Froese, R. and Pauly, D., 2023. FishBase World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org.

Harley, C. D., Randall Hughes, A., Hultgren, K. M., Miner, B. G., Sorte, C. J., Thornber, C. S., Rodriguez, L. F., Tomanek, L. and Williams, S. L., 2006. The impacts of climate change in coastal marine systems. Ecology letters, 9(2): 228-241.

Kalantarian, S. M., Archangi, B., Valinassab, T., Rajabi-Maham, H. and Abdi, R., 2022. A phylogenetic study of a tropical sea urchin, Echinometra sp. EZ (Echinoidea: Camarodonta: *Echinometridae*) from the Persian Gulf. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 102(3-4): 244-251.

Ketchum, R. N., Davidson, P. L., Smith, E. G., Wray, G. A., Burt, J. A., Ryan, J. F. and Reitzel, A. M., 2022. A chromosome-level genome assembly of the highly heterozygous sea urchin Echinometra sp. EZ reveals adaptation in the regulatory regions of stress response genes. Genome Biology and Evolution, 14(10): 144.

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

Koch, N. M., Thompson, J. R., Hiley, A. S., McCowin, M. F., Armstrong, A. F., Coppard, S. E., Aguilera, F., Bronstein, O., Kroh, A., Mooi, R. and Rouse, G. W., 2022. Phylogenomic analyses of echinoid diversification prompt a re-evaluation of their fossil record. Elife, 11: 72460.

Kroh, A., 2020. Phylogeny and classification of echinoids. In: Lawrence J, editors. Sea Urchins: Biology and Ecology. Cambridge: Academic Press. pp. 1–17.

Marletaz, F., Couloux, A., Poulain, J., Labadie, K., Da Silva, C., Mangenot, S., Noel, B., Poustka, A. J., Dru, P., Pegueroles, C. and Borra, M., 2023. Analysis of the P. lividus sea urchin genome highlights contrasting trends of genomic and regulatory evolution in deuterostomes. Cell Genomics, 5: 3(4).

McClanahan, T. R. and Muthiga, N. A., 2007. Ecology of Echinometra. In Developments in Aquaculture and Fisheries Science, 37: 297-317.

Penant, G., Aurelle, D., Feral, J. P. and Chenuil, A., 2013. Planktonic larvae do not ensure gene flow in the edible sea urchin Paracentrotus lividus. Marine Ecology progress series, 480: 155-170.

Pespeni, M. H., Barney, B. T. and Palumbi, S. R., 2013. Differences in the regulation of growth and biomineralization genes revealed through long- term common- garden acclimation and experimental genomics in the purple sea urchin. Evolution, 67(7): 1901-1914.

Paul, R. C. and Smith, A. B., 1984. The early radiation and phylogeny of echinoderms. Biological reviews 59:443–81.

Palumbi, S. R., Martin, A. P., Romano, S. L., McMillan, W. O., Stice, L. and Grabowski, G., 1991. The Simple Fool's Guide to PCR. Department of Zoology, University of Hawaii, Honolulu.

Reich, A., Dunn, C., Akasaka, K., Wessel, G., 2015. Phylogenomic analyses of Echinodermata support the sister groups of Asterozoa and Echinozoa. PLoS One.10:e 0119627.

Rozas, J., Sanchez-DelBarrio, J. C., Messeguer, X., Rozas, R., 2003. "DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods." Bioinformatics, 19(18): 2496-2497.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-09]

Takeuchi, T., Masaoka, T., Aoki, H., Koyanagi, R., Fujie, M. and Satoh, N., 2020. Divergent northern and southern populations and demographic history of the pearl oyster in the western Pacific revealed with genomic SNPs. Evolutionary Applications, 13(4): 837-853.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S., 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular biology and evolution, 30(12): 2725-2729.

Thompson, J. R., Erkenbrack, E. M., Hinman, V. F., McCauley, B. S., Petsios, E., Bottjer, D. J., 2017. Paleogenomics of echinoids reveals an ancient origin for the double-negative specification of micromeres in sea urchins. Proceedings of the National Academy of Sciences, 114: 5870–7.

Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J., 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research, 22: 4673-4680.

Wang, H., Kesinger, J. W., Zhou, Q., Matrin, G. and Turner, S., 2008. Identification and characterization of zebra fish ocular formation genes. Genome, 51(3): 222-235.

Wang, C., Xue, C., Xue, Y., Li, Z., Lv, Y. and Zhang, H., 2012. Quality changes in sea urchin (Strongylocentrotus nudus) during storage in artificial seawater saturated with oxygen, nitrogen and air. Journal of the Science of Food and Agriculture, 92(1): 191-196.

Xiao, N. and Sha, Z., 2022. Complete mitochondrial genomes of four deep-sea echinoids: conserved mitogenome organization and new insights into the phylogeny and evolution of Echinoidea. Peer J, 10: 13730.

Yaguchi, S. and Yaguchi, J., 2022. Temnopleurus reevesii as a new sea urchin model in genetics. Development, growth & differentiation, 64(1): 59-66.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-09]