بررسی ساختار جمعیتی خیار دریایی گونه *Holothuria leucospilota* در سواحل شمالی خلیج فارس و دریای عمان با استفاده از روش توالی‌یابی DNA

رقیه صفری*[1]، سید احمد قاسمی[2]، سهراب رضوانی گیل‌کلایی[3]، هادی غفاری[3]

[1]گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

[2]گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده خلیج فارس، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران، بوشهر، ایران.

[3]موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول: fisheriessafari@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۲/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۸/۳/۱۰

چکیده

خیار دریایی یکی از گونه‌های مهم اکولوژیکی و اقتصادی در خلیج فارس و دریای عمان می‌باشد. به جهت بررسی تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیتی خیار دریایی گونه *Holothuria leucospilota* در سواحل شمالی خلیج فارس و دریای عمان از روش توالی‌یابی استفاده گردید. بدین منظور ۵۸ نمونه از مناطق بوشهر، بندرعباس و چابهار صید، DNA از بافت ماهیچه با استفاده از روش استات آمونیوم استخراج، واکنش زنجیره ای پلی‌مراز با استفاده از ژن SrRNA ۱۶ و توالی‌یابی نمونه‌ها انجام شد. میانگین تنوع هاپلوتایپی بالا (۰/۷۸) در منطقه چابهار ۰/۸۱، بندرعباس ۰/۸و بوشهر ۰/۷۴ مشاهده شد. کمترین میزان تمایز ژنتیکی (F_{st}) بین جمعیت‌های بندر عباس و بوشهر در حالی که بیشترین میزان تمایز ژنتیکی بین نمونه‌های بوشهر و چابهار برآورد گردید. بیشترین فاصله ژنتیکی بین نمونه‌های بوشهر و چابهار (۰/۰۸) و کمترین فاصله ژنتیکی میان نمونه‌های بندرعباس و بوشهر (۰/۰۳) مشاهده شد. نتایج نشان دهنده وجود جمعیت‌های مختلف خیار دریایی در سواحل شمالی خلیج فارس و دریای عمان است که در مدیریت ذخایر این گونه اقتصادی باید مدنظر قرار گیرد.

واژگان کلیدی: خیار دریایی، ساختار ژنتیکی، تنوع، دریای عمان، خلیج فارس.

مقدمه

خیار دریایی در شاخه خارپوستان (Echinoderm) و رده هولووترین‌ها (Holothuriodae) جای دارد و در طی دوران تکاملی، ۵۴۰ میلیون سال پیش در اقیانوس‌ها ظاهر شده است. تاکنون ۱۴۰۰ گونه خیار دریایی در آب‌های سراسر جهان شناسایی شده‌اند (Conand and Mangion, 2002). این جانوران از اجزای مهم زنجیره غذایی در اکوسیستم‌های ناحیه معتدله و آب‌سنگ‌های مرجانی بوده و نقش مهمی به‌عنوان پوده‌خوار و یا معلق‌خوار ایفا می‌کنند. آن‌ها مسئول به‌هم زدن و مخلوط کردن رسوبات بوده و ضمن تسریع بازچرخه مواد، باعث نفوذ اکسیژن در رسوبات می‌گردند. تخم، لارو و نوزاد آن‌ها نیز منبع غذایی مناسبی برای سایر جانوران دریایی به‌شمار می‌رود (Bruckner *et al*., 2003). این جانوران به گونه‌ای عمده بین آب‌سنگ‌های مرجانی زندگی کرده، اما در بسترهای شنی و گلی نیز یافت می‌شوند. عمق زندگی آن‌ها متفاوت است. بیشتر گونه‌ها در مناطق کم عمق زندگی می‌کنند، اما تعداد کمی نیز در اعماق اقیانوس‌ها به سر می‌برند. خصوصیت بستر، شدت نور، سطح انرژی، غذای در دسترس، نوسانات شوری و حضور شکارچی یا بالغین همنوع از عوامل عمده و متغیرهایی هستند که پراکنش خیارهای دریایی را تحت تاثیر قرار می‌دهند.

در سال‌های اخیر اثرات ضد باکتریایی، ضدالتهابی، ضدسرطانی و آنتی‌اکسیدانتی خیارهای دریایی در بسیاری از مطالعات به اثبات رسیده است (Sugawara *et al*., 2006; Farouk *et al*., 2007). در نتیجه شناسایی کاربردهای پزشکی و تغذیه‌ای، توجه به این دسته از آبزیان افزایش یافته و به‌تدریج از اهمیت تجاری ویژه‌ای برخوردار شدند. با وجود اهمیت تجاری، بیولوژی، اکولوژی و دینامیک خیار دریایی جمعیت آن‌ها هنوز به‌خوبی شناخته نشده است. داده‌های موجود روی نرخ رشد، اکولوژی

لاروی، پروسه بازگشت شیلاتی، استفاده زیستگاهی، نقش اکولوژیکی، بیشینه برداشت مجاز، کمینه اندازه ذخایر و حد آستانه برای موفقیت تولید مثل فقط برای چند گونه در دسترس است (سالاروند، ۱۳۹۳). در ایران نیز با توجه به گزارش‌های فراوان مبنی بر وجود جنس و گونه‌های مختلف خیار دریایی در سواحل ایرانی خلیج‌فارس و دریای عمان و حتی وجود یک مرکز پرورش خیار دریایی تحت عنوان مرکز پرورش نرم‌تنان در بندر لنگه، اکثر مطالعات صورت گرفته در این موجود محدود به شناسایی گونه‌ها در مناطق مختلف و تحقیقات انگشت‌شماری در رابطه با بیولوژی و فیزیولوژی بوده (توسل‌پور، ۱۳۸۷؛ شکوری، ۱۳۸۸؛ دانشمند و همکاران، ۱۳۸۹؛ احسان‌پور، ۱۳۹۲) و در رابطه با ساختار جمعیتی فقط بر روی گونه *Holothuria parva* با دو روش ژنتیکی توالی‌یابی 16S و RAPD آن هم در نمونه‌های دو منطقه بندر بستانه و بندر دیر مطالعه صورت گرفته است (عالمی نیسی، ۱۳۹۲؛ سالاروند، ۱۳۹۳).

بررسی ساختار ژنتیکی آبزیان اهمیت ویژه‌ای در مدیریت برداشت ذخایر و بازسازی گونه‌های در خطر انقراض دارد. در دسترس نبودن داده‌های ساختار ژنتیکی جمعیت‌های آبزیان می‌تواند در درازمدت، پیامدهای نامطلوبی به‌ویژه روی جمعیت‌های مورد بهره‌برداری به‌دنبال داشته باشد. بدین منظور زیست‌شناسان و بوم‌شناسان، نیازمند بررسی تنوع و ساختار ژنتیکی آبزیان در هر کشور هستند (پورکاظمی، ۱۹۹۶). بررسی ساختار جمعیتی در آبزیان توسط روش‌های مختلفی انجام گیرد. یکی از روش‌ها بکار-گیری صفات مورفومتریک و مریستیک می‌باشد؛ اما با توجه به حساسیت صفات مورفومتریک و مریستیک به تغییرات محیطی، استفاده از نشانگرهای مولکولی که متاثر از فاکتورهای محیطی نمی‌باشند، جهت شناسائی ساختار ژنتیکی ذخایر بیش از پیش مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است (Tan *et al.*, 2015). در حال حاضر جهت مطالعه تنوع ژنتیکی گونه‌ها، نشانگرهای DNA با اعتمادترین ابزار می‌باشند. توارث مادری و سرعت بالای جایگزینی نوکلئوتیدها در mt-DNA نسبت به ژنوم هسته‌ای (McKeown *et al.*, 2015) و اندازه نسبتاً کوچک، توارث همبارز، پلی‌مورفیسم بالا و توارث مندلی نشانگرهای ریزماهواره (Ren *et al.*, 2015) موجب استفاده وسیع این نشانگرها در مطالعات ژنتیک جمعیت شده است.

گونه *H. leucospilota* یکی از گونه‌های مهم شناخته شده در خلیج فارس و دریای عمان است و Toral-Granda (۲۰۰۷) این گونه را در لیست ۴۹ گونه مهم اقتصادی جهان لحاظ کردند که به‌علت سودآوری برای جوامع ساحلی در معرض برداشت بی‌رویه قرار گرفته است. علی‌رغم اهمیت اقتصادی این گونه اطلاعاتی در رابطه با ساختار جمعیتی این گونه در سواحل ایرانی وجود ندارد. بنابراین مطالعه حاضر با هدف تعیین جمعیت‌های احتمالی و شناسایی تنوع ژنتیکی خیار دریایی گونه *H. leucospilota* در سواحل ایرانی دریای عمان و خلیج فارس به اجرا درآمد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری: پس از بررسی‌های مقدماتی و شناسایی دقیق منطقه، مناسب‌ترین ایستگاه‌ها انتخاب شد و ۵۸ نمونه به‌صورت دستی از بوشهر، بندرعباس و چابهار جمع‌آوری شد (جدول ۱). شناسایی نمونه‌ها در پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان انجام شد. نمونه‌های هر منطقه در الکل اتانول ۹۶ درصد تثبیت و برای بررسی به آزمایشگاه منتقل شدند.

استخراج DNA و ارزیابی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده: حدود ۵۰ میلی‌گرم از بافت ماهیچه خیار دریایی جدا شد و به تیوپ ۱/۵ میلی‌لیتر انتقال داده شد و DNA نمونه‌ها با استفاده از روش استات آمونیوم استخراج گردید. کمیت DNA استخراج شده با استفاده از روش اسپکتروفتومتری و کیفیت با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد تعیین شد.

طراحی آغازگر مورد استفاده: طراحی آغازگر ژن مورد نظر با طول ۴۵۵ جفت باز با نرم‌افزار پرایمر ۳ انجام شد، آغازگر به‌دست آمده با نرم افزار الیگو ۷ مورد بررسی قرار گرفت، هم‌چنین اختصاصی بودن آغازگر، با استفاده از برنامه پرایمر بلاست (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/

جدول ۱- مختصات و مشخصات نمونه‌های جمع‌آوری شده.

ردیف	مکان نمونه برداری	طول و عرض جغرافیایی	میانگین طول سانتیمتر	میانگین وزن گرم
۱	بوشهر	۲۸/۹۳N ۵۰/۷۹ E	۱۶/۸	۹۷
۲	بندر عباس	۲۶N ۵۵ E	۱۶	۹۵
۳	چابهار	۲۵/۲۶N ۶۰/۶۵ E	۱۸,۱	۱۲۴

جدول ۲- آغازگر استفاده شده در مطالعه جمعیت‌های خیار دریایی *Holothuria leucospilota* مورد بررسی.

نام آغازگر	توالی آغازگر
16sar(F)	5-GGT ATC TTG ACC GTG CAA AG-3
16sbr(R)	5-CTC CGG TTT GAA CTC AGA TC-3

primer-blast) کنترل گردید (جدول ۲). سنتز پرایمرها توسط شرکت Shine Gene چین صورت گرفت.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و الکتروفورز محصول الکتروفورز محصول PCR با استفاده از ژل آگارز: واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به‌منظور تکثیر قطعه‌ای مورد نظر ژن 16S rRNA میتوکندریایی با استفاده از ۱ میکرولیتر DNA الگو (۱۰۰ نانوگرم)، ۰/۵ میکرولیتر از هر آغازگر اختصاصی پیشرو و پسرو با غلظت ۱۰ پیکومول، ۲ میکرولیتر بافر PCR (۱۰X)، ۰/۱ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase (۵u)، ۲/۵ میکرولیتر $Mgcl_2$ با غلظت (۵۰ mM) و ۰/۲ میکرولیتر dNTP با غلظت (۱۰mM) تا رسیدن به حجم ۱۰ میکرولیتر تحت شرایط دمایی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲ دقیقه، ۳۵ سیکل شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، ۴۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه و در ادامه ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه، به‌منظور دناتوره شدن، اتصال آغازگر و بسط انجام شد. پس از پایان واکنش تکثیر، مقدار ۵ میکرولیتر از نمونه برروی ژل آگاروز ۱ درصد برده شد تا کیفیت قطعات ژنی پس از تکثیر مورد ارزیابی قرار گیرد. باند مورد انتظار پس از تکثیر bp ۴۵۵ بود که پس از الکتروفورز صحت آن تایید شد.

تعیین توالی نمونه‌ها: تعداد ۵۸ نمونه از محصولات PCR به حجم ۴۰ میکرولیتر به شرکت توپاز ژن جهت سکانس فرستاده شد و خوانش از دو سر توالی توسط دستگاه (ABI 3130 Genetic Analyser, Applied Biosystem) انجام شد.

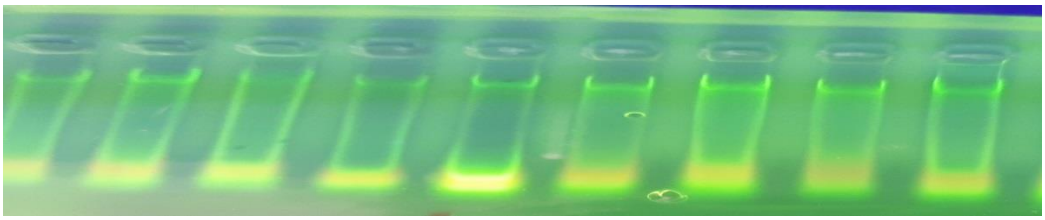
آنالیز داده‌ها: پس از دریافت توالی‌ها، بررسی صحت و ویرایش دستی توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار Chromas2 و BioEdite انجام گرفت. سپس توالی‌ها برای اطمینان از صحت تکثیر ژن مورد نظر در پایگاه ژنی NCBI BLAST شدند. پس از آن همترازی توالی‌های به‌دست آمده توسط برنامه Clustal W در نرم‌افزار BioEdite انجام شد. سایر شاخص‌های ژنتیکی مانند تنوع هاپلوتایپی و نوکلئوتیدی، تمایز دو فاصله ژنتیکی با ستفاده از نرم‌افزار Dnasp.5 و Arliquein3.5 محاسبه شدند.

نتایج

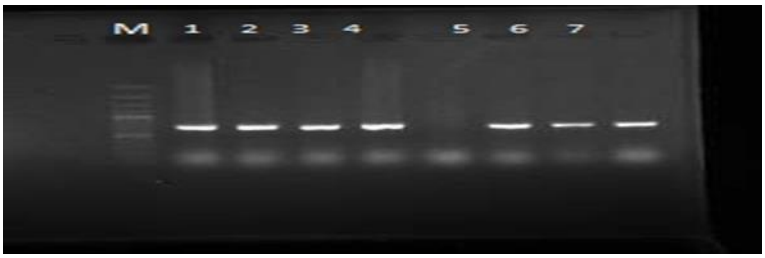
ارزیابی کمیت DNA استخراج شده با استفاده از روش اسپکتروفوتومتری: از لحاظ کمی DNA استخراج‌شده مورد ارزیابی قرار گرفت اعداد به‌دست آمده از سنجش DNA در جذب نوری ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر محدوده ۱/۸ تا ۲/۲ قرار داشتند که بیان‌کننده غلظت مناسب DNA جهت مطالعات مولکولی است.

ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از روش الکتروفورز ژل آگارز: کیفیت استخراج DNA با استفاده از الگوی حرکتی آن روی ژل آگارز ۱/۵ درصد بررسی شد و نتایج بررسی نشان داد، DNA استخراج شده با این روش نسبتاً مناسب است (شکل ۱).

تکثیر قطعه مورد نظر به‌روش واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز (PCR): تکثیر قطعه‌ی نوکلئوتیدی مورد نظر از ژن 16S rRNA میتوکندریایی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با پرایمرهای اختصاصی مذکور، باندی با اندازه



شکل ۱ - آنالیز کیفی استخراج ژنومی خیار دریایی *Holothuria leucospilota* بر روی ژل آگاروز ۱٪.



شکل ۲ - محصول PCR برای ژن sRNA۱۶ خیار دریایی *Holothuria leucospilota* بر روی ژل آگاروز ۱٪.

جدول ۳- اطلاعات ژنتیکی نمونه‌های خیار دریایی *Holothuria leucospilota* در مناطق مورد بررسی.

	نمونه ها	بوشهر	بندرعباس	چابهار
تعداد جایگاه های نوکلئوتیدی	۴۲۱	۴۲۱	۴۲۱	۴۲۱
تعداد جایگاه های نامتغیر	۴۱۵	۴۱۶	۴۱۵	۴۱۵
تعداد جایگاه های چندریخت	۶	۵	۶	۶
تعداد هاپلوتایپ	۶	۴	۵	۵
تنوع نوکلئوتیدی Pi	۰/۰۰۴	۰/۰۰۳	۰/۰۰۴	۰/۰۰۴
تنوع هاپلوتایپی	۰/۷۸	۰/۷۴	۰/۸۰	۰/۸۱
تنوع ژنتیکی	۰/۸	۰/۷۳۳	۰/۷۹	۰/۸۵

۴۵۵bp نشان داد (شکل ۲).

تعیین توالی ناحیه تکثیر شده: نتایج تعین توالی با بکارگیری آغازگرهای 16s rRNA در بسته نرم-افزاری BioEdit ویرایش گردید. در مجموع ۵۸ توالی خوانا به‌دست آمد. نتایج حاصل از توالی‌یابی نشان داد که ناحیه تکثیر شده پس از ویرایش توالی‌ها دارای ۴۲۱ جفت باز است. سپس توالی‌های به‌دست آمده توسط برنامه بر هم نهی‌های موضعی (BLAST) در سایت NCBI مورد ارزیابی قرار گرفتند. پس از BLAST کردن نمونه‌ها، مشخص شد ناحیه تکثیر شده با ناحیه 16s rRNA مطابقت دارد. توالی مذکور دارای ۹۹ درصد همپوشانی و همسانی با گونه خیار دریایی *H. leucospilota* بود.

تنوع ژنتیکی: در مطالعه حاضر میانگین تعداد هاپلوتیپ‌ها، تنوع هاپلوتیپی و ژنتیکی به ترتیب ۶، ۰/۷۸ و ۰/۸ به‌دست آمد (جدول ۳).

آنالیز ساختار جمعیتی: نتایج آنالیز AMOVA نشان داد که کمترین میزان تمایز ژنتیکی (F_{st}) بین جمعیت‌های بندرعباس و بوشهر در حالی که بیشترین میزان تمایز ژنتیکی بین نمونه‌های بوشهر و چابهار برآورد گردید. براساس شاخص اختلاف ژنتیکی جمعیت بوشهر و بندرعباس در سطح ۵ درصد معنی-دار، جمعیت بوشهر با چابهار در سطح معنی‌داری ۱ درصد و جمعیت بندرعباس و بوشهر اختلاف معنی-داری با هم نشان نداد (جدول‌های ۴ و ۵).

محاسبه میزان مهاجرت (Nm) جمعیت‌های خیار دریایی *Holothuria leucospilota* مورد بررسی: محاسبه میزان مهاجرت (Nm) بین جمعیت‌ها نشان داد که بیشترین میزان مهاجرت بین نمونه‌های بوشهر و بندرعباس (۲/۳۵) است (جدول ۶) .

فاصله ژنتیکی جمعیت‌های خیار دریایی *Holothuria leucospilota* مورد بررسی: ماتریس فاصله ژنتیکی بین مناطق بررسی شده نشان دهنده این است که بیشترین فاصله ژنتیکی بین نمونه‌های بوشهر و چابهار (۰/۰۸) و کمترین فاصله

جدول ۴ - تفاوت ژنتیکی بین جمعیت‌های خیار دریایی *Holothuria leucospilota* مورد بررسی.

اختلاف واریانس	df	SS	Est. Var.	درصد
بین گروهها	۱	۱/۶۷	۰/۹۷	۶/۴۱
بین جمعیت های درون گروهها	۱	۰/۳۲	۰/۰۳۴	۷/۵۸
بین افراد درون جمعیت ها	۵۷	۱۳/۶۲	۱۳/۸۸	۸۶/۱
کل	۵۷	۱۵/۱۳۲	۱۷/۱۲	۱۰۰

جدول ۵ - میزان Fst بین جمعیت‌های خیار دریایی *Holothuria leucospilota* مورد بررسی.

	بوشهر	بندرعباس	چابهار
بوشهر	-	ns	۰/۰۱
بندرعباس	۰/۰۹۶	-	۰/۰۵
چابهار	۰/۱۵۱	۰/۱۳۲	

جدول ۶ - میزان Nm بین جمعیت‌های خیار دریایی *Holothuria leucospilota* مورد بررسی.

	بوشهر	بندر عباس
بوشهر	-	
بندرعباس	۲/۳۵	
چابهار	۱/۳۱	۱/۶۷

ژنتیکی میان نمونه‌های بندرعباس و بوشهر (۰/۰۳) بود.

بحث

ارزش تغذیه‌ای، ترکیبات زیست فعال موجود در خیارهای دریایی موجب توجه به این جاندار در زمینه‌های بهداشتی و پزشکی و افزایش برداشت از ذخایر آن‌ها در سال‌های اخیر شده است (Lambert, 1997; Kim *et al*., 2008). کشور ما نیز از این قائده مستثنی نبوده، اما آماری در رابطه با میزان و سطح برداشت از این ذخایر ارزشمند به‌ویژه در سواحل ایرانی خلیج فارس و دریای عمان وجود ندارد. بررسی‌ها نشان داده‌اند که خیارهای دریایی نسبت به برداشت بیش از حد آسیب‌پذیر هستند (Lovatelli *et al*., 2004; Toral-Granda *et al*., 2008). حتی برداشت با شدت کم نیز به جهت کاهش تراکم افراد بالغ به کاهش شدید در نسبت تولید لارو و کاهش اندازه ذخیره می‌انجامد که در فراوانی آلل‌ها و تنوع ژنتیکی اثرگذار است (Uthicke and Bebzie, 2003). اطلاعات زیادی در رابطه با کارکرد بوم شناختی خیارهای دریایی و پیامدهای حذف آن‌ها از اکوسیستم در دسترس نمی‌باشد، ولی گزارش‌هایی در مورد کاهش میزان تولید جمعیت‌های ریزجلبک‌ها و بسترهای علف‌های دریایی در مناطق معتدله وجود دارد (Uthicke and Klumpp, 1998). در زیستگاه‌های معتدله و هم در زیستگاه‌های گرمسیری، آشفتگی زیستی و کاربرد مجدد رسوبات از عملکردهای مهم اکولوژیکی خیارهای دریایی است (Conand and Mangion, 2002).

پیش از این رده‌بندی خیارهای دریایی بر پایه ریخت‌شناسی بود که روش دقیقی نبوده و همواره با ابهام و اشکال همراه بوده است، اما عقیده بر آن است که مطالعات مولکولی می‌تواند در موارد بسیاری به نتایجی برسد که با رده‌بندی کنونی همخوانی ندارد و پیشینه تکاملی که از این روش به‌دست می‌آید گاهی با فرضیات قبلی مطابقت ندارد (Keer *et al*., 2005).

در بررسی حاضر، میزان تنوع هاپلوتایپی بالا و تنوع نوکلئوتیدی پایینی در بین نمونه‌ها مشاهده شد. میانگین تنوع هاپلوتایپی ۰/۷۸ بود که در منطقه چابهار ۰/۸۱، بندرعباس ۰/۸و بوشهر ۰/۷۴ مشاهده شد. که با توجه به این‌که این میزان بین صفر و یک (همه افراد از یک هاپلوتایپ یا هر فرد یک هاپلوتایپ متفاوت) متغیر است، مقدار نسبتاً مناسبی در مناطق مورد بررسی برآورد شده است. وجود هاپلوتایپ مشترک بین مناطق نشان دهنده نیای مشترک مناطق می‌باشد که در خیارهای دریایی ساکن در سواحل دریا شایع است (عالمی نیسی، ۱۳۹۲؛Uthicke and Benzie, 2003). بالا بودن تنوع هاپلوتایپی در مطالعات Vargara Chen و همکاران (۲۰۱۰) در گونه *H. polii* و در مطالعه عالمی نیسی (۱۳۹۲) در گونه *H. parva* با به‌کارگیری ژن 16s rRNA و مطالعه سالاروند (۱۳۹۳) در گونه *H. parva* با استفاده از روش PCR-RFLP مشاهده شده است. مقادیر تنوع نوکلئوتیدی به‌دست

آمده در بررسی کنونی قابل مقایسه با بررسی‌های سایر پژوهشگران روی دیگر خارتنان است (Dura´n *et al*., 2004; Iuri *et al*., 2007; Caldero´n *et al*., 2008). ویژگی‌های محل نمونه‌برداری، بستر، شوری، دما، شدت امواج، آلودگی‌های احتمالی از عوامل مهم بر تنوع می‌باشد (Hu *et al*., 2010).

در خیارهای دریایی نرخ جهش در ژن 16S rRNA (۰/۵ درصد) متفاوت از ژن سیتوکروم اکسیداز (COI) (۳/۵ -۱/۶ درصد) تائید شده است و نتایج کمی متفاوت به‌دست آمده از بررسی‌های این دو ژن را به این امر نسبت داده‌اند (Vargara Chen *et al*., 2010). ولی به‌طور کلی 16s rRNA توانسته است تمایز بیشتری را نسبت به COI در جمعیت‌های مشابه به نمایش در آورد (Caldero´n *et al*., 2008; Dura´n *et al*., 2004).

نتایج این بررسی نشان دهنده تمایز ژنتیکی (با استفاده از شاخص F_{st}) بین نمونه‌های *H. leucospilota* بوشهر و چابهار و نمونه‌های چابهار و بندرعباس معنی‌دار بود و بین نمونه‌های بندرعباس و بوشهر اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. براساس نتایج می‌توان بیان نمود که احتمالاً به دلیل نامحدود بودن بوم‌سازگان‌های دریایی و فاصله جغرافیایی اندک بین دو منطقه نمونه‌برداری در بندرعباس و بوشهر سبب پدید آمدن چنین ساختار ژنتیکی شده است. تمایز ژنتیکی (F_{st}) معنی‌دار می‌تواند در نتیجه محدودیت در جریان ژنی باشد که بیشتر مربوط به تفاوت در زیستگاه‌ها (زیستگاه‌های لاگونی در برابر ساحلی) و وجود موانع ریزجغرافیایی می‌باشد (Uthicke and Benzie, 2003). در مطالعه‌ای که توسط توسل‌پور و همکاران (۱۳۸۷) بر گونه خیار دریایی *H. atra* در بستانه و نایبند صورت گرفت، میزان Gst و جریان ژنی (Nm) به‌ترتیب برابر با ۰/۱۶ و ۲/۴۵ بود که حاکی از تمایز ژنتیکی بالا و جریان ژنی نسبتاً پایین می‌باشد و علل آن را بسترزی بودن خیار دریایی با قدرت جا به جایی بسیار پایین، مرحله لاروی پلانکتونیک نه چندان طولانی، نیمه بسته بودن خلیج نایبند و فاصله جغرافیایی نسبتا زیاد بین دو منطقه بیان شد. عالمی‌نیسی (۱۳۹۲) بر روی گونه خیار دریایی *H. parva* در مناطق بستانه و دیر (از نظر ژن 16srRNA) به روش توالی‌یابی، جریان ژنی بالایی مشاهده نمود و بیان داشت که میزان تمایز ژنتیکی در این مناطق پایین می‌باشد که علل آن را نامحدود بودن بوم سازگان‌های دریایی و فاصله جغرافیایی اندک بین دو منطقه بستانه و دیر بیان نمود. در پژوهش سالاروند (۱۳۹۳) میزان Fst بالا بین دو منطقه لنگه و بوشهر در گونه خیار دریایی *H. parva* مشاهده گردید که دلایل آن را می‌توان متفاوت بودن مناطق نمونه‌برداری و فاصله جغرافیایی بیشتر بین مناطق مذکور دانست. احتمال می‌رود تمایز ژنتیکی (F_{st}) پایین دیده شده در اثر جریان ژنی بالا باشد که می‌تواند موجب کاهش و جلوگیری از افت درون‌آمیزی شود و همچنین از میزان رانش ژنتیکی در اثر نیروهای محیطی متغیر ساحلی که زیستگاه خیارهای بررسی شده است، بکاهد. بنابراین قابل قبول است اگر بیان شود که جریان ژنی سبب افزایش تنوع ژنتیکی می‌شود و پتانسیل سازشی موجود را در برابر شرایط متغیر محیطی افزایش می دهد (Garant *et al*., 2007). عوامل مختلف زیستی و محیطی بر روی ساختار ژنتیکی جانداران دریایی تاثیرگذار هستند. نیروهای گزینشی مانند دما، شوری، جریانات آبی و نوع چرخه زندگی و عوامل محدود کننده جریان ژنی از جمله این عوامل هستند (Andrade and Solferini, 2007). 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 باشند (Garoia *et al*., 2004; Stamatis *et al*., 2004). خیارهای دریایی دارای لاروهای پلاژیک هستند که در یک دوره ۱۳ تا ۲۶ روزه است (Ivy and Giraspy, 2006)، بنابراین احتمالاً آن‌ها ارتباط ژنتیکی بالایی دارند که بررسی کنونی نیز تائید کننده این مطلب است. هم چنین وان در این مورد نقش گزینش طبیعی را نادیده گرفت. گزینش طبیعی به تنهایی می‌تواند روی ژنوم میتوکندریایی تاثیرگذار باشد. نیروهای گزینشی می‌تواند روی نشانگرهای ژنتیکی موثر باشند و سبب بروز هاپلوتایپ‌های اختصاصی شوند. از آن‌جایی که میتوکندری مسئول درصد بالایی از متابولیسم انرژی است، تغییر در توالی‌های

DNA میتوکندری می‌تواند اثر زیادی روی سازگاری و شایستگی جاندار داشته باشد (Ballard and Whitlock, 2004).

براساس نتایج مشخص شد که ژن 16s rRNA نشانگر مناسبی برای شناسایی گونه مورد نظر در خلیج فارس و دریای عمان می‌باشد. خیار دریایی *H. leucospilota* دارای تنوع ژنتیکی مناسبی می‌باشد و جمعیت‌های مختلف خیار دریایی در سواحل شمالی خلیج فارس و دریای عمان وجود دارد که باید در مدیریت ذخایر این گونه مهم اقتصادی و اکولوژیکی مد نظر قرار گیرد.

منابع

احسان‌پور ز. ۱۳۹۲. ژنومیکس خیار دریایی *Holothuria parva* جهت بررسی پتانسیل ضدسرطانی ترکیبات استحصالی. پایان نامه کارشناسی ارشد زیست شناسی دریا، دانشگاه علوم وفنون دریایی خرمشهر، ۱۰۰ صفحه.

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

دانشمند ع.، نبوی م.، اقتصادی پ.، سینایی م.، درویش ب.ک.، امینی‌راد ا.، شکاری م. حق‌پرست س. ۱۳۸۹. بررسی تنوع گونه‌ای خیارهای دریایی (Holothuroidea) شرق خلیج چابهار دریای عمان. علوم آبزیان، ۱(۱):۲۳-۳۳.

سالاروند س. ۱۳۹۳. بررسی تنوع ژنتیکی خیار دریایی *Holothuria parva* در خلیج فارس با استفاده از روش PCR-RFLP. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر. ۱۰۰ صفحه.

شکوری آ. ۱۳۸۸. بررسی ساختارهای ناهمگن اجتماعات خیارهای دریایی در خلیج چابهار با استفاده از مدل اکولوژیکی. رساله دوره دکتری زیست شناسی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، ۱۶۴ صفحه.

عالمی‌نیسی ل. ۱۳۹۲. بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت خیار دریایی *Holothuria parva* با استفاده از توالی یابی ژن ریبوزومال میتوکندری (16srRNA) در خلیج فارس. پایان نامه دوره کارشناسی ارشد زیست شناسی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر واحد پردیس، ۵۹ صفحه.

قره‌یاضی ب. ۱۳۷۵. کاربرد نشانگرهای DNA در اصلاح نباتات چهارمین کنگره علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران.۴-۷ شهریور. دانشگاه صنعتی اصفهان.

Andrade S.C.S., Solferini V.N. 2007. Fine-scale genetic structure overrides macro-scale structure in a marine snail: nonrandom recruitment, demographic events or selection? *Biological Journal of the Linnean* Society 91, 23-36.

Asha Muthiah P. 2002. Spawning and larval rearing of sea cucumber *Holothuria spinifera* Theel. *SPC. Be^che-de-mer Information Bulletin* 16, 11-15

Ball A.O., Chapman R.W. 2003. Population genetic analysis of white shrimp, Litopenaeus setiferus, using microsatellite genetic markers. *Molecular Ecology* 12: 2319–2330

Ballard J.W.O., Whitlock, M.C. 2004. The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology* 1, 729-744

Bruckner A.W., Johnson K.A., Field J.D. 2003. Conservation strategies for sea cucumbers: Can a CITES Appendix II listing promote sustainable international trade. *SPC Bêche-de-mer information Bulletin* 18, 24-33.

Caldero´n I., Giribet G., Turon X. 2008. Two markers and one history: phylogeography of the edible common sea urchin *Paracentrotus lividus* in the Lusitanian region. *Marin Biology* 154, 137-151

Conand C., Mangion P. 2002. Holothurians from La Re´union fringing reefs: diversity, distribution, abundance and population structure. *SPC. Be^che-de-mer Information Bulletin* 17, 27–33.

Dura´n S., Palacin C., Becerro M.A., Turon, X. and Giribet, G. 2004. Genetic diversity and population structure of the commercially harvested sea urchin *Paracentrotus lividus* (Echinodermata, Echinoidea). *Molecular Ecology* 13, 3317-3328

Farouk A.E.A., Abd F., Ghouse H., Ridzwan B.H. 2007. Bacterial species isolated from Malaysian sea cucumber with optimized secreted antibacterial activity. *American Journal Biochemistry and Biotechnology* 3(2), 60-65.

Garoia F., Guarniero I., Ramsak A., Ungaro N., Landi M., Piccinetti C., Mannini P., 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, 166-174

Hsieh C.H., Chang W.T., Chang H.C., Hsieh H.SH., Chung Y.L., Hwang D.F. 2010. Puffer fish-based commercial fraud

Shangguan J.B., Li, Z.B., Ning Y.F., Haung Y.S., Yaun Y., Lu J., Li B.B., Mao X.Q. 2014. Screening and characterization of novel polymorphic microsatellite markers from sea cucumber *Holothuria leucospilota*. *Genetic and Molecular Research* 14(2), 6555-6560.

Sloan N.A., Bodungen B.V. 1980. Distribution and feeding of the sea cucumber *Isostichopus badionotus* in relation to shelter and sediment criteria the Bermuda platform. *Marine Ecology Progress Series* 10, 257-264.

Smirnov A.V., Gebruk A.V., Galkin S.V., Shank, T.M. 2000. New species of holothurian (Echinodermata: Holothuroidae) from hydrothermal vent habitats. *Journal of Marine Biological Association of the United Kingdom* 80(2), 321-328.

Stamatis C., Triantafyllidis A., Moutou K.A., Mamuris Z. 2004. Mitochondrial DNA variation in northeast Atlantic and Mediterranean populations of Norway lobster, *Nephrops norvergicus*. *Molecular Ecology* 13, 1377-1390

Sugawara T., Zaima N., Yamamoto A., Sakai S., Noguchi R., Hirata T. 2006. Isolation of sphingoid bases of sea cucumber cerebrosides and their cytotoxicity against human colon cancer cells. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 70(12), 2906-2912.

Tan M.P., Jamsari A.F.J., Muchlisin Z.A., Siti Azizah M.N. 2015. Mitochondrial genetic variation and population structure of the striped snakehead, *Channa striata* in Malaysia and Sumatra, Indonesia. *Biochemical Systematics and Ecology* 60, 99-105.

Toral-Granda M.V. 2007. Fact sheets and identification guide for commercial sea cucumber species. *Beche-de-Mer Information Bulletin* 29, 49-52.

Toral-Granda V., Lovatelli A., Vasconcellos M. 2008. Sea Cucumbers. A Global Review on Fishery and Trade. FAO Fisheries Technical Paper. No. 516, FAO, Rome. 319 p.

Uthicke S. 1999. Sediment bioturbation and impact of feeding activity of *Holothuria* (Halodeima) atra and *Stichopus chloronotus*, two sediment feeding holothurians, at Lizard Island, Great Barrier Reef. *Bulletin of Marine Science* 64, 129-141.

Uthicke S., Benzie J.A.H. 2003. Gene flow and population history in high dispersal marine invertebrates: mitochondrial DNA analysis of *Holothuria nobilis* (Echinodermara: Holothuroidea) identification in a segmeng of cytochrome b region by PCR-RFLP analysis. *Food Chemistry* 121, 1305-1311.

Iuri V., Patti F.P., Procaccini G. 2007. Phylogeography of the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck) (Echinodermata: Echinoidea): first insights from the South Tyrrhenian Sea. *Hydrobiology* 580, 77-84

Ivy G., Giraspy D.A.B. 2006. Development of large-scale hatchery production techniques for the commercially important sea cucumber *Holothuria scabra* var. *versicolor* (Conand, 1986) in Queensland, Australia. *SPC. Beˆche-de-mer Information Bulletin* 24, 28-38

Kim M.J., Choi T.J., An H.S. 2008. Population genetic structure of sea cucumber, *Stichopus japonicas* in Korea using microsatellite markers. *Aquaculture Research* 39, 1038-1045.

Kotpal R.L. 2003. Zoology phylum 8. Echinodermata, 5th edition. Rastogi Publications. 219 p.

Lambert P. 1997. Sea Cucumbers of British Columbia, Southeast Alaska and Puget Sound. British Columbia: UBC Press, 2-14.

Lambert P.H., Oliver K.L. 2001. *Pseudothyone levini*, a new species of sea cucumber (Echinodermata: Holothuroidea) from the northeastern pacific. *Proceeding of the Biological society of Washington* 114(3), 589-598.

Levin V.S. 1982. Trepang (Japanese sea cucumber). Eastern Book Edition, Vladivostok.

Lovatelli A., Conand C., Purcell P., Uthicke S., Hamel J. 2004. Advances in Sea Cucumber Aquaculture and Management. FAO Fisheries Technical Paper 463, FAO, Rome.

McEuen F.S. 1988. Spawning behaviors of northeast Pacific sea cucumbers (Holothuroidea: Echinodermata). *Marine Biology* 98(4), 565-585.

McKeown N.J., Robin J.P., Sha P.W. 2015. Species-specific PCR-RFLP for identification of early life history stages of squid and other applications to fisheries research. *Fisheries Research* 167, 207-209.

Pourkazemi M. 1996. Molecular and biochemical genetic analysis of sturgeon stocks from the South Caspian Sea. Doctoral dissertation, University of Wales Swansea.

Ren G.J., Hu J.J., Gao T.X., Han Z.Q. 2015. Population structure and genetic diversity of *Ammodytes personatus* in the Northwestern Pacific revealed by microsatellites markers. *Biochemical Systematics and Ecology* 61, 303-311.

populations from the Indo-Pacific. *Molecular Ecology* 12, 2635-2648

Uthicke S., Conand C., Benzie J.A.H. 2001. Population genetics of the fissiparous holothurians *Stichopus chloronotus* and *Holothuria atra* (Aspidochirotida): a comparison between the Torres Strait and La Reunion. *Marine Biology* 139, 257-265.

Uthicke S., Klumpp D.W. 1998. Microbenthos community production in sediments of a near shore coral reef: seasonal variation and response to ammonium recycled by holothurians. *Marine Ecology Progress Series* 169, 1-11.

Vargara Chen C., Gonzalez W.M., Perez-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

Population structure of *Holothuria leucospilota* in the north of Persian Gulf and Oman Sea using DNA sequencing method

Roghieh safari*[1], Seyed Ahmad Qasemi[2], Sohrab Rezvani Gilkalaee[3], Hadi Qafari[3]

[1]Department of Fisheries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
[2]Persian Gulf Research Institute, Khalij Fars University, Bushehr, Iran.
[3]Iranian Fisheries Science Research Institute, Tehran, Iran.
*Corresponding author: fisheriessafari@yahoo.com
Received: 2019/3/12 Accepted: 2019/5/31

Abstract

Sea cucumber is one of the most important ecological and economic species in Persian Gulf and Oman Sea. Sequencing was used to study the genetic diversity and population structure of *Holothuria leucospilota* in the north of the Persian Gulf and Oman Sea. For this purpose, 58 samples were captured from Bushehr, Bandar abbas and Chabahar. DNA from muscle tissue was extracted using Ammonium Acetate method. Polymerase Chain Reaction (PCR) was conducted on the targeted DNAs and DNA sequencing was carried out. The mean of haplotype diversity was high (0.78), 0.81 Chabahar, 0.8 Bandar abbas and 0.74 Bushehr. The lowest genetic differences were observed between Bandar abbas and Bushehr and the highest between Chabahar and Bushehr. The highest genetic distance was observed between Chabahar and Bushehr (0.08) and the lowest betwee Chabahar and Bushehr (0.03). The esult showed different population of *H. leucospilota* which should be considered in management of this economically important species.

Keywords: Sea cucumber, Genetic population, Diversity, Oman Sea, Persian Gulf.