

بررسی ساختار جمعیتی خیار دریایی *Holothuria parva* با استفاده از توالی یابی ژن ریبوزومال میتوکندری (16S rRNA) در سواحل شمالی خلیج فارس

لیلا عالمی نیسی^۱، محمد علی سالاری علی آبادی^{۱*}، حسین ذوالقرنین^۱، حسین پاشا زانوسی^۲

۱. گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر
۲. گروه فیزیک دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۹/۱۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۲/۱۶

چکیده

به منظور بررسی ساختار جمعیتی خیار دریایی گونه *Holothuria parva* در دو منطقه بندر بستانه و بندر دیر، از روش توالی یابی ژن 16S rRNA استفاده شد. در مجموع ۴۱۷ جایگاه نوکلئوتیدی بررسی شد که پس از بررسی در پایگاه داده ای NCBI، توالی‌ها با ژن 16S rRNA هم‌خوانی داشتند و تعلق نمونه‌ها به گونه *H. parva* تایید شد. در مجموع در دو منطقه ۴ هاپلوتایپ شناسایی شد که یکی از هاپلوتایپ‌ها در دو منطقه مشترک بود. بندر بستانه دارای ۳ هاپلوتایپ و بندر دیر دارای ۲ هاپلوتایپ بودند. تنوع هاپلوتایپی در بستانه ۸۳ درصد و در دیر ۵۰ درصد تخمین زده شد. تنوع نوکلئوتیدی در بستانه و دیر به ترتیب ۰/۰۰۷ و ۰/۰۰۲ برآورد شد. شاخص ژنتیکی (Fst) ناچیز ۰/۰۰۰ و نرخ واگرایی (Dxy) ۰/۰۰۴۸ و جریان ژنی (Nm) بالا ۱۸۷۴ بین دو منطقه برآورد گردید. بر اساس نتایج به‌دست آمده از این بررسی، احتمالاً نمونه‌های بندر بستانه و بندر دیر از یک جمعیت یکسان هستند که به دلیل جریان ژنی بالا بین دو منطقه تمایز زیادی از هم ندارند و وجود هاپلوتایپ مشترک نیز بیانگر وجود نیای مشترک *H. parva* در دو منطقه است.

واژگان کلیدی: *Holothuria parva*، ساختار جمعیتی، 16S rRNA، بستانه، دیر

۱. مقدمه

خيار دریایی (Holothuridae) یکی از گونه‌های اقتصادی در حوزه آب‌های دریای عمان و خلیج فارس است و شرایط تکثیر ویژه‌ای دارد. این گونه خاص دریایی از لحاظ اقتصادی، دارویی و غذایی کاربرد وسیعی دارد. اگر چه خیارهای دریایی معمولاً در هر محیطی و عمقی یافت می‌شوند، اما بیشترین تنوع آنها در آب‌های کم عمق گرمسیری و جزایر مرجانی است (Sloan and Von Bodungen, 1980). تاکنون گونه‌های مختلفی از خیارهای دریایی در سواحل خلیج فارس و دریای عمان شناخته شده‌اند که مطمئناً با مطالعات بیشتر گونه‌های جدیدی نیز شناسایی خواهند شد (Bruckner et al., 2003). خيار دریایی از جانوران آبی خلیج فارس است که تاکنون بررسی‌های چندانی درباره آن صورت نگرفته است. تاکنون حدود ۲۰ گونه از این موجودات دریایی در خلیج فارس و دریای عمان شناسایی شده‌اند (Uthicke and Karez, 1999).

میانگین طول خيار دریایی *Holothuria Parva* حدود ۶۵ میلی متر و عرض آن ۲۸ میلی متر است. رنگ این گونه در ناحیه پشتی قهوه‌ای تیره تا سیاه و در ناحیه شکمی روشن تر است، بازوها و پاهای این گونه زرد رنگ است. بدن آن دوکی شکل و در دو انتها کمی باریک است. دیواره بدنشان دارای اسپیکول‌های میله‌ای و دارای خارچه است. پراکنش این گونه بیشتر در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری است. در مناطق بین جزر و مدی عواملی همچون شدت امواج و نیز ارتفاع آنها از جمله مهمترین عوامل تعیین کننده ساختار جوامع ساکن این مناطق است (Chapman, 2009). پراکنش خیارهای دریایی در مناطق کم عمق نواحی گرمسیری و نیمه گرمسیری است، ولی بیشترین تراکم و تنوع آنها در منطقه گرمسیری Indo-Pacific است (Al-Rashdi et al., 2007). خیارهای دریایی در بسیاری از بیوتوپ‌های دریایی و در همه عرض‌های جغرافیایی از منطقه بین جزر و مدی گرفته تا اعماق

زیاد دریاها یافت می‌شوند (Lovatelli and Conand, 2004).

نشانگرهای میتوکندریایی به دلیل، انتقال از مادر به فرزند و عدم نوترکیبی، سرعت جهش بسیار بیشتر از ژنوم هسته و خصوصیت منحصر به فرد mtDNA به خصوص سرعت تکامل آن که ۱۰ برابر بیشتر از DNA هسته‌ای است، آن را به یک ابزار مفیدی در آنالیزهای فیلوژنی تبدیل کرده است (Calo-Mata et al., 2009). آنالیزهای DNA میتوکندری روشی جدید است که به عنوان ابزار تحقیقی برای زیست‌شناسان با مقاصد شیلاتی استفاده می‌شود، اطلاعات حاصل از این روش می‌تواند در شناسایی ساختار ژنتیکی جمعیت خيار دریایی مفید واقع شود (Lambert, 1997).

توسل پور در سال ۱۳۸۷ به مطالعه ژنتیکی خیارهای دریایی *Holothuria atra* در مناطق بستانه و نایبند به روش مولکولی RAPD پرداختند. احسان پور و همکاران در سال ۱۳۹۲ طی بررسی شناسایی مولکولی با استفاده از ژن 16srRNA و مطالعه فعالیت ضد سرطانی عصاره‌های مختلف دیواره بدن خيار دریایی *Holothuria parva* نشان دادند ترکیبات این گونه می‌توانند پس از تخلیص به عنوان کاندیدای مناسبی جهت تولید داروی ضد سرطان استفاده گردد. در خارج از کشور نیز می‌توان به بررسی فیلوژنی خیارهای دریایی و تفکیک ۱۷ گونه از خیارهای دریایی مالزی توسط Kamarudin و همکاران (Kamarudin et al., 2010) و بررسی فیلوژنتیکی خیارهای دریایی سواحل مصر توسط El-Naggar و همکاران (El-Naggar et al., 2008) اشاره نمود. Kim و همکاران به بررسی ساختار ژنتیکی خیار دریایی *Stichopus japonicus* با استفاده از روش ریزماهواره پرداخته و ۱۴۴ نمونه از ۵ نقطه سواحل کره جمع آوری و از ۹ توالی ریزماهواره‌ای برای بررسی آنها استفاده کردند و در مجموع ۱۳۹ آلل مختلف برای همه جمعیت‌ها به دست آمد (Kim et al., 2008). Chen و همکاران ساختار ژنتیکی خيار

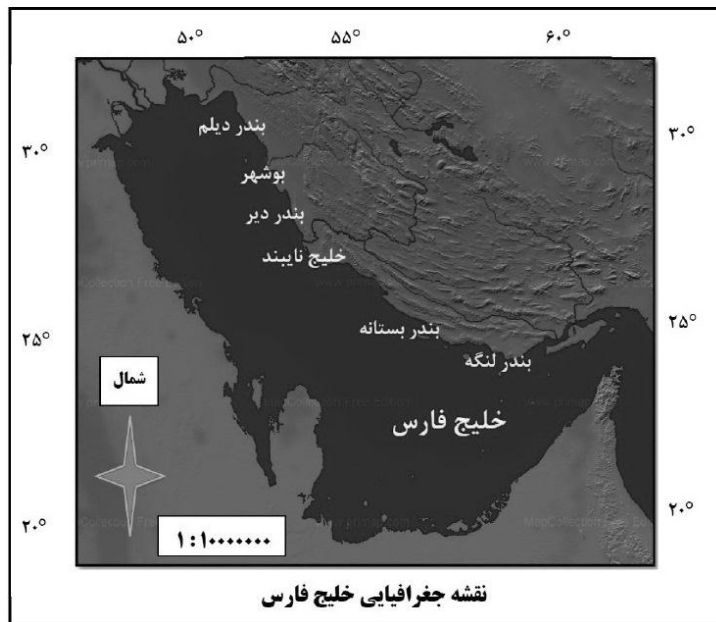
در کنار کارگاه کشتی سازی و ایستگاه دوم در بندر بستانه در استان هرمزگان انتخاب شد (شکل ۱). تعداد ۶۰ نمونه به صورت دستی از دو منطقه جمع‌آوری و در الکل اتانول ۹۶ درصد تثبیت و به آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر منتقل گردید. ابتدا حدود ۵۰ میلی گرم از بافت ماهیچه خیار دریایی جدا، سپس در هوای آزاد قرار داده شد تا الکل آن خارج شود. استخراج DNA با استفاده از روش استات آمونیوم انجام گردید (Infante *et al.*, 2006). برای تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده، از روش های اسپکتروفتومتری (AL800) و الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد (Salari Aliabadi *et al.*, 2008). آغازگرهای ژن 16S rRNA توسط نرم افزار BioEdit version 7.0.0 (Hall, 2004) مشخص و توسط وب سایت NCBI هم ردیف سازی شد (جدول ۱).

دریایی پرورشی و خیار دریایی طبیعی را با استفاده از روش ریزماهواره مورد مقایسه قرار دادند، نتایج نشان داد بین نمونه‌های تفریح شده و وحشی اختلاف ژنتیکی زیادی وجود دارد (Chen *et al.*, 2008).

با توجه به اینکه تاکنون مطالعاتی کمی در مورد گونه *Holothuria parva* (Lampert, 1885) صورت گرفته است این مطالعه با هدف تعیین تنوع ژنتیکی، شناسایی جمعیت‌ها و بررسی میزان شباهت‌ها یا تفاوت‌های بین جمعیت‌های احتمالی این گونه با استفاده از توالی یابی ژن ریبوزومال میتوکندری (16S rRNA) در سواحل شمالی خلیج فارس انجام گردید.

۲. مواد و روش‌ها

پس از بررسی‌های مقدماتی و شناسایی دقیق منطقه، مناسب ترین ایستگاه‌ها در سواحل صخره ای شمال خلیج فارس انتخاب شد. ایستگاه اول در بندر دیر روستای اولی ۵ کیلومتری غرب شهرستان دیر و



شکل ۱. موقعیت جغرافیایی و محل استقرار ایستگاه‌های نمونه برداری بندر دیر و بستانه در سواحل شمالی خلیج فارس

جدول ۱. آغازگرهای استفاده شده در این تحقیق

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'

DNA الگو، Taq DNA Polymerase (۵ U/μ)، ۲/۵ میلی مولار $MgCl_2$ ، ۲ میکرولیتر PCR Buffer، ۱۰۰

واکنش زنجیره‌ای پلی مرز در حجم ۲۵ میکرولیتر و میزان مواد مصرفی در PCR شامل، ۱۰۰ نانوگرم

نمونه از محصولات PCR به حجم ۱۵ میکرولیتر به شرکت Shine Gene چین فرستاده شد. پس از دریافت توالی‌ها از شرکت، بررسی صحت و ویرایش دستی توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار Technelysium Pty Ltd., Qld, Chromas ver. 2 (Australia) انجام گرفت. سپس توالی‌ها برای اطمینان از صحت تکثیر ژن مورد نظر در پایگاه ژنی NCBI، BLAST شدند. همترازی توالی‌ها توسط برنامه Clustal W در نرم افزار BioEdit ver. 7.0.0 انجام شد (Hall, 2004). ترسیم درخت‌های تبارزایی و ماتریس فاصله ژنتیکی با استفاده از نرم افزار MEGA (Tamura et al., 2011) ver. 5 انجام گرفت. شاخص تمایز Fst، جریان ژنی و ساختار جمعیتی در نرم افزار Arlequin ver. 3.1 (Excoffier et al., 2005) محاسبه گردید.

۳. نتایج

در مجموع از ۸ توالی خوانای بدست آمده نتایج حاصل نشان داد که ناحیه تکثیر شده دارای ۴۱۷ جفت باز است (جدول ۲). نتایج حاصل از BLAST کردن نمونه‌ها نشان داد که ناحیه تکثیر شده با ناحیه 16S rRNA مطابقت دارد. توالی مذکور دارای ۹۹ درصد همپوشانی و همسانی با گونه *H. parva* بود.

جدول ۲. اطلاعات ژنتیکی به دست آمده از نمونه‌های بررسی شده

ویژگی	همه نمونه‌ها	بستانه	دیر
تعداد جایگاه‌های نوکلئوتیدی	۴۱۷	۴۱۴	۴۱۵
تعداد جایگاه‌های نامتغیر	۴۰۶	۴۰۸	۴۱۳
تعداد جایگاه‌های چندریخت	۸	۶	۲
متغیر تک ریخت (دومتغیره)	۸	۶	۲
تعداد هاپلوتایپ	۴	۳	۲
تنوع نوکلئوتیدی Pi	۰/۰۰۴	۰/۰۰۷	۰/۰۰۲
فراوانی هاپلوتایپی	٪۶۴	٪۸۳	٪۵۰
نسبت GC	٪۴۳/۶	٪۴۳/۶	٪۴۳/۶

شد که هاپلوتایپ شماره ۲ در هر دو ایستگاه مشترک بود (جدول ۳). همچنین برای ژن مورد نظر تنوع هاپلوتایپی در ایستگاه بستانه ۸۳ درصد و در ایستگاه

میکرو مول از آغازگر ۱ و آغازگر ۲، ۱۰ میلی مولار dNTP و آب دو بار تقطیر برای برای رساندن به حجم مورد نظر انجام شد. در این مطالعه جهت تشکیل بهتر باندها و انتخاب مناسب‌ترین دمای آغازگر از شیب حرارتی ۴۶-۴۹ استفاده شد و مناسبترین دما جهت واکنش PCR، ۴۷ درجه سانتی گراد به دست آمد. برنامه حرارتی PCR نیز به صورت ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتیگراد جهت واسرشت سازی اولیه تنظیم شد و پس از آن ۳۵ چرخه شامل ۴۰ ثانیه ای در ۹۵ درجه سانتیگراد جهت واسرشت سازی، ۳۵ ثانیه ای در دمای اتصال مربوطه و ۶۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد برای مرحله گسترش ادامه یافت. برنامه فوق با درجه حرارت ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه بسط و خاتمه یافت. در نهایت محصولات PCR به یخچال ۴ درجه سانتی گراد برای سنجش کیفیت محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد منتقل شدند. پس از پایان واکنش تکثیر، مقدار ۵ میکرولیتر از نمونه بر روی ژل آگاروز ۱ درصد برده شد تا کیفیت قطعات ژنی پس از تکثیر مورد ارزیابی قرار گیرند. باند مورد انتظار پس از تکثیر ۴۵۵ جفت باز بود که پس از الکتروفورز صحت آن تایید شد. جهت عملیات توالی یابی از هر یک از دو منطقه تعداد ۸

در مجموع ۴ هاپلوتایپ شناسایی شدند که در منطقه بستانه ۳ هاپلوتایپ (هاپلوتایپهای ۱، ۲ و ۳) و در منطقه دیر ۲ هاپلوتایپ (هاپلوتایپ ۲ و ۴) دیده

دیر ۵۰ درصد برآورد گردید. ماتریس فاصله ژنتیکی بین نمونه‌های بررسی شده نشان دهنده این است که فاصله ژنتیکی در میان نمونه‌های بررسی شده از ۰/۰۰۰ تا ۰/۰۱۵ بود (جدول ۴).
جدول ۳. پراکنش هاپلوتیپ‌های ژن 16S rRNA در خیارهای دریایی *H. parva* در دو منطقه بستانه و دیر

هاپلوتیپ	بستانه	دیر
هاپلوتایپ ۱	۱	۰
هاپلوتایپ ۲	۲	۳
هاپلوتایپ ۳	۱	۰
هاپلوتایپ ۴	۰	۱

جدول ۴. ماتریس فاصله ژنتیکی بین نمونه‌های بررسی شده

نمونه	B5	B8	B13	B16	D4	D7	D9
B8	۰/۰۱						
B1	۰/۰۱۵	۰/۰۰۵					
B1	۰/۰۱	۰/۰۰۰	۰/۰۰۵				
D	۰/۰۱	۰/۰۰۰	۰/۰۰۵	۰/۰۰۰			
D	۰/۰۱	۰/۰۰۰	۰/۰۰۵	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰		
D	۰/۰۱۵	۰/۰۰۵	۰/۰۱۰	۰/۰۰۵	۰/۰۰۵	۰/۰۰۵	
D	۰/۰۱	۰/۰۰۰	۰/۰۰۵	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۵

B13 و D9 در یک زیر شاخه و نمونه B5 در یک شاخه جدا قرار گرفت (شکل ۲).

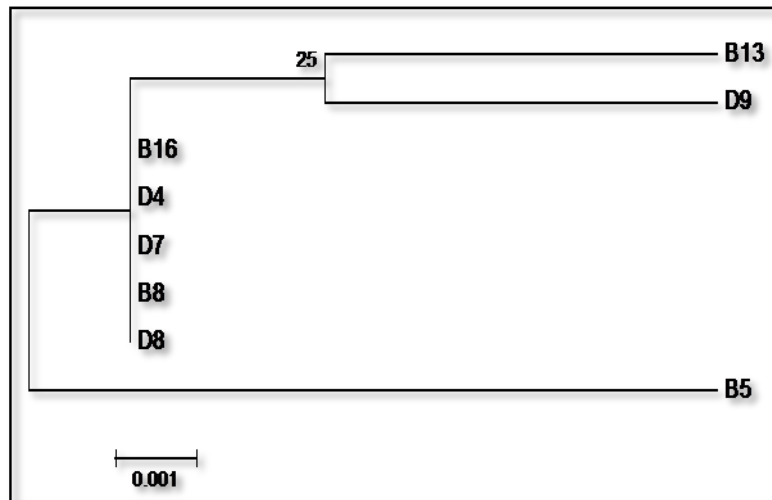
۴. بحث و نتیجه گیری

با اینکه داده‌های شیلاتی درباره میزان و سطح برداشت از این ذخایر ارزشمند به ویژه در سواحل خلیج فارس وجود ندارد، ولی بررسی‌ها نشان داده‌اند که خیارهای دریایی نسبت به برداشت بیش از حد آسیب پذیرند (Lovatelli and Conand, 2004; Toral-Granda and Martínez, 2007) و نرخ بازسازی ذخایر آن‌ها بسیار کند است (Uthicke and Benzie, 2003). حتی برداشت با شدت کم نیز می‌تواند منجر به کاهش در اندازه ذخیره شود، زیرا کاهش تراکم افراد بالغ به کاهش شدید در نسبت تولید لارو می‌انجامد که در فراوانی آلل‌ها و تنوع ژنتیکی موثر است (Uthicke and Benzie, 2003).

نتایج نشان داد که میزان شاخص تمایز (Fst) بین بستانه و بندر دیر بسیار پایین (۰/۰۰۰) است در حالی که میزان جریان ژنی (Nm) بسیار بالا است (۱۸۷۴/۵۴). میزان واگرایی (جایگزینی نوکلئوتیدی به ازای جایگاه) بین دو ناحیه بر اساس آزمون واگرایی (Dxy) ۰/۰۰۴۸ تخمین زده شد (انحراف استاندارد ۰/۰۰۳۴). همچنین نتایج به دست آمده از آزمون Tajima D-Test بین این نواحی (۱/۷۰-) معنی دار نبود ($P > 0/10$).

درخت تبارزایی نمونه‌های بررسی شده به روش محتمل ترین درخت^۱ نیز برای نمونه‌های جمع آوری شده، ترسیم گردید که همه ی نمونه‌ها (B16, D4, D7, B8, D8) در یک شاخه قرار گرفتند و نمونه‌های

^۱Maximum Likelihood



شکل ۲. درخت تبارزایی نمونه‌های بررسی شده به روش محتمل ترین درخت

وجود هاپلوتایپ مشترک بین دو منطقه نشان دهنده نیای مشترک بین دو منطقه می‌باشد که در خیارهای دریایی ساکن در سواحل دریا شایع است (Uthicke and Benzie, 2003). در بررسی دیگری که با بکارگیری ژن 16S rRNA خیار دریایی انجام شده است نیز چنین ویژگی یعنی بالا بودن تنوع هاپلوتایپی دیده شده است (Vergara-Chen *et al.*, 2010). مقادیر تنوع نوکلئوتیدی به دست آمده در بررسی کنونی قابل مقایسه با بررسی‌های سایر پژوهشگران روی دیگر خارتنان است (Uthicke and Benzie, 2003; Duran *et al.*, 2004; Iuri *et al.*, 2007; Calderón *et al.*, 2008).

نتایج این بررسی نشان دهنده این است که شاخص تمایز (Fst) بین نمونه‌های *H. parva* بستانه و دیر معنی دار نیست و با نتایج Vergara-Chen و همکاران (Vergara-Chen *et al.*, 2010) همخوانی دارد. بر اساس نتایج به دست آمده از بررسی حاضر می‌توان بیان کرد که احتمالاً به دلیل نامحدود بودن بوم سازگارهای دریایی و فاصله جغرافیایی اندک بین دو منطقه بستانه و دیر، جریان ژنی بالایی (Nm=1874/54) بین نمونه‌های بندر دیر و بستانه برقرار است که سبب پدید آمدن چنین ساختار ژنتیکی شده است. در برخی بررسی‌های خیارهای دریایی نیز شاخص تمایز (Fst) معنی داری در نتیجه

پیش از این رده بندی خیارهای دریایی بر پایه ریخت‌شناسی آن‌ها بوده است که روش دقیقی نبوده و همواره با ابهام و اشکال همراه بوده است (Byrne *et al.*, 2010). بنابر عقیده Kerr و همکاران کاربرد توالی یابی ژن 16S rRNA در خیارهای دریایی می‌تواند در موارد بسیاری به نتایجی برسد که با رده بندی کنونی همخوانی ندارد و پیشینه تکاملی که از این روش به دست می‌آید گاهی با فرضیات قبلی مطابقت ندارد (Kerr *et al.*, 2005).

خیارهای دریایی علاوه بر ارزش تغذیه ای، به دلیل دارا بودن ترکیبات زیست فعال موثر در زمینه‌های بهداشتی و پزشکی بسیار مورد توجه قرار گرفته اند (Li *et al.*, 2013). به همین دلیل در کشور ما نیز برداشت از ذخایر خیارهای دریایی در سال‌های اخیر افزایش یافته است این درحالی است که بررسی‌ها نشان داده اند که خیارهای دریایی نسبت به برداشت بیش از حد آسیب پذیرند (Lovatelli and Conand, 2004; Toral-Granda and Martínez, 2007) و نرخ بازسازی ذخایر آن‌ها بسیار کند است (Uthicke and Purcell, 2004).

در بررسی کنونی میزان تنوع هاپلوتایپی بالایی و تنوع نوکلئوتیدی پایینی در بین نمونه‌ها مشاهده شد. میانگین تنوع هاپلوتایپی ۶۴ درصد بود که در منطقه بستانه ۸۴ درصد و در منطقه دیر ۵۰ درصد بود.

درخت‌های تبارزایشی می‌تواند تصویر مناسبی از روابط خویشاوندی و روابط تکاملی به نمایش بگذارد. ترسیم درخت‌های تبارزایشی یکی دیگر از نمایه‌هایی بود که در بررسی کنونی جهت مقایسه ساختار ژنتیکی دو منطقه مورد بررسی و همچنین برای مقایسه نمونه‌های منطقه خلیج فارس با دیگر خویشاوندان بکار رفت. ثابت شده است که درخت‌های ترسیم شده بر اساس داده‌های توالی DNA بسیار دقیق‌تر از داده‌های ریخت شناسی می‌تواند نمایانگر روابط خویشاوندی و تکاملی باشد.

با توجه به اینکه درخت‌های تبارزایشی ترسیم شده و فواصل ژنتیکی به دست آمده نمایانگر جمعیت‌های مجزایی نبودند، احتمالاً نمونه‌های بندرستانه و بندر دیر از یک جمعیت یکسان هستند که به دلیل جریان ژنی بالا بین دو منطقه تمایز زیادی از هم ندارند و وجود هاپلوتایپ مشترک نیز بیانگر وجود نیای مشترک این خیارهای دریایی است. در بررسی‌های مشابه روی خیارهای دریایی این عدم جدایی ژنتیکی حتی در زیستگاه‌های مختلف ساحلی و لاگونی نیز دیده شده است (Vergara-Chen *et al.*, 2010). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ژن 16S rRNA نشانگر مناسبی برای شناسایی گونه مورد نظر در خلیج فارس است.

منابع

توسل پور، ا. ۱۳۸۷. بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت خیار دریایی *Holothuria atra* در مناطق بستانه و نایبند با استفاده از روش مولکولی RAPD. پایان نامه دوره کارشناسی ارشد زیست شناسی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، ۹۲ صفحه.

احسان پور، ز.، ارچنگی، ب.، سلیمی، م.، سالاری علی آبادی، م. ع.، ذوالقرنین، ح. ۱۳۹۲. ژنومیکس خیار دریایی *Holothuria parva* جهت بررسی پتانسیل ضد سرطانی ترکیبات استحصالی. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، ۸۷ صفحه.

محدودیت در جریان ژنی دیده شده است که علت آن احتمالاً مربوط به تفاوت در زیستگاه‌ها (زیستگاه‌های لاگونی در برابر ساحلی) و وجود موانع ریزجغرافیایی بوده است (Uthicke and Benzie, 2003; Uthicke and Purcell, 2004). عوامل مختلف زیستی و محیطی از قبیل دما، شوری، جریان‌ات آبی و نوع چرخه زندگی و عوامل محدود کننده جریان ژنی بر روی ساختار ژنتیکی جانداران دریایی تاثیرگذار می‌باشند (Badaracco *et al.*, 1995).

احتمال می‌رود تمایز ژنتیکی F_{st} (۰/۰) پایین دیده شده در اثر جریان ژنی بالا (۱۸۷۴/۵۴) باشد که خود می‌تواند موجب کاهش درون آمیزی 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 می‌دهد، ولی تمایز ژنتیکی را کاهش می‌دهد (Gyllensten and Wilson, 1987). عموماً انتظار می‌رود در بی مهرگان 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 باشید (Avisé, 1989; Pourkazemi, 1996; Wolf *et al.*, 2000). خیارهای دریایی دارای لاروهای پلاژیک هستند که در یک دوره ۱۳ تا ۲۶ روزه است (Kohlmann *et al.*, 2010; Beaumont *et al.*, 2003). بنابراین احتمالاً آنها ارتباط ژنتیکی بالایی دارند که بررسی کنونی نیز تایید کننده این مطلب است.

نتایج مقایسه و همترازی توالی‌های به دست آمده در بررسی کنونی در پایگاه ژنی NCBI و ترسیم درخت‌های تکاملی، نامگذاری گونه *Holothuria parva* را از نظر ملکولی پشتیبانی و تایید می‌نماید و مشخص شد که ژن 16S rRNA نشانگر مناسبی برای شناسایی گونه مورد نظر در خلیج فارس است.

- Al-Rashdi, K. M.; Claereboudt, M. R. and Al-Busaidi, S. S. 2007. Density and size distribution of the sea cucumber, *Holothuria scabra* (Jaeger, 1935), at six exploited sites in Mahout Bay, Sultanate of Oman. *J. Agric. Mar. Sci.*, 12: 43-51.
- Avise, J. C. 1989. Gene trees and organismal histories: a phylogenetic approach to population biology. *Evolution*: 1192-1208.
- Badaracco, G.; Bellorini, M. and Landsberger, N. 1995. Phylogenetic study of bisexual *Artemia* using random amplified polymorphic DNA. *J. Mol. Evol.*, 41: 150-154.
- Beaumont, A.; Boudry, P. and Hoare, K. 2010. *Biotechnology and genetics in fisheries and aquaculture*. John Wiley & Sons.
- Bruckner, A.; Johnson, K. and Field, J. 2003. Conservation strategies for sea cucumbers: Can a CITES Appendix II listing promote sustainable international trade. *SPC Beche-de-mer Information Bulletin*, 18: 24-33.
- Byrne, M.; Rowe, F. and Uthicke, S. 2010. Molecular taxonomy, phylogeny and evolution in the family Stichopodidae (Aspidochirotida: Holothuroidea) based on COI and 16S mitochondrial DNA. *Mol Phylogenet Evol.*, 56: 1068-1081.
- Calderón, I.; Giribet, G. and Turon, X. 2008. Two markers and one history: phylogeography of the edible common sea urchin *Paracentrotus lividus* in the Lusitanian region. *Mar. Biol.*, 154: 137-151.
- Calo-Mata, P.; Pascoal, A.; Fernández-No, I.; Böhme, K.; Gallardo, J. M. and Barros-Velázquez, J. 2009. Evaluation of a novel 16S rRNA/tRNA mitochondrial marker for the identification and phylogenetic analysis of shrimp species belonging to the superfamily Penaeoidea. *Anal. Biochem.* 391: 127-134.
- Chapman, A. D. 2009. Numbers of living species in Australia and the world. 61pp. Canberra: Australian Biological Resources Study. ISBN (printed): 978 0 642 56849 61 ISBN (online): 978 0 642 56850 2.
- Chen, L.; Li, Q. and Yang, J. 2008. Microsatellite genetic variation in wild and hatchery populations of the sea cucumber (*Apostichopus japonicus* Selenka) from northern China. *Aquac. Res.*, 39: 1541-1549.
- Duran, 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). *Mol. Ecol.*, 13: 3317-3328.
- El-Naggar, A. M.; Ashaat, N. A.; El-Belbasi, H. I. and Slama, M. S. 2008. Molecular Phylogeny of Egyptian Sea Cucumbers As Predicted From 16s Mitochondrial rRNA Gene Sequences. *World Appl. Sci. J.*, 5: 531-542.
- Excoffier, L.; Laval, G. and Schneider, S. 2005. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. bioinformatics online*, 1: 47.
- Gyllensten, U. and Wilson, A. C. 1987. Mitochondrial DNA of salmonids. *Population Genetics and Fisheries Management*. University of Washington Press, Seattle: 301-307.
- Hall, T. 2004. BioEdit version 7.0. 0. Distributed by the author, website: www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html.
- Infante, C.; Crespo, A.; Zuasti, E.; Ponce, M.; Pérez, L.; Funes, V.; Catanese, G. and Manchado, M. 2006. PCR-based methodology for the authentication of the Atlantic mackerel *Scomber scombrus* in commercial canned products. *Food Res. Int.* 39: 1023-1028.
- Iuri, V.; Patti, F. and Procaccini, G. 2007. Phylogeography of the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck) (Echinodermata: Echinoidea): first insights from the South Tyrrhenian Sea. Pp. 77-84 in *Biodiversity in Enclosed Seas and Artificial Marine Habitats* Springer.
- Kamarudin, K. R.; Hashim, R. and Usup, G. 2010. Phylogeny of sea cucumber (Echinodermata: Holothuroidea) as inferred from 16S mitochondrial rRNA gene sequences. *Sains Malaysiana*, 39: 209-218.
- 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. *Mar. Biotechnol.*, 7: 53-60.
- Kim, M. J.; Choi, T. J. and An, H. S. 2008. Population genetic structure of sea cucumber, *Stichopus japonicus* in Korea using microsatellite markers. *Aquac. Res.*, 39: 1038-1045.
- Kohlmann, K.; Gross, R.; Murakaeva, A. and Kersten, P. 2003. Genetic variability and structure of common carp (*Cyprinus carpio*) populations throughout the distribution range inferred from allozyme, microsatellite and mitochondrial DNA markers. *Aquat. Living Resour.*, 16: 421-431.

Lambert, P. 1997. *Sea Cucumbers of British Columbia, Southeast Alaska and Puget Sound*. UBC Press.

Li, Y.-X.; Himaya, S. and Kim, S.-K. 2013. Triterpenoids of marine origin as anti-cancer agents. *Molecules*, 18: 7886-7909.

Lovatelli, A. and Conand, C. 2004. *Advances in sea cucumber aquaculture and management*. Food & Agriculture Org.

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

Salari Aliabadi, M. A.; Rezvani Gilkolaei, S.; Savari, A.; Zolgharnein, H. and Nabavi, S. M. B. 2008. Microsatellite polymorphism in Iranian populations of cobia (*Rachycentron canadum* G.). *Biotechnology*, 7: 775-780.

Sloan, N. 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. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 2: 257-264.

Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M. and Kumar, S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, 28: 2731-2739.

Toral-Granda, M. V. and Martínez, P. C. 2007. Reproductive biology and population

structure of the sea cucumber *Isostichopus fuscus* (Ludwig, 1875) (Holothuroidea) in Caamaño, Galápagos Islands, Ecuador. *Mar. Biol.*, 151: 2091-2098.

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

Uthicke, S. and Karez, R. 1999. Sediment patch selectivity in tropical sea cucumbers (Holothuroidea: Aspidochirota) analysed with multiple choice experiments. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 236: 69-87.

Uthicke, S. and Purcell, S. 2004. Preservation of genetic diversity in restocking of the sea cucumber *Holothuria scabra* investigated by allozyme electrophoresis. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 61: 519-528.

Vergara-Chen, C.; Gonzalez-Wanguemert, M.; Marcos, C. and 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: 895-906.

Wolf, C.; Burgener, M.; Hübner, P. and Lüthy, J. 2000. PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: differentiation of fish species. *LWT- Food Sci. Technol.*, 33: 144-150.

Population structure of sea cucumber *Holothuria parva* using 16S mitochondrial rRNA Gene Sequences in the northern coast of Persian Gulf

Leala Alami-Naysi¹, Mohammad Ali Salari Aliabadi^{1*}, Hossain Zolgharnean¹, Hossain Pasha-Zanousi².

1. Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Khuzestan, Iran.

2. Department of Marine Physics, Faculty of Marine Science, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Khuzestan, Iran.

Abstract:

In order to investigate the population structure species of sea cucumber *Holothuria parva* in the two regions Bostaneh Port and Dayer Port, 16S rRNA gene sequencing method was used. In total, 417 nucleotide loci were determined, after investigating in the NCBI database, sequences were consistent with 16S rRNA gene and samples were verified to belong to the species *H. parva*. In total four haplotypes were identified, one of which was common in both regions. Bostaneh Port had 3 haplotypes and Dayer Port had 2 haplotypes. Haplotype diversity was estimated to be 83 percent in Bostaneh Port and 50 percent in Dayer Port. Estimated Nucleotide diversity in Bostaneh and Dayer Ports were 0.007 and 0.002 respectively. Low genetic differentiation ($F_{st}=0.000$), divergences rate ($D_{xy}= 0.0048$) and high gene flow ($N_m=1874$) between the two regions were estimated. Based on this study Bostaneh and Dayer Port samples have probably diverged from an identical population since a high gene flow and low differentiation is observed among them. There is also a common haplotype, suggesting a common ancestor of *H. parva* in two regions.

Keywords: *Holothuria parva*, population structure, 16S rRNA, Bostaneh Port, Dayer Port.

*Corresponding author, E-mail: salari@kmsu.ac.ir