بررسی فیلوژنی مولکولی خیار دریایی بر اساس اطلاعات ژن 18s rRNA در سواحل بین جزر و مدی جزیره قشم

پرگل قوام مصطفوی[۱]، سید مسعود هوشمند[۲]، غلامحسین وثوقی[۳]، سیدمحمدرضا فاطمی[۴]، مهبا عطائی طالبی[۵،*]

۱. استادیارگروه بیولوژی دریا، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران
۲. استادیار پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری
۳. استاد گروه بیولوژی دریا، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران
۴. استادیارگروه بیولوژی دریا، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران
۵. کارشناس ارشد بیولوژی دریا، واحد علوم و تحقیقات تهران

[*]آدرس مسئول مکاتبات: مهبا عطائی طالبی، گروه بیولوژی دریا، واحد علوم و تحقیقات تهران، پست الکترونیکی: mahba.ataei@gmail.com
مکان انجام پژوهش: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران

تاریخ دریافت: ۸۹/۴/۲۷ تاریخ پذیرش: ۸۹/۷/۲۶

چکیده

به منظور مطالعه فیلوژنی مولکولی خیارهای دریایی غالب در سواحل جزر و مدی جزیره قشم، تعداد ۱۵ نمونه از هر گونه، جمع‌آوری و پس از تثبیت در اتانول ۹۶ درجه، به آزمایشگاه منتقل شد. در آزمایشگاه نمونه‌ها در دمای ۲۰ـ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. DNA ژنومی نمونه‌ها با استفاده از کیت استخراج (Marine DNA Animal Tissue Kit) استخراج شد و کمیت و کیفیت آن به کمک الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد و رنگ‌آمیزی توسط اتیدیوم بروماید مورد بررسی قرار گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با یک جفت پرایمر اختصاصی صورت گرفت. محصول تکثیر شده روی ژل آگارز ۲ درصد مشاهده شد و پس از تأیید اندازه و کیفیت قطعه تکثیر شده، محصولات PCR جهت انجام عملیات توالی‌یابی آماده سازی شدند. توالی‌یابی برای هر نمونه طی دو مرحله انجام شد. در نوبت اول، عملیات خوانش با پرایمرهای اختصاصی صورت گرفت، اما به علت زیادبودن طول قطعه تکثیر شده، برای مرحله دوم پرایمرهای داخلی طراحی شد. جهت تجزیه و تحلیل فیلوژنی، نرم افزارهای ClustalX2 و PAUP مورد استفاده قرار گرفت. از نرم‌افزار ClustalX2 برای بررسی توالی‌ها پس از BLAST در بانک ژنی و همچنین جهت رسم درخت Neighbor joining استفاده شد. با استفاده از نرم‌افزار PAUP، درخت فیلوژنی Maximum Parsimony رسم گردید. سپس با نرم‌افزار Tree view درخت فیلوژنی مشاهده شد. به منظور بررسی صفات ریخت‌شناسی، اسپیکول‌های میکروسکوپی استخراج گردید و مورد مطالعه قرار گرفت. اسپیکول‌ها نیز متعلق به گونه‌های *Holothuria arenicola* و *Holothuria parva* بودند. این شناسایی توسط دکتر Gustav Paulay از موزه تاریخ طبیعی فلوریدا تأیید شد. نتایج به دست آمده از توالی‌یابی نشان داد که گونه *Holothuria arenicola* بررسی شده از سواحل جزر و مدی جزیره قشم، دارای ۹۵ درصد شباهت و هم پوشانی با *Holothuria arenicola* ثبت شده در بانک ژنی آمریکا است. گونه *Holothuria parva* که تاکنون در بانک ژنی به ثبت نرسیده است، دارای بیشترین میزان تشابه با گونه *Holothuria edulis* است.

واژه‌های کلیدی: خیار دریایی، فیلوژنی مولکولی، ۱۸srRNA، جزیره قشم

مقدمه

خیارهای دریایی، جانورانی از شاخه خارپوستان هستند که پراکندگی جغرافیایی وسیعی داشته و زیستگاه‌های متنوعی را اشغال می‌کنند. تاکنون حدود ۱۴۰۰ گونه و ۱۶۰ جنس خیار دریایی در جهان شناسایی شده است. اعضای این رده تقریباً در همه محیط‌های آبی یافت می‌شوند، ولی بیشترین تنوع آن‌ها در آب‌های مناطق گرمسیری و خصوصاً نواحی کم‌عمق آبسنگ‌های مرجانی است که حتی تعداد ۲۰ گونه در هر هکتار هم دور از انتظار نیست (۱). خیارهای دریایی، از مناطق بین جزر و مدی تا آب‌های عمیق اقیانوسی گسترش دارند. بدن آن‌ها استوانه‌ای شکل است و در طول محور دهانی- مقابل دهانی، به صورت پشتی شکمی کشیده شده است. طول متوسط بدن، ۲۰-۱۵ سانتی‌متر است، گرچه طول بعضی گونه‌ها از چند سانتی‌متر هم تجاوز نمی‌کند و یا حتی طول بعضی، به ۵ متر هم می‌رسد. دیواره ماهیچه‌ای بدن در بعضی از گونه‌های ساکن آب‌های مناطق گرمسیری، ضخیم است، اما در گونه‌هایی که در اعماق زندگی می‌کنند، حالت ژلاتینی و شفاف دارد (۲). بعضی از اعضای راسته *Aspidochirotida* قادرند، به وسیله خارج‌کردن لوله‌های کوورین از ناحیه مخرج، در برابر شکارچیان از خود دفاع کنند. این پدیده که Evisceration نام دارد، هنگامی رخ می‌دهد که موجود احساس خطر کند و در نتیجه این عمل، جانور از لحاظ اندازه، بزرگ‌تر شده و حالت چسبنده پیدا می‌کند. معمولاً پس از انجام این روند، خیار دریایی به شکل اولیه بازمی‌گردد و اندام‌های از دست رفته دوباره رشد می‌کنند (۳). موادی که طی Evisceration از بدن خارج می‌شوند، خاصیت سمی دارند و تحت عنوان Holothurin شناخته می‌شوند. ترکیبات Holothurin خاصیت کشندگی برای موجودات اطراف دارد و به نوعی یک مکانیسم دفاعی برای موجودات بی‌تحرک به شمار می‌رود تا بتوانند از خود دفاع کنند. مهم‌ترین ویژگی خیارهای دریایی، وجود حلقه‌های آهکی و حاوی کلسیم است که ناحیه دهانی را احاطه کرده است. این حلقه‌ها به عنوان تکیه‌گاه برای ماهیچه‌ها و تنتاکول‌های سطح دهانی و انتهای قدامی بدن محسوب می‌شوند. ویژگی دیگری که این رده را از بقیه خارپوستان متمایز می‌سازد، دارابودن حلقه‌ای از تنتاکول‌های دهانی است. این تنتاکول‌ها به اشکال مختلفی وجود دارند و در شناسایی و طبقه‌بندی خیارهای دریایی مورد استفاده قرار می‌گیرند. حضور پاهای لوله‌ای و تعداد گنادها و شکل حلقه آهکی و اسپیکول‌ها نیز طبقه‌بندی مورفولوژی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۴). بررسی‌های فیلوژنی مولکولی این رده، اغلب با استفاده از داده‌های ژنی 16s rRNA و 18s rRNA و 28s rRNA صورت می‌گیرد. در این تحقیق نیز فیلوژنی مولکولی، با استفاده از اطلاعات ژنی 18s rRNA بررسی شد.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری

نمونه‌برداری به روش پیمایش ساحل از سواحل بین جزر و مدی، با تاکید بر سواحل صخره‌ای واقع در ۸ ° ۲۹ ´ ۱۶ ° ۵۶ E و"۲۹ ´ ۵۶ ° ۲۶ N جزیره قشم انجام شد. در هر ایستگاه دو ترانسکت عمود بر دریا، با عرض ۳۰ متر و طول ۶۰-۳۰ متر (بر اساس میزان جزر)، و با فاصله تقریبی ۳۰۰ متر تعیین شده و علامت‌گذاری شدند. ۱۵ نمونه، از گونه *Holothuria arenicola* و ۱۵ نمونه از گونه *Holothuria parva* جمع‌آوری شد. پس از انجام نمونه‌برداری، نمونه‌ها در الکل ۹۶ ° تثبیت شده و به آزمایشگاه در تهران منتقل شد. در آزمایشگاه، تمامی نمونه‌ها در شرایط دمایی ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. قبل از انجام مراحل استخراج DNA، صفات ظاهری و ریخت‌شناسی نمونه‌ها جهت شناسایی اولیه مورد مطالعه قرار گرفت.

شناسایی مورفولوژی

قطعه کوچکی از دیواره بدن از سطوح پشتی و شکمی و پاهای لوله‌ای و تنتاکول‌ها جدا شد و به مدت نیم ساعت درون آب ژاول (NaOCl) غلیظ

قرار گرفت. سپس اسپیکول‌های استخراج شده با میکروسکوپ نوری بررسی شد.

استخراج DNA

استخراج DNA با استفاده از کیت Guanzho Dongsheng صورت گرفت. قطعه کوچکی از بافت دیواره ماهیچه‌ای بدن، برش داده شد و به وسیله نیتروژن مایع، به صورت پودر در آمد. سپس محلول Cell lysis و پروتئیناز K اضافه شد و در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. به منظور حذف پروتئین‌ها، محلول Protein precipitation اضافه شد. در مرحله بعد با اضافه کردن ایزوپروپانول، کلاف DNA مشاهده شد و با سانتریفیوژ، رسوب آن ته‌نشین شد. سپس مراحل شستشو با اتانول انجام شد و پس از حل کردن رسوب DNA در آب مقطر استریل، DNA استخراج شده به دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شد.

واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

DNA استخراج شده، در واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز مورد استفاده قرار گرفت. یک جفت پرایمر اختصاصی برگرفته از مقاله Lacey و همکاران (۲۰۰۵) سنتز شد (۵) و جهت تکثیر در واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز به کار گرفته شد. برنامه PCR به کار رفته جهت تکثیر قطعه موردنظر به این شرح است: $94^{\circ}C$ ۹۴ به مدت ۵ دقیقه (یک سیکل)، $94^{\circ}C$ ۹۴ به مدت ۳۰ ثانیه، $58^{\circ}C$ ۵۸ به مدت ۱ دقیقه، $72^{\circ}C$ ۷۲ به مدت ۳۰ ثانیه (۳۰ سیکل) و $72^{\circ}C$ ۷۲ به مدت ۵ دقیقه. محصولات PCR به دست آمده، به کمک الکتروفورز روی ژل آگارز بررسی گردید.

توالی‌یابی و تجزیه تحلیل فیلوژنی

با استفاده از اطلاعات ژنی 18s rRNA ارتباط فیلوژنی *H. arenicola* و *H. parva* با گونه‌های دیگر در نقاط مختلف دنیا بررسی شد. به علت زیادبودن طول قطعه تکثیر شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، یک جفت پرایمر داخلی جهت انجام عملیات توالی‌یابی سنتز گردید. عملیات توالی‌یابی توسط دستگاه ABI 3130XL به روش Dideoxy-Chain Termination انجام شد. سپس داده‌های به دست آمده با نرم افزار ClustalX2 مورد تجزیه و تحلیل فیلوژنی قرار گرفت.

نتایج

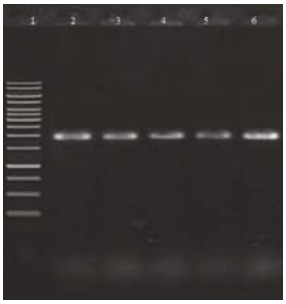
صفات ریخت شناسی

صفات ریخت‌شناسی در ۲ گونه‌ی مورد مطالعه، که شامل گونه *Holothuria arenicola* و *Holothuria parva* است، بررسی شد. در گونه *Holothuria arenicola*، بدن استوانه‌ای‌شکل و در انتها باریک و تنتاکول‌ها برگی‌شکل و نسبتا کوچک است. رنگ نمونه‌های زنده، خاکستری و سفید و دارای لکه‌های سیاه در سطح پشتی است.

Holothuria parva نیز گونه‌ای کوچک با بدنی دوکی‌شکل است که در انتها باریک می‌شود و دارای ۲۰ تنتاکول کوچک در دور دهان است. رنگ بدن در سطح پشتی، قهوه‌ای تیره و در ناحیه شکمی، روشن‌تر است.

بررسی‌های مولکولی

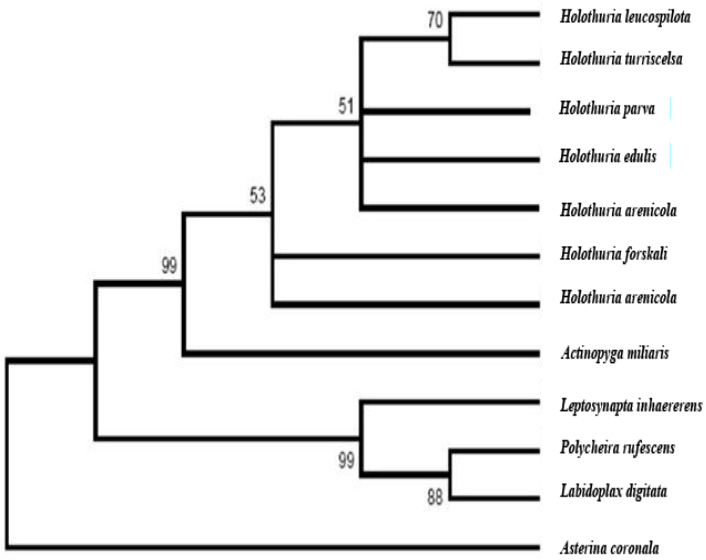
پس از انجام واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز برای هر یک از نمونه‌ها، قطعه‌ای با اندازه ۱۹۰۰ جفت باز تکثیر شد و روی ژل آگارز ۲ درصد مشاهده گردید (تصویر ۱).



تصویر ۱- چاهک ۱: سایز مارکر 1kb؛ چاهک ۴-۲: *Holothuria arenicola*؛ چاهک ۶-۵ : *Holothuria parva*.

توالی‌های حاصل از هر گونه، با توالی مرجع در بانک ژنی مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج نشان داد

گونـه *Holothria arenicola* دارای ۹۵ درصـد شباهت و هم‌پوشانی با خیارهای دریایی گزارش شده از همین‌گونه در نقاط دیگـر جهـان اسـت. در مـورد گونه *Holothuria parva* نیز بـه دلیـل ایـن کـه تاکنون گزارشی از این گونه در بانک ژنی ارائه نـشده اسـت. ایـن گونـه بیـشترین شـباهت را بـا گونـه *Holothuria edulis* ثبـت شـده در بانـک ژنـی نشان می‌دهد. تحقیق حاضـر، اولـین گـزارش از ایـن گونه را در بانک ژنی ارائه می‌دهد (تصویر ۲).



تصویر ۲- درخت Maximum Parsimony از ژنوتیپ‌های 18s rRNA گونه‌های *Holothuria arenicola* و *Holothuria parva* خیارهای دریایی، جزیره قشم.

بحث

در میـان اعـضای خـانواده *Holothuriidae*، جـنس *Holothuria* یکـی از فـراوان‌تـرین و متنوع‌ترین جنس‌هـا اسـت و بیـشترین تنـوع آن در آبسنگ‌های مرجانی مناطق گرمسیری و سواحل جزر و مدی است. تاکنون ۳۷ گونه از این جـنس از نقـاط مختلف جهان، در سایت NCBI گزارش شده اسـت. همچنـین، ۷ گونـه از جـنس *Holothuria*، بـا استفاده از صفات مورفولوژی از آب‌های خلیج فـارس شناسایی شده است.

بـا اسـتفاده از اطلاعـات ژنـی 18s rRNA، شناسایی و فیلوژنی ۶ گونه از *Holothuria* در آب-های اندونزی صورت گرفته اسـت (۶). همچنـین بـر اسـاس اطلاعـات ژنـی 16s rRNA کـه یـک ژن میتوکندریایی است، ۳ گونه خیار دریایی از آب‌هـای دریای سرخ، که شامل *Holothuria fuscogilva* و *Holothuria notabilis* و *Actinopyga mauritiana* معرفی شدند (۷).

بررسی صفات ریخت‌شناسی گونه *Holothuria arenicola* نشان داد، اسپیکول‌هـای فـرم button دارای منافـذی هـستند کـه بزرگتـر از فـرم معمـول تعریف‌شده برای این گونه است. دانشمندان با اذعـان به تفاوت‌ها، وجود گونه *Holothuria arenicola* را تایید کردند، ولی متذکر شدند کـه نمونـه‌هـایی از این گونه وجود دارند که هنوز شناسایی نشده اسـت. نتایج حاصل از توالی‌یابی نیز تفـاوت در چنـدین بـاز آلی را بـین *Holothuria arenicola* موجـود در سواحل ایرانی با توالی‌های ثبت شده از این گونـه در بانک ژنی نشان داد. در نتیجه، نمونه موجود در خلیج فارس می‌تواند گونه بومی خلیج فارس باشد؛ چرا کـه خلیج فارس به دلیل نیمه بسته بودن و قـرار گـرفتن در عـرض‌هـای جغرافیـایی نیمـه گرمـسیری، دارای شـرایط محیطـی خاصـی اسـت و شـرایط محیطـی محدود کننده، باعث افزایش گونه‌زایی و ایجاد گونـه-های بومی می‌شـود. ایـن موضـوع بـه دلیـل شـرایط فیزیکی تنش زا و ویژه خلیج فارس (نوسانات حرارتی

و شوری بالا) دور از انتظار نیست (۸). همچنین عمق کم و کدورت آب در خلیج فارس باعث کاهش گسترش مرجان‌ها در آن شده است و این موضوع بر تنوع خارپوستان خلیج فارس بی‌تاثیر نیست. Price در مقایسه شباهت گونه‌های خارپوست خلیج فارس با نواحی اطراف آن، دریای سرخ را شبیه‌ترین ناحیه به خلیج فارس از لحاظ نوع گونه‌ها، با ۴۴ درصد شباهت می‌داند. علت این شباهت را می‌توان در این دانست که دریای سرخ و خلیج فارس هر دو دارای شرایط تنش‌زا هستند و دریای سرخ نیز همانند خلیج فارس، دارای شوری بالایی است (۸).

نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد با توجه به شرایط ویژه و خاص خلیج فارس، امکان وجود گونه‌های بومی، دور از انتظار نیست. لذا شناسایی مولکولی خارپوستان خلیج فارس، امری بسیار مهم و ضروری است.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مسئولین محترم دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران به‌واسطهٔ تامین تجهیزات لازم برای انجام این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع مورد استفاده

۱. ایزدی، س.۱۳۸۷. شناسایی و بررسی تغییرات زمانی تنوع گونه‌ای خارپوستان در مناطق بین جزر و مدی سواحل جنوبی جزیره قشم، خلیج فارس. پایان نامه کارشناسی ارشد زیست‌شناسی دریا، دانشگاه شهید بهشتی. ص ۸۲.

۲. کورانلو، ن. ۱۳۸۷. شناسایی انواع مختلف شاخه خارپوستان در سواحل خلیج فارس (قشم و بندر لنگه). پایان نامه کارشناسی ارشد بیولوژی ماهیان دریا دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران. ص ۷۵.

3. Kerr, A. M., Kim, J., 2000. Phylogeny of Holothuroidea (Echinodermata) inferred from morphology. Journal of the Linnean Society.133: 63-81.
4. Brusca R. C., Brusca, G. J., 2003. Invertebrates. 2nd edition, Sinauer Associates, Inc. p. 801-837.
5. Kotpal, L., 2003. Zoology phylum-8, Echinodermata, 5th edition, Rastogi publications. p. 219.
6. Pawson, D. L., 2007. Phylum Echinodermata. Zootaxa 1668: 749-764.
7. Lacey, K. M. J., McCormack, G. P., Keegan, B. F., Powell, R., 2005. Phylogenetic relationships within the class Holothuroidea, inferred from 18S rRNA gene data. Marine Biology- Research Article.
8. Naggar, A., Ashaat, N., Belbasi, H., 2008. Molecular phylogeny of Egyptian sea cucumber as predicted from 16s mitochondrial rRNA gene sequence. World Applied Sciences Journal 52: 531-542.