وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور - پژوهشکده میگوی کشور

عنوان:

بررسی رابطه فایلوژنی و ساختار جمعیتی ۲ گونه
(*Holothuria parva* و *Holothuria arenicola*)
از خیار دریایی در خلیج فارس و دریای عمان
با استفاده از نشانگرهای mtDNA، CO1

مجری:
محمدخلیل پذیر

شماره ثبت
۵۸۲۷۳

وزارت جهاد کشاورزی

سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- پژوهشکده میگوی کشور

عنوان طرح/پروژه: بررسی رابطه فایلوژنی و ساختار جمعیتی ۲ گونه (*Holothuria parva, Holothuria arenicola*) از خیار دریایی در خلیج فارس و دریای عمان با استفاده از نشانگرهای mtDNA،CO1

کد مصوب: ۱۴۸-۱۲-۱۲-۹۵۵۱-۹۵۰۰۳-۹۴۰۱K

نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان: محمد خلیل پذیر

نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) : -

نام و نام خانوادگی مجری: محمد خلیل پذیر

نام و نام خانوادگی همکار(ان): سهراب رضوانی گیل کلایی، اشکان اژدهاکش‌پور، نصیر نیامیمندی، مهرداد حسینی شبانکاره، سعید تمدنی جهرمی، محمد علی نظاری، فرخ انصاری، رقیه صفری، مرجان مسافر، غلامعباس زرشناس

نام و نام خانوادگی مشاور(ان): تورج ولی نسب پوری

نام و نام خانوادگی ناظر(ان): -

محل اجرا: استان بوشهر

تاریخ شروع: ۱۳۹۵/۰۱/۰۱

مدت اجرا: ۲ سال

ناشر: موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

تاریخ انتشار: سال ۱۳۹۹

حق چاپ برای مؤلف محفوظ است . نقل مطالب ، تصاویر ، جداول ، منحنی ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است .

«سوابق طرح یا پروژه و مجری مسئول / مجری»

طرح/پروژه: بررسی رابطه فایلوژنی و ساختار جمعیتی ۲ گونه (*Holothuria parva, Holothuria arenicola*) از خیار دریایی در خلیج فارس و دریای عمان با استفاده از نشانگرهای CO1،mtDNA

کد مصوب : ۹۴۰۱K-۹۵۰۰۳-۹۵۵۱-۱۲-۱۲-۱۴۸

شماره ثبت (فروست) : ۵۸۲۷۳ تاریخ : ۱۳۹۹/۷/۱۷

با مسئولیت اجرایی جناب آقای محمد خلیل پذیر دارای مدرک تحصیلی دکتری در رشته بهداشت و بیماری‌های آبزیان می‌باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش زیست‌فناوری و فرآوری آبزیان در تاریخ ۱۳۹۹/۶/۲۳ مورد ارزیابی و با رتبه عالی تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد □ پژوهشکده ■ مرکز □ ایستگاه □

با سمت عضو هیئت علمی در پژوهشکده میگوی کشور مشغول بوده است.

عنوان	«فهرست مندرجات»	صفحه

چکیده ۱
۱- مقدمه ۲
۲- مواد و روش کار ۷
۲-۱- نمونه‌برداری از خیارهای دریایی ۷
۲-۲- تعیین جنس و گونه خیار دریایی بر اساس شاخص‌های مورفولوژیک ۹
۲-۳- استخراج ماده ژنتیکی DNA ۱۰
۲-۴- تعیین کیفیت و کمیت ماده ژنتیکی استخراج شده ۱۰
۲-۵- تعیین تفاوت‌های ژنتیکی خیارهای دریایی نمونه‌گیری شده از مناطق مختلف ۱۱
۲-۵-۱- تکثیر ناحیه 16S rRNA، DNA میتوکندریایی ۱۱
۲-۶- بهینه سازی آغازگر واکنش PCR ۱۱
۲-۶-۱- بهینه سازی آغازگر منطقه 16S rRNA میتوکندریال ۱۱
۲-۷- تکثیر مناطق 16S rRNA میتوکندریال ۱۲
۲-۸- ارزیابی کیفیت محصولات PCR حاصل از آغازگر 16S rRNA و COI میتوکندریال ۱۳
۲-۹- توالی یابی محصولات PCR ۱۴
۲-۱۰- بازسازی توالی‌های هر نمونه ۱۴
۲-۱۱- آنالیز فیلوژنتیک توالی‌ها با استفاده از نرم افزارها ۱۵
۲-۱۲- تجزیه و تحلیل داده‌های بدست آمده ۱۶
۳- نتایج ۱۷
۳-۱- نتایج تعیین توالی منطقه 16S rRNA، DNA میتوکندریال ۱۷
۳-۱-۱- نتایج تعیین توالی نمونه‌های اخذ شده از استان‌های مختلف ۱۷
۳-۲- گونه‌های شناسایی شده در استان‌های مختلف ۱۸
۳-۳- مقایسه اولیه توالی‌های منطقه 16S rRNA، DNA میتوکندریال با سایر توالی‌های مشابه ۱۹
۳-۳-۱- مقایسه توالی‌های بدست آمده از استان بوشهر با سایر توالی‌های مشابه ۱۹
۳-۳-۲- مقایسه توالی‌های بدست آمده از استان هرمزگان با سایر توالی‌های مشابه ۲۰
۳-۳-۳- مقایسه اولیه توالی‌های بدست آمده از استان سیستان و بلوچستان با سایر توالی‌های مشابه ۲۱
۳-۴- بررسی میزان همپوشانی و همسانی گونه *H. parva* شناسایی شده در مناطق مختلف ۲۳

۱-۴-۳- بررسی میزان همپوشانی و همسانی گونه *H. arenicola* شناسایی شده در مناطق مختلف..... ۲۷
۲-۴-۳- بررسی میزان همپوشانی و همسانی گونه *H. leucospilota* شناسایی شده در مناطق مختلف ۲۸
۳-۵- همردیفی توالی‌های ناحیه 16S rRNA خیارهای دریایی گونه‌های مختلف..... ۲۸
۳-۶- ترکیب نوکلئوتیدی حاصله از همردیفی توالی‌های ناحیه 16S rRNA گونه‌های مختلف خیاردریایی ۲۹
۳-۷- تخمین MCL الگوی جانشینی نوکلئوتیدی برای بازها گونه‌های مختلف خیاردریایی ۳۰
۳-۸- شاخص‌های ژنتیکی جمعیت‌های مختلف خیار دریایی گونه H.parva..... ۳۳
۳-۹- تخمین MCL الگوی جانشینی نوکلئوتیدی برای بازها خیاردریایی گونه *H. parva* مناطق مختلف ۳۴
۳-۱۰- ماتریکس فاصله ژنتیکی هاپلوتیپ‌های جمعیت‌های مختلف خیار دریایی گونه *H. parva* در مناطق مختلف ۳۴
۳-۱۱- آنالیز فیلوژنتیک توالی 16S rRNA میتوکندریال جمعیت‌های مختلف خیار دریایی گونه *H. parva*..... ۳۵
۳-۱۲- میزان تمایز ژنی جمعیت‌های مختلف خیارهای دریایی *H. parva* در مناطق مختلف ۳۶
۳-۱۳- مقایسه ماتریکس فاصله ژنتیکی هاپلوتایپ‌های جمعیت‌های مختلف خیاردریایی گونه *H. parva* در مناطق مختلف با توالی‌های بدست آمده از بانک جهانی ژن (NCBI)..... ۳۷
۳-۱۴- آنالیز فیلوژنتیک توالی 16S rRNA میتوکندریال جمعیت‌های مختلف خیار دریایی گونه H. parva با توالی‌های ثبت شده در NCBI..... ۳۸
۳-۱۵- شاخص‌های ژنتیکی جمعیت‌های مختلف خیار دریایی گونه *H. arenicola* جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ۳۹
۳-۱۶- فراوانی هاپلوتایپ‌های شناسایی شده در جمعیت‌های مختلف خیارهای دریایی گونه *H. arenicola*..... ۴۰
۳-۱۷- ماتریکس فاصله ژنتیکی هاپلوتیپ‌های مربوط به جمعیت‌های مختلف خیارهای دریایی گونه *H. arenicola* جمع آوری شده از سواحل بندر لنگه و جزیره قشم..... ۴۰
۳-۱۸- آنالیز فیلوژنتیک توالی 16S rRNA میتوکندریال جمعیت‌های خیار دریایی گونه *H. arenicola* بندر لنگه و جزیره قشم..... ۴۱
۳-۱۹- میزان تمایز ژنی، جریان ژنی و نرخ واگرائی جمعیت‌های مختلف خیار دریایی گونه *H. arenicola* در مناطق مختلف..... ۴۲

۳-۲۰- مقایسه ماتریکس فاصله ژنتیکی جمعیت‌های مختلف خیار دریایی گونه *H. arenicola* جزیره قشم و بندر لنگه با توالی‌های ثبت شده در NCBI ۴۳
۳-۲۱- آنالیز فیلوژنتیک توالی 16S rRNA میتوکندریال خیار دریایی گونه *H. arenicola* از بندر عباس و بندر لنگه با توالی‌های ثبت شده در NCBI ۴۳
۳-۲۲- شاخص‌های ژنتیکی خیار دریایی گونه *Stichopus herrmanni* جمع‌آوری شده از خلیج چابهار ۴۴
۳-۲۳- فراوانی هاپلوتایپ‌های شناسایی شده در خیار دریایی گونه *Stichopus herrmanni* در خلیج چابهار ۴۵
۳-۲۴- ماتریکس فاصله ژنتیکی خیار دریایی *S. herrmanni* خلیج چابهار ۴۵
۳-۲۵- آنالیز فیلوژنتیک توالی 16S rRNA میتوکندریال خیار دریایی گونه *S. herrmanni* خلیج چابهار ۴۵
۳-۲۶- ماتریکس فاصله ژنتیکی خیار دریایی گونه *S. herrmanni* خلیج چابهار با توالی‌های ثبت شده در NCBI ۴۶
۳-۲۷- آنالیز فیلوژنتیک توالی 16S rRNA میتوکندریال خیار دریایی گونه *S. herrmanni* خلیج چابهار با توالی‌های ثبت شده در NCBI ۴۷
۳-۲۸- شاخص‌های ژنتیکی خیار دریایی گونه *H. leucospilota* جمع‌آوری شده از جزیره لارک و خلیج چابهار ۴۷
۳-۲۹- فراوانی هاپلوتایپ‌های شناسایی شده در جمعیت‌های مختلف خیارهای دریایی *H. leucospilota* جزیره لارک و خلیج چابهار ۴۸
۳-۳۰- ماتریکس فاصله ژنتیکی خیار دریایی *H. leucospilota* جزیره لارک و خلیج چابهار ۴۹
۳-۳۱- میزان تمایز ژنی، جریان ژنی و نرخ واگرائی جمعیت‌های مختلف خیار دریایی گونه *H. leucospilota* در مناطق مختلف ۴۹
۳-۳۲- آنالیز فیلوژنتیک توالی 16S rRNA میتوکندریال خیار دریایی گونه *H. leucospilota* جزیره لارک و خلیج چابهار ۴۹
۳-۳۳- ماتریکس فاصله ژنتیکی خیار دریایی گونه *H. leucospilota* جزیره لارک و خلیج چابهار با توالی‌های ثبت شده در NCBI ۵۱
۳-۳۴- آنالیز فیلوژنتیک توالی 16S rRNA میتوکندریال خیار دریایی گونه *H. leucospilota* جزیره لارک و خلیج چابهار با توالی‌های ثبت شده در NCBI ۵۱
۳-۳۵- شاخص‌های ژنتیکی خیار دریایی گونه *H. scabra* جمع‌آوری شده از خلیج چابهار ۵۲

۳-۳۶- مقایسه ماتریکس فاصله ژنتیکی خیار دریایی گونه *H. scabra* خلیج چابهار با توالی‌های ثبت شده در NCBI ۵۳
۳-۳۷- مقایسه آنالیز فیلوژنتیک توالی 16S rRNA میتوکندریال خیار دریایی گونه *H. scabra* خلیج چابهار با توالی‌های ثبت شده در NCBI ۵۳
۳-۳۸- شاخص‌های ژنتیکی خیارهای دریایی گونه *H. pardalis* جمع‌آوری شده از خلیج چابهار ۵۴
۳-۳۹- فراوانی هاپلوتایپ‌های شناسایی شده در خیارهای دریایی گونه *H. pardalis* در خلیج چابهار ۵۵
۳-۴۰- مقایسه ماتریکس فاصله ژنتیکی خیارهای دریایی گونه *H. pardali* خلیج چابهار با توالی‌های ثبت شده در NCBI ۵۵
۳-۴۱- آنالیز فیلوژنتیک توالی 16S rRNA میتوکندریال خیار دریایی گونه *H. pardali* بندر چابهار با توالی‌های ثبت شده در NCBI ۵۵
۴- بحث ۵۷
۵- نتیجه گیری ۶۳
منابع ۶۴
چکیده انگلیسی ۶۶

چکیده

در این تحقیق رابطه فایلوژنی و ساختار جمعیتی گونه‌های مختلف خیار دریایی در مناطق مختلف سه استان ساحلی بوشهر، هرمزگان و سیستان و بلوچستان از طریق روش توالی یابی ژن *16S rRNA* مورد بررسی قرار گرفت. پس از نمونه‌برداری از ایستگاه‌های بندر بوشهر، دیر، بستانه، لنگه، جزیره لارک، جزیره قشم و خلیج چابهار، استخراج *DNA* با استفاده از بافر *Lysis* انجام گرفت. پس از تکثیر ژن مربوطه با استفاده از دستگاه ترموسایکلر، محصول *PCR* بدست آمده توالی یابی گردید. نتایج حاصل از بر هم نهی‌های موضعی حاکی از شناسایی گونه *Holothuria parva* در سواحل بندر بوشهر، دیر و لنگه، *H. arenicola* در سواحل بندر بستانه و جزیره قشم، *H. leucospilota* در سواحل جزیره لارک و خلیج چابهار و در نهایت گونه‌های *S. herrmanni*، *H. pardalis* و *H. scabra* در خلیج چابهار بود. با توجه به اینکه در درخت‌های تبارزایشی ترسیم شده، فواصل ژنتیکی به دست آمده در گونه‌های *H. parva* و *H. arenicola* نمایانگر جمعیت‌های مجزا نبود، این احتمال وجود دارد که نمونه‌های مربوط به گونه‌های *H. parva* جمع آوری شده از بندر بوشهر، بندر دیر و بندر لنگه و گونه *H. arenicola* جمع آوری شده از بندر لنگه و جزیره قشم به دلیل جریان ژنی بالا و وجود هاپلوتایپ مشترک از یک جمعیت یکسان باشند. درحالیکه در رابطه با *H. leucospilota* به دلیل وجود هاپلوتیپ‌های مجزا و عدم وجود هاپلوتیپ مشترک نتایج دال بر وجود دو جمعیت متفاوت بود.

کلمات کلیدی: خیار دریایی، خلیج فارس، دریای عمان، فایلوژنی، 16srRNA