

جداسازی و شناسایی سیست *Dunaliella salina* (Chlorophyceae) از رسوبات

ساحلی لیپار (دریای عمان) با استفاده از آنالیز مولکولی

گیلان عطاران فریمان^{۱*}، پروین صادقی^۱، رقیه شیرزایی^۱

*gilan.attaran@gmail.com

۱-دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار

تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۹۶

تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۹۵

چکیده

برخی از گونه‌های فیتوپلانکتون در شرایط نامساعد و در چرخه زندگی تولیدمثلی خود سیست تولید کرده که در رسوبات کف ته‌نشین می‌شوند و تحت شرایط مساعد مجدداً شکوفا شده و به ستون آب برمی‌گردند. بمنظور شناسایی دقیق مورفولوژی، گونه‌های فیتوپلانکتون در دو مرحله سیست و متحرک بررسی گردیدند زیرا برخی از سیست‌های مشابه به فیتوپلانکتون متفاوتی تبدیل می‌شوند. هدف از این تحقیق، کشت سیست‌های موجود در رسوبات خلیج چابهار منطقه لیپار و شناسایی نمونه‌های شکوفا شده می‌باشد. رسوبات از منطقه لیپار در سال ۱۳۹۴ توسط Ekman Grab با سطح جمع‌کنندگی ۲۲۵ سانتی‌متر مربع جمع‌آوری گردید. سیست زنده گرد ناشناخته بصورت انفرادی از رسوبات جداسازی شد و در فایکولب در شرایط کاملاً استریل بصورت جداگانه تحت شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در درجه حرارت $25 \pm 1^\circ\text{C}$ در محیط کشت F_2 ، کشت داده شدند. بررسی مورفولوژی گونه شکوفا شده نشان داد که سیست جدا شده متعلق به گونه *Dunaliella salina* می‌باشد. جهت تأیید شناسایی استرین خالص حاصل از کشت سیست موردنظر، استخراج DNA و سپس واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس (PCR) انجام گردید. توالی ژنی گونه *D. salina* با توالی ژنی گونه‌های مشابه از بانک ژن مقایسه گردید. بررسی مولکولی و فیلوژنی گونه نشان داد که گونه شکوفا شده از نظر توالی نوکلئوتیدی بیشترین شباهت را با گونه *D. salina* دارد. همچنین، این مطالعه نشان داد که گونه *D. salina* از سواحل جنوب ایران توانایی تولید سیست را دارد.

کلمات کلیدی: *Dunaliella salina*، سیست، فیلوژنی، رسوبات، سواحل جنوب ایران

* نویسنده مسئول

مقدمه

بسیاری از گونه‌های فیتوپلانکتون در چرخه تولیدمثل جنسی و تحت شرایط نامساعد زیست محیطی تولید سیست کرده و در رسوبات بستر ته‌نشین می‌شوند. ارزیابی تنوع و پراکنش سیست آن‌ها در مطالعات زیست محیطی بسیار مهم است زیرا سیست‌ها در بستر دریا مانند بذری هستند که می‌توانند با شکوفا شدن سبب ایجاد کنند سرخ شوند (عطاران فریمان و همکاران، ۱۳۹۴). بیشتر مطالعات در ایران در دریای عمان انجام شده است. منطقه لیبیا از جمله مناطقی در سواحل غربی دریای عمان می‌باشد که دارای تنوع و فراوانی بالای سیست فیتوپلانکتون می‌باشد (آسکانی، ۱۳۹۴). شناسایی گونه‌ها تنها با تکیه بر مورفولوژی بسیار دشوار می‌باشد ولی امروزه آنالیز مولکولی دیدگاه تازه‌ای را در بررسی‌های طبقه‌بندی و تکاملی پیش روی ما قرار داده است (Alverson, 2008). عطاران فریمان و همکاران، (۱۳۹۲). *Dunaliella* یک ریز جلبک سبز مقاوم به شوری است که کاربردهای تجاری متعددی نظیر تولید بتاکاروتن دارد. شناسایی گونه‌های مختلف *Dunaliella* بر اساس مطالعات مورفوفیزیولوژیکی و اخیراً مطالعات مولکولی صورت گرفته است (Hosseinzadeh et al., 2012). از مقایسه توالی‌های ژنی ناحیه 28SrRNA به منظور آنالیزهای مولکولی و رسم درخت فیلوژنی استفاده می‌گردد (Baroin et al., 1988). آنالیزهای فیلوژنی انجام گرفته بر روی منطقه 18SrDNA گونه *D. salina* جدا شده از دریاچه گاوخونی در ایران نشان داد که این گونه از نظر توالی ژنی رابطه نزدیکی با توالی ژنی ثبت شده در بانک ژن متعلق به گونه‌های *Dunaliella* به‌استثنای گونه *D. viridis* دارد (Hosseinzadeh et al., 2012). همچنین بررسی مورفولوژی گونه جدا شده از دریاچه مهارلو در شیراز و انجام آنالیزهای فیلوژنی منطقه ITS (ITS-1+5.8) و (ITS-2+rDNA) نشان داد که متعلق به گونه *Dunaliella salina* می‌باشد (زمانی و مراد شاهی، ۱۳۸۸). *D. salina* اولین بار توسط Dunal (1938) در آب‌های ساحلی فرانسه توصیف شد اما تا سال ۱۹۰۵ به این نام شناخته نشده بود. بعدها توسط Teodoresco نام کاشف آن نامگذاری شد (Polle et al., 2009; Pick, 2009).

(Oren, 2005; 1998). اخیراً ۲۳ گونه برای *Dunaliella* به رسمیت شناخته شده است (Lamers et al., 2010). *D. salina* گونه‌ای متعلق به شاخه Chlorophyta متمایل به رنگ زرد یا نارنجی می‌باشد که در پاسخ به تنش‌های محیطی از جمله نور زیاد، شوری زیاد و کمبود مواد مغذی کاروتنوئید تولید می‌کند (Teodoresco, 1906; Lamers et al., 2010). سیست جلبک سبز تک سلولی *D. salina* پاسخی است به تنش‌های محیطی و برای چندین دهه مورد بررسی قرار گرفته است. (Ramos et al., 2011). دما، شوری و مواد مغذی از جمله فاکتورهای کنترل کننده رشد و نمو این گونه می‌باشند (Poll et al., 2009). تغییرات شدید آب و هوایی، بویژه در سال‌های اخیر زمینه‌ای برای شکوفایی جلبک‌های مضر در سراسر دنیا می‌باشد (محسنی زاده و همکاران، ۱۳۹۲). اعضای این گروه تنها یوکاریوت‌های فتوسنتز کننده هستند که در دامنه‌های مختلف شوری رشد می‌کنند (Liska et al., 2004). سیست این گونه نیز نمک دوست بوده و می‌تواند شوری با رنج ppt ۴۱ تا ۱۵۰ را تحمل کند (Rahaman, 2006). گونه *D. salina* به دلیل تولید بتاکاروتن، مواد غذایی و سوخت‌های زیستی از نظر بیوتکنولوژی اهمیت جهانی دارد (Tran et al., 2013). در واقع این گونه شامل رنگدانه بتاکاروتن و اسیدهای حلال محرک ایمنی بدن مانند فیکوسیانین می‌باشد (Qureshi & Ali, 1996). سلول‌های این گونه ۴-۱۵ میکرومتر عرض و ۶-۲۵ میکرومتر طول دارند (Butcher et al., 1959). این مشخصات بستگی دارد به اینکه در چه مرحله‌ای از رشد و نمو باشند (Gibbs & Duffus, 1976). این گونه در چرخه زندگی خود دارای یک مرحله زیگوت یا تخم Zygosporos است. توصیفاتی که از مرحله تخم شده است، نشان می‌دهد که این مرحله شکل واضح مرحله سیست می‌باشد (Oren et al., 2005) آنالیزهای مولکولی انجام شده توسط Tran و همکارانش در سال ۲۰۱۳ حاکی از شباهت بسیار زیاد دو گونه *D. salina* و *D. bardawil* می‌باشد. (Tran et al., 2013). در این تحقیق به بررسی رابطه سیست و حالت پلانکتونی گونه ناشناخته سیست جدا شده از رسوبات

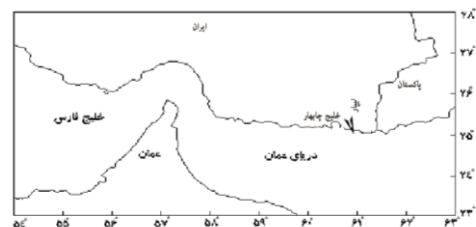
منطقه لیپار از طریق کشت سیست در شرایط آزمایشگاهی و شناسایی مولکولی گونه شکوفا شده پرداخته شده است. هدف از این مطالعه ایجاد شرایط آزمایشگاهی مناسب جهت شکوفا شدن سیست کشت داده شده و شناسایی سلول شکوفا شده بر پایه اطلاعات مورفولوژی و فیلوژنی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

منطقه لیپار در فاصله ۱۶ کیلومتری غرب بندر چابهار واقع شده است. اغلب قسمتی از آب سواحل این منطقه به دلیل حضور گونه‌های جنس *Dunaliella* قرمز رنگ می‌باشد. پنج نمونه رسوب از ایستگاهی (شکل ۱) با موقعیت طول (۲۵°۱۳'۱۵"N) و عرض جغرافیایی (۶۰°۴۹'۴۷"E) از عمق ۲۰ متری با بستر شنی گلی توسط نمونه بردار Ekman Grab با سطح جمع‌کنندگی ۰/۲۲۵ مترمربع در پاییز سال ۱۳۹۴ جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها در قوطی‌های مناسب برای انجام عملیات آزمایشگاهی به آزمایشگاه انتقال داده شدند و در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند.

TF100) با میکروپیپت انجام گردید. سیست‌های ناشناخته در اشکال مختلف از نمونه رسوب جدا شد و در پتری دیش حاوی محیط کشت F₂ قرار گرفتند. تعدادی از پتری دیش‌ها جهت نگهداری در اتاق فایکولب قرار داده شدند. برنامه اتاق فایکولب بر اساس ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، نور ۲۰۰۰ لوکس، درجه حرارت ۱۳±۲۵°C و رطوبت ۲۵٪ تنظیم گردید (Attaran Fariman, 2007). بررسی ریخت‌شناسی نمونه‌های سیست شکوفا شده توسط میکروسکوپ اینورت مجهز به دوربین انجام گردید. سلول شکوفا شده به منظور انبوه‌سازی به ارلن ۱۰۰ سی‌سی منتقل گردید و مجدداً به آن محیط کشت اضافه شد و در همان شرایط قبل به مدت چند روز تا چند هفته بر اساس طول عمر نمونه و سرعت تولیدمثل نگهداری گردید. استخراج DNA سلول شکوفا شده به روش CTAB تغییر یافته (۱۳۹۰، زاده عباس شاه آبادی Attaran Fariman & Javid., 2011) انجام پذیرفت. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به وسیله الکتروفورز سنجیده شد. از بافر TBE و ژل آگارز ۱/۵ درصد در الکتروفورز نمونه استفاده گردید. جهت رنگ‌آمیزی ژل از اتیدیوم بروماید استفاده شد. بسط و توسعه منطقه LSU-rDNA ژنوم به‌وسیله آغازگرهای D1R-F و D2C-R انجام گرفت. برای انجام واکنش زنجیره پلیمرز (PCR) محصول DNA به منظور جداسازی دو رشته (Denaturation) به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و در سه چرخش دمایی دیگر از این زمان‌ها پیروی گردید؛ یک دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، یک دقیقه در ۴۵ درجه سانتی‌گراد، یک دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد که این سه چرخه ۳۵ بار تکرار و مرحله آخر توسعه ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد تنظیم گردید. محصول PCR به‌وسیله ژل آگارز در الکتروفورز تعیین کیفیت گردید. بعد از خالص‌سازی به کشور کره جنوبی جهت تعیین توالی ارسال گردید. ویرایش توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار BioEdite انجام گرفت. میزان شباهت توالی نوکلئوتیدی گونه مورد نظر با گونه‌های موجود در بانک ژن مقایسه شد. از نرم افزارهای Clustalw, Mega5 و BioEdite برای انجام آنالیزهای مولکولی و ترسیم درخت فیلوژنی استفاده

در آزمایشگاه حدود ۲-۳ گرم از رسوب با آب فیلتر شده دریا مخلوط گردید. سپس دو دقیقه سونیکیت در دستگاه سونیکاتور مدل Sc1۹۰۰d انجام شد. مخلوط رسوب و آب دریا از الک‌های ۲۰-۱۲۵ میکرومتر گذرانده شد. رسوب باقی مانده در الک توسط آب دریا شسته و در پلیت تمیز و استریل ریخته شد (Anderson & Wall, 1978; Attaran Fariman, 2007). جداسازی انفرادی نمونه سیست رسوبات زیر میکروسکوپ اینورت (Nikon-



شکل ۱: موقعیت جغرافیایی ایستگاه نمونه برداری در منطقه لیپار-دریای عمان (سال ۱۳۹۴)

Figure 1: Geographical position of sampling stations in Lipar-Oman Sea (2015)

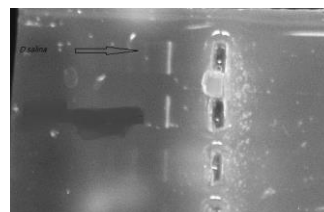
در آزمایشگاه حدود ۲-۳ گرم از رسوب با آب فیلتر شده دریا مخلوط گردید. سپس دو دقیقه سونیکیت در دستگاه سونیکاتور مدل Sc1۹۰۰d انجام شد. مخلوط رسوب و آب دریا از الک‌های ۲۰-۱۲۵ میکرومتر گذرانده شد. رسوب باقی مانده در الک توسط آب دریا شسته و در پلیت تمیز و استریل ریخته شد (Anderson & Wall, 1978; Attaran Fariman, 2007). جداسازی انفرادی نمونه سیست رسوبات زیر میکروسکوپ اینورت (Nikon-

با نام $CHCDS_2$ نام‌گذاری شد. سیست این گونه دارای پوشش بی‌رنگ بوده، محتویات آن حالت پیچ خورده دارد و به رنگ قهوه‌ای یا قرمز می‌باشد (شکل ۳A). باگذشت سه ماه از کشت سیست، سلول‌های سبز بیضی درون پتری دیش ظاهر شدند. این سلول‌ها دارای پوششی شفاف بودند. در برخی از آن‌ها محتویات سبزرنگ به سلول‌های کوچک و کروی تقسیم‌شده بود که بصورت منظم در کنار یکدیگر قرار گرفته بودند سپس سلول‌های کوچک، کروی و سبزرنگ بصورت شناور در پتری دیش پدیدار شدند (شکل ۳B). سرانجام این سلول‌های شناور پس از یک ماه در همان شرایط قبلی به سلول‌های تاژک‌دار متحرک تبدیل شدند که به رنگ سبز طلایی بوده، پهنای آن‌ها ۱۲-۴ میکرومتر و طول آن‌ها ۲۴-۶ میکرومتر می‌باشد. قسمت سر آن‌ها باریک بوده ولی انتهای بدن پهن تر می‌باشد. سلول شکوفا شده گلابی شکل می‌باشد. این گونه دارای یک کلروپلاست جامی شکل بوده که نیمی از فضای داخلی سلول را در بر گرفته است و دو تاژک بلند از قسمت رأس بدن به سمت بیرون کشیده شده است. تاژک‌ها از خود سلول کشیده‌تر می‌باشند و این گونه فاقد شیار جانبی می‌باشد (شکل C-D ۳). سلول شکوفا شده نیز از نظر ریخت شناسی بیشترین شباهت را به گونه *D. salina* دارد.

گردید. در رسم درخت فیلوژنی گونه *Scripsiella* به- عنوان گونه خارجی جهت ریشه دادن به درخت در نظر گرفته شد.

نتایج

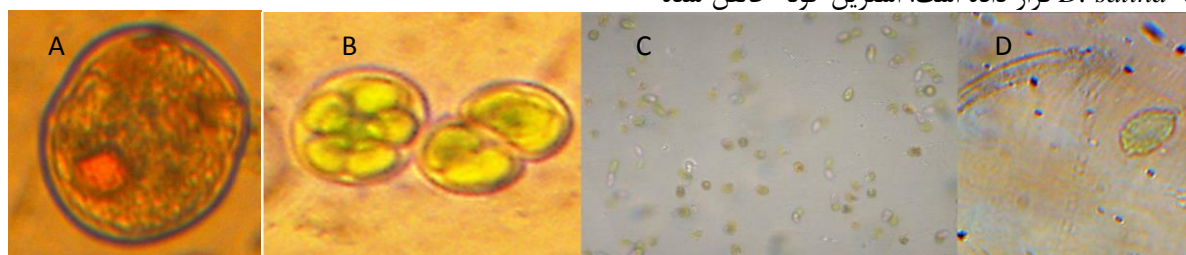
بررسی کمیت و کیفیت DNA با استفاده از ژل آگار یک ونیم درصد انجام شد و محصولات از نظر میزان غلظت DNA و آلودگی وضوح باندها مورد بررسی قرار گرفتند. از آنجایی که مواد پروتئینی فاقد بار می‌باشند، حضور آن‌ها در DNA استخراج شده بصورت باندهایی درون چاهک بر روی ژل آگار مشاهده خواهد شد. بررسی‌های انجام‌شده نشان داد که DNA مربوط به گونه *D. salina* دارای کیفیت و کمیت عالی و فاقد مواد پروتئینی می‌باشد (شکل ۲).



شکل ۲: الکتروفورز DNA سلول شکوفا شده *Dunaliella salina*

Figure 2: DNA Electrophoresis of *Dunaliella salina* germinated cell

بررسی خصوصیات مورفولوژی نمونه شکوفا شده، آن را در گونه *D. salina* قرار داده است. استرین گونه خالص شده



شکل ۳: A) سیست *D. salina* جداسازی شده از رسوبات لیپار در سال ۱۳۹۴ (بزرگنمایی $\times 100$)، B) مرحله غیر متحرک اپلانسپور (بزرگنمایی $\times 100$)، C-D) سلول شکوفا شده متحرک *D. salina* حاصل از کشت انفرادی سیست (بزرگنمایی $\times 20$ و $\times 100$)

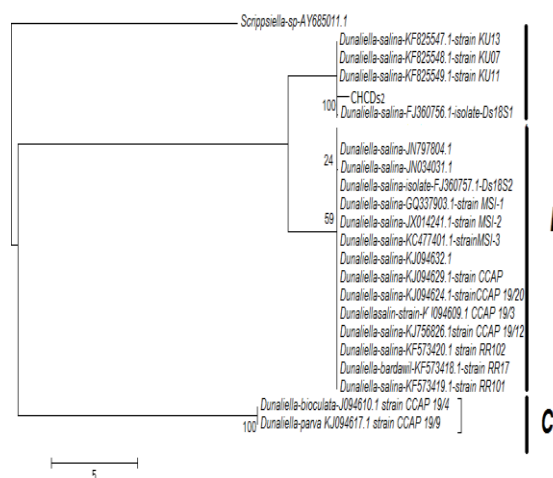
Figure 3: *D. salina* isolated from Lipar sediment in 2015, B) non-motile aplanospore stage, C-D) germinated motile cell of *D. salina* from culture of single cyst

89% شباهت توالی ژنی در گروه *D. salina* قرار داده می‌شود. گونه‌هایی که توالی ژنی آن‌ها در منطقه S ۲۸ LSU-rRNA مشابه فیتوپلانکتون شکوفا شده می‌باشد با شماره ثبت آن‌ها در بانک ژن در درخت فیلوژنی استفاده

توالی‌های ژنی ابتدا توسط برنامه BioEdit و ویرایش گردید و بعد از ساختن Consensus در برنامه BLAST قرار داده شد. در این برنامه تمام گونه‌هایی که توالی ژنی آن‌ها به ثبت رسیده است موجود می‌باشد. این گونه با

آبگیرهای فوق اشباع از نمک به دلیل وجود جلبک *D. salina* می‌باشد (Teodoresco, 1905). رنگ قرمز سیست به دلیل انباشته شدن غلظت بالای بتاکاروتن در آن می‌باشد و تشکیل سیست جلبک سبز تک‌سلولی *D. salina* در واقع پاسخی است به تنش‌های محیطی و باعث توانایی ماندن در استرس‌های محیطی تا جمع شدن غلظت بالایی از بتاکاروتن و دیگر پیگمان‌های کاروتنوئیدی با ارزش می‌باشد (Ramos *et al.*, 2011). نتایج مطالعات آن‌ها با پژوهش‌های مشابهی که توسط Ramaraj و همکاران انجام شد، مطابقت دارد و نشان دادند که گونه *D. salina* می‌تواند درصد بالایی بتاکاروتن تولید، همچنین دریافتند، تشخیص و تفکیک آن از لحاظ مورفولوژی با سایر گونه‌های *Dunaliella* بسیار دشوار می‌باشد بنابراین این گروه در چنین شرایطی با استفاده از بررسی توالی ژنی موفق به تشخیص آن از سایر گونه‌های جنس *Dunaliella* شدند (Ramaraj *et al.*, 2013). در تحقیق حاضر با گذشت سه ماه از کشت تک سیست درون پتری دیش، سلول‌های سبزرنگ ظاهر شدند که این سلول‌ها دارای اندازه‌های کوچک و کروی شکل بودند. این سلول‌ها یک مرحله از چرخه زندگی برخی گونه‌های فیتوپلانکتون می‌باشند، با گذشت یک هفته سلول‌ها بزرگتر شدند و محتویات درون آن‌ها به سلول‌های کروی و منظم تقسیم گردید (شکل ۲B) که با پاره شدن دیواره غشایی سلول‌های بزرگ، سلول‌های کوچک‌تر در محیط کشت شناور شدند، پس از گذشت یک ماه هر یک از سلول‌های کوچک شناور به یک سلول بالغ و متحرک تبدیل گردید. Oren و همکاران چگونگی تبدیل شدن سیست به پلانکتون *D. salina* را توصیف کرده‌اند و بر اساس آن چرخه زندگی این گونه را به‌وضوح بیان می‌کند: ابتدا سیست شروع به طولی شدن کرده و فرمی بیضی به خود می‌گیرد سپس چندین دسته سلول کوچک درون آن ایجاد شده که به‌وسیله لایه‌ای غشایی احاطه می‌گردند اندازه هر کدام از این سلول‌ها ۱۰ تا ۱۲ میکرومتر گزارش شده است با پاره شدن دیواره سیست سلول‌های بالغ خارج گردیده و این سلول‌ها به‌صورت شناور در محیط کشت قرار می‌گیرند. هر یک از این سلول‌ها در شرایط مساعد محیطی و نوترینت کافی به سلول‌های نارنجی‌رنگ و یا سبز طلایی گونه *D.*

شده است. نتایج آنالیز مولکولی و ترسیم درخت فیلوژنی با روش Maximum Likelihood Test tree (ML) در سه کلاد مشخص (A, B and C) نشان داد که گونه ایران CHCDs₂ در کلاد A قرار می‌گیرد (شکل ۴). این کلاد با ۱۰۰ درصد بوت استرپ حمایت می‌شود و همانطور که در شکل ۴ نشان داده شده است، سلول شکوفا شده CHCDs₂ با صد درصد حمایت بوت استرپ گونه خاوه‌ری *D. salina* می‌باشد و گونه *D. bardawil* و کلاد B با ۶۰ درصد و گونه‌های *D. bioculata* و *D. parva* موجود در کلاد C با ۱۰۰ درصد حمایت Bootstrap، خویشاوندی نزدیکی با گونه‌های کلاد A نشان می‌دهند. این گونه‌ها علاوه بر شباهت بسیار زیاد توالی ژنی از نظر ریخت شناسی و مورفولوژی هم بسیار شبیه می‌باشند و یک گروه منوفایلیتیک را تشکیل می‌دهند. گونه *Scripsiella sp* به عنوان گونه خارجی جهت ریشه دادن به درخت در نظر گرفته شده است.



شکل ۴- درخت فیلوژنی گونه ایرانی *D. salina* (CHCDs₂) بر اساس توالی ژنی در قسمتی از ناحیه LSU-rRNA
Figure 4: Phylogenetic tree of Iranian *D. salina* species (CHCDs₂) based on gene sequence of partial LSU-eRNA

بحث

بررسی مورفولوژی *Dunaliella sp* CHCDs₂ به‌وسیله مقایسه سلول شکوفا شده با گونه *D. salina* نشان داد، سلول شکوفا شده دارای سیست کروی می‌باشد که محتویات آن به رنگ قرمز یا نارنجی گزارش شده است. Teodoresco در مطالعه‌ای مشابه دریافت رنگ قرمز

salina تبدیل می‌گردند (Oren et al., 2005). سلول‌های این‌گونه با تغییر شرایط محیطی تغییر شکل داده و تبدیل به سیست می‌شوند در این شرایط اندازه سلول کوچک‌تر می‌باشد و فرم کروی به خود می‌گیرد. نداشتن دیواره سلولی مشخص در این مرحله از ویژگی‌های بارز این‌گونه می‌باشد اما سلول‌ها دارای پوششی نرم و مشخص هستند (Subbarao, 2009). همچنین Preetha و همکاران در مطالعاتی مشابه دریافتند که حداکثر رشد سلول‌های *Dunaliella* ۵ تا ۲۰ میلیون سلول در میلی‌لیتر محیط کشت در ۲۸ روز می‌باشد و نرخ رشد این سلول‌ها را 0.1 تا 0.5 (dv.d⁻¹) در طول چرخه رشد تخمین زده‌اند (Preetha et al., 2012). پهنای سلول شکوفاشده ۱۵-۴ و طول آن ۲۵-۶ میکرومتر می‌باشد. (Oren et al., 2005) همچنین در دیگر مطالعات اندازه سلول‌های گونه *Dunaliella* را ۵ تا ۲۵ میکرومتر طول و ۳ تا ۱۳ میکرومتر پهنا گزارش نموده‌اند (Ramos et al., 2011; Teodoresco, 1905). سلول شکوفا شده در شرایط آزمایشگاهی در تحقیق حاضر نیز دارای ۱۲-۴ میکرومتر عرض و ۲۴-۶ میکرومتر طول می‌باشد، این اختلاف در اندازه سلول احتمالاً بستگی به این دارد که اندازه‌گیری در چه مرحله‌ای از چرخه زندگی باشد. این‌گونه دارای یک مرحله رویشی (palmelloids) یک مرحله هاگ‌های غیر متحرک (aplanospores) و یک مرحله زیگوت یا تخم (Zygospores) می‌باشد، توصیفاتی که از مرحله تخم شده است نشان می‌دهد که این مرحله در واقع شکل واضح مرحله سیست می‌باشد (Oren et al., 2005). در سلول‌های شکوفاشده در این تحقیق قسمت سر باریک‌تر ولی انتهای بدن پهن‌تر می‌باشد. سلول‌های شکوفاشده در شکل‌های متنوعی هستند دایره و بیضی، کروی اما سلول شکوفاشده گلابی‌شکل می‌باشد، همچنین دارای یک کلروپلاست جامی شکل است که نیمی از فضای داخلی سلول را در بر گرفته است و دو تاژک بلند از قسمت رأس بدن به سمت بیرون کشیده شده است این‌گونه فاقد شیار جانبی می‌باشد. این‌گونه یک پیرونوئید دارد که به وسیله چندین جسم کشیده احاطه شده است و دو تاژک بلند از قسمت رأس بدن به سمت بیرون کشیده شده است و در سلول‌های جوان معمولاً یک پایلا مشاهده می‌شود،

تاژک‌ها از خود سلول کشیده‌تر هستند (Wang et al., 2014). این‌گونه‌ها علاوه بر شباهت بسیار زیاد توالی ژنی از نظر ریخت‌شناسی و مورفولوژی هم بسیار شبیه می‌باشند گونه‌های *D. salina* و *D. bardawil* جز گونه‌های فیتوپلانکتونی مونوفایلیتیک می‌باشند و از نظر ریخت‌شناسی بیشترین شباهت را به یکدیگر دارند. طبق مطالعاتی که Tran و همکارانش انجام دادند *D. salina* با ۹۸ درصد حمایت بوت‌استرپ گونه خواهری *D. bardawil* می‌باشد (Tran et al., 2013). همچنین مورفولوژی و فیلوژنی جنس *Dunaliella* در دریاچه نمک چین مورد بررسی قرار گرفت و بعد از بررسی توالی‌های ژنی ITS-1+5.8S rDNA+ITS-2ITS جنس‌های *D. salina* و *D. percie* شناسایی شد (Wang et al., 2014). Assuncoa و همکاران به بررسی موقعیت فیلوژنتیکی و وضعیت طبقه‌بندی گونه *D. salina* از اسپانیا و فرانسه پرداختند، تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد تنوع ژنتیکی قابل‌توجهی در ساختار درون‌گونه‌ای *Dunaliella* وجود دارد اما بررسی‌های مورفولوژی حاکی از شباهت‌های زیادی بین آن‌ها بود. مشخصات منحصربه‌فرد توالی ژنی و رسم درخت فیلوژنی گونه اسپانیایی را به‌عنوان یک‌گونه جدید گزارش نمود (Assuncoa et al., 2012). نتایج مطالعات Preetha و همکاران با سایر تحقیقات مشابه کاملاً مطابقت دارد این گروه به بررسی *Dunaliella* هندی پرداختند آن‌ها با مقایسه فنوتیپ و ژنوتیپ سلول شکوفاشده با سایر گونه‌های ثبت‌شده در بانک ژن سطح بالایی از تنوع را در این‌گونه گزارش دادند پس از تقویت منطقه 18SrDNA با آغازگرهای MA1-MA2 و مقایسه با گونه‌های موجود در بانک ژن درخت فیلوژنی آن را رسم نمودند و مشاهده کردند گونه شکوفاشده هندی با گونه *D. salina* در یک کلاد قرار می‌گیرد و تنوع ژنتیکی کمی را با این گونه‌ها نشان می‌دهد. (Preetha et al., 2012). گونه ایرانی *D. salina* با نام CHCDs₂ مشخص گردید و در راسته Chlamydomonadales واقع شد که یکی از راسته‌های Chlorophyta می‌باشد. رابطه خواهری این‌گونه با گونه *D. salina* که در بانک ژن به ثبت رسیده است در این تحقیق با ۱۰۰ درصد بوت‌استرپ حمایت می‌شود.

های مولکولی. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران.

زمانی، ه. و مرادشاهی، ع.، ۱۳۸۸. تکثیر و بیوسنتز کاروتنوئیدها توسط جلبک سبز دونالیلا سالینا (*Dunaliella salina*) در واکنش به برخی از عوامل محیطی. پایان نامه دولتی وزارت علوم، تحقیقات و فناوری دانشگاه شیراز.

عطاران فریمان، گ. و رئیسی، آ.، ۱۳۹۴. بررسی پراکنش و تنوع سیست داینوفلاژله‌ها در رسوبات خلیج گواتر (شمال شرق دریای عمان) مجله علمی شیلات ایران، سال ۲۴، شماره ۳.

عطاران فریمان، گ.، موسوی، س.، ع.، ناصری، ف.، ۱۳۹۲. خالص سازی و بررسی فیلوژنی گونه *Amphora cf Coffeniformis* جدا شده از آب‌های سواحل چابهار بر اساس توالی LSU-rDNA. مجله علوم و فنون دریایی، دوره ۱۲، شماره ۳.

محسنی زاده، ف.، نگارستان، ح. و سواری، ا.، ۱۳۹۲. عوامل موثر بر نوسانات فیتوپلانکتون‌های خلیج فارس (سواحل استان بوشهر)، مجله علمی شیلات ایران، ۱۰۲-۹۱: ۲۳.

- Alverson, A.J., 2008. Molecular systematic and the diatom species. *Protist*, 159(3): 339-353.
Doi:10.1016/j.protis.2008.04.001
- Anderson, D.M. and Wall, D.A., 1978. Potential importance of benthic cysts of *Gonyaulax tamarensis* and *G. excavata* in initiating toxic dinoflagellate blooms. *Journal of Phycology*. 14: 224-234.
Doi:10.1111/j.1529-8817.1978.tb02452
- Assuncoa, P., Jaén-Molina, R., Caujapé-Castells, J., Jara, A.D.L., Carmona, L., Freijanes, K. and Mendoza, H., 2012. Phylogenetic position of *Dunaliella acidophil* (*Chlorophyceae*) based on ITS and rbcL sequences, 24: 635-639.
Doi: 10.1111/pre.12003

آنالیزهای LSU-rRNA و رسم درخت فیلوژنی با روش (ML) نشان داد گونه ایرانی با تمام گونه‌های *D. salina* به صورت مونوفایلیتیک و تک نیایی می‌باشد و همچنین شباهت ژنی با ۱۰۰ درصد حمایت بوت‌استرپ را با گونه‌های موجود در کلاد C که از همین راسته می‌باشند نشان می‌دهد. به‌طور کلی بررسی‌های مولکولی نقش مهمی در طبقه‌بندی گونه‌های جنس *Dunaliella* داشته است همچنین می‌توان برای مشخص کردن جایگاه فیلوژنتیکی گونه‌ها از آنالیزهای مولکولی بهره برد. سیست‌های متنوعی در رسوبات لیبیار (سواحل جنوب شرق ایران) یافت شد که در شرایط آزمایشگاهی شکوفاشدن همه آن‌ها میسر نگردید. تغییر شرایط آزمایشگاهی برای تسریع در شکوفاشدن و انجام آنالیزهای مولکولی بر روی سلول‌های شکوفاشده ناشناخته می‌تواند موضوع مناسبی برای مطالعات بعدی باشد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از همکاری‌ها و مساعدت‌های آقای مهندس حسن زاده عباس و سرکار خانم مهندس بهروزی کارشناس محترم آزمایشگاه دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار قدردانی می‌گردد.

منابع

- آسکانی، ز.، ۱۳۹۴. بررسی تنوع و فراوانی سیست داینوفلاژله در رسوبات سواحل جنوبی سیستان و بلوچستان (آب شیرین کن - گواتر) در تابستان و پائیز. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه دریا نوردی و علوم دریایی چابهار.
- اصغری، ث.، احمدی، م.، محمدی زاده، ف.، ابراهیمی، م.، اجلالی، ک.، آقاجاری، ش. و اکبرزاده، غ.، ۱۳۸۹. بررسی تنوع و تراکم شکم پایان در قبل و بعد از مانسون تابستانه در سواحل ایرانی دریای عمان. آبزیان و شیلات، ۱۲-۱: ۱(۴).
- زاده عباس شاه آبادی، ح.، ۱۳۹۰. خالص سازی و بررسی فیلوژنی داینوفلاژله‌های تشکیل دهنده بلوم دریای عمان (سواحل چابهار) با استفاده از شاخص

- Attaran Fariman, G., 2007.** Dinoflagellate and Chattonella resting stages from recent sediments of the southeast coast of Iran. Dissertation, University of Tasmania.
- Baroin, A., Perasso, R., Qu, L.H., Brugerolle, G., Bachellerie, J.P. and Adoutte, A., 1988.** Partial phylogeny of the unicellular eukaryotes based on rapid sequencing of a portion of 28S ribosomal RNA. Proceedings of the National Academy of Sciences, 85: 3474–3478
- Buther, R.W., 1959.** An introductory account of the smaller algae of British coastal waters. Part I. Introduction and *Chorophyceae*. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Great Britain, Fisheries. Investigations, 24: 1-74.
Doi: 10.1007/BF00034911
- Dunal, M.F., 1838.** Extrait d'un mémoire sur les algues qui colorent enrouge certains eaux des marais salants méditerranéens, An Sc Nat Bot, pp: 9-172.
Doi: 10.1186/1746-1448-1-2
- Gibbs, N. and Duffus, M., 1976.** Natural protoplast *Dunaliella* as a source of protein, Applied Environ. Microbial, 31: 602-604. Doi: 10.1128/AEM.01945-08
- Hosseinzadeh Gharajeh, N., Hejazi1, M.A., Nazeri2, S. and Barzegari, A., 2012.** Characterization of an isolate, *Dunaliella tertiolecta* ABRIINW-G3, from Gavkhooni Salt, J. Agr. Sci. Tech. 14: 1579-1590.
- Lamers, P.P., van de Laak, C.C.W., Kaasenbrood, P.S., Lorier, J., Janssen, M., De Vos, R.C.H., Bino, R.J. and Wijffels, R.H., 2010.** Carotenoid and fatty acid metabolism in light-stressed *Dunaliella salina*. Biotechnol. Bioeng. 106: 638-648. Doi: 10.1002/bit.22725.
- Liska, A.J., Shevchenko, A., Pick, U. and Katz, A., 2004.** Enhanced photosynthesis and redox energy production contribute to salinity tolerance in *Dunaliella* as revealed by homology-based proteomics. Plant Physiol. 136: 2806-2817.
Doi: 10.1104/pp.104.039438
- Oren, A., 2005.** A hundred years of *Dunaliella* research *Saline Systems*, 1(2): 1-14. Doi: 10.1186/1746-1448-1-2
Doi: 10.1186/1746-1448-1-2
- Pick, U., 1998.** *Dunaliella*-A model extremophilic alga. Israel J.plant Sci. 46: 131-139.
Doi: 10.1080/07929978.1998.10676720
- Polle, J.E., Tran, D. and Ben-Amotz, A., 2009.** History distribution and habitats of algae of the Genus *Dunaliella* Teoderosco (Chlorophyceae). The alga *Dunaliella*: biodiversity, physiology, genomics and biotechnology, Science Publishers, Enfield, 15780: 1-13. Doi: 10.1578085454
- Preetha, K., John, L., Sukumaran, CH., and Kizhakkedath Vijayan, K., 2012.** Phenotypic and genetic characterization of *Dunaliella* (*Chlorophyta*) from Indian salinas and their diversity *Aquatic Biosystems*, 1: 8-27. Doi: 10.1186/2F046-9063
- Qureshi, M.A. and Ali, R.A., 1996.** *Spirulina platensis* exposure enhances macrophage phagocytic function incats. Immunopharmacol Immunotoxicol, 18: 457-463.

Doi:10.3109/08923979609052747

- Ramos, A., Polle, J., Tran, D., Cushman, J.C., Jin, E. and Verala, J.C., 2011.** The unicellular green alga *Dunaliella salina* Teod. as a model for abiotic stress tolerance: genetic advances and future perspective s. *Algae*, 26(1): 3-20. Doi; 10.4490/algae.2011.26.1.003
- Rahaman, A.A., 2006.** Plankton communities in hypersaline waters of Indian solar saltworks. Proceedings of the th International conference on the Ecological Importance of Solar Saltworks, Santorini Island, Greece, pp: 20-22, 19 OCT.
- Ramaraj, S. and Niran, J., 2013.** Modified medium for enhanced growth of *Dunaliella* strain, *Curr Sci*, 5: 67-73. doi.org/10.17758/IAAST.A0715076
- Subbarao, D.V., 2009.** In the alga *Dunaliella*: Biodiversity, Physiology,

Genomics and Biotechnology. Science Publishers, New Hampshire, USA, 45p. Doi: 10.1186/s40709-014-0023-y

- Teodoresco, E.C., 1905.** Organisation e t développement du *Dunaliella*, nouveau genre de Volvocacée-Polyblepharidée, 312: 215-232. Doi: 10.1186/1746-1448-1-2
- Tran, Du., Trung, Vo., Portilla, S., Louime, C., Doan, N., Mai, T., Tran, Da and Tran, G., 2013.** Phylogenetic study of some strains of *Dunaliella*. *American Journal of Environmental Science*, 9: 317-321. Doi: 10.3844/ajessp.
- Wang, F., Feng, J. and Wang, J., 2014.** Li Bo and xie shulian, phylogenetic and morphological investigation of a *Dunaliella* strain isolated from Yuncheng Salt Lake, China. *Acta Geologica Sinica*, 2: 20-26. Doi: 10.11648/j. plant.40202.12.

Isolation and molecular identification of *Dunaliella salina* (Chlorophyceae) cyst from sediments of the Lipar coast (Oman Sea)

Attaran Fariman G.^{1*}; Sadeghi P.¹; Shirzaie R.¹

* gilan.attaran@gmail.com

1- Chabahar Maritime University, Faculty of Marine Sciences

Abstract

Some species of phytoplankton under unfavorable environmental conditions and in their sexual life cycle produce resting cyst that settle to the bottom sediments and become motile in the water column when suitable conditions provided. Phytoplankton species were studied in two stages of motile and cyst for accurate identification of morphology, because some similar cysts may convert to a different phytoplankton and vice versa. The objectives of this study were to culture cysts that isolated from sediments of Lipar zone located in the southeast coast of Iran and to identify excysted samples. Sediment samples from Lipar zone were collected by Ekman grab with 225 cm² area in 2015. Unknown live and orbicular single cysts were isolated from sediments and cultured in sterile conditions in phycolab using f₂ medium under 12 hours light and 12 hours dark cycles at 25±1°C. Assessment of excysted plankton morphology revealed that the cyst is belonged to *Dunaliella salina* species. In order to confirm this morphological identification, DNA of the plankton was extracted and PCR was performed. The sequence of the sample was compared with the sequences of the similar species from GenBank. Phylogeny and molecular analysis confirmed this identification. The present study revealed that *D. salina* from the south coast of Iran was able to produce resting cyst.

Keywords: *Dunaliella salina*, Cyst, Phylogeny, Sediment, South coast of Iran

*Corresponding author