جداسازی و شناسایی سیست *Dunaliella salina* (Chlorophyceae) از رسوبات ساحلی لیپار (دریای عمان) با استفاده از آنالیز مولکولی

گیلان عطاران فریمان[1*]، پروین صادقی[1]، رقیه شیرزایی[1]

* gilan.attaran@gmail.com

۱-دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار

تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۹٦

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، گونه-های فیتوپلانکتون در دو مرحله‌ی 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 جمع کنندگی 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 ۲۵±۱°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 تائید شناسایی استرین خالص حاصل از کشت سیست موردنظر، استخراج DNA و سپس واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (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

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-04]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1396.26.4.6.9]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.113922]

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 کشند سرخ شوند (عطاران فریمان و همکاران، ۱۳۹۴). بیشتر مطالعات در ایران در دریای عمان انجام‌شده است. منطقه لیپار از جمله مناطقی در سواحل غربی دریای عمان می باشد 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 قرارداده 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 انجام‌گرفته 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 جداشده از دریاچه مهارلو در شیراز و انجام آنالیزهای فیلوژنی منطقه ITS(ITS-1+5.8 rDNA+ITS-2) 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 شناخته‌نشده بود. بعدها توسط Teodoresco به نام کاشف آن نامگذاری شد (Polle *et al*., 2009; Pick, 1998; Oren, 2005). 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 ازجمله نور زیاد، شوری زیاد و کمبود مواد مغذی کاروتنویید تولید می‌کند (Teodoresco,1906; Lamers *et al*., 2010). سیست جلبک سبز تک سلولی *D. salina* پاسخی است به تنش-های محیطی و برای چندین دهه مورد بررسی قرارگرفته است. (Ramos *et al*., 2011). دما، شوری و مواد مغذی ازجمله فاکتورهای کنترل کننده رشد و نمو این گونه می-باشند (Poll *et al*., 2009). تغییرات شدید آب و هوایی، بویژه در سال‌های اخیر زمینه‌ایبرای 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 می-کنند (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 این‌گونه 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 Zygospores است. توصیفاتی که از مرحله تخم شده است، نشان می‌دهد که این مرحله شکل واضح مرحله سیست می‌باشد (Oren *et al*., 2005) آنالیزهای مولکولی انجام‌شده توسط Tran و همکارانش در سال ۲۰۱۳ حاکی از شباهت بسیار زیاد دو گونه *D.salina* و *D. bardawil* می‌باشد. (Tran *et al*., 2013).

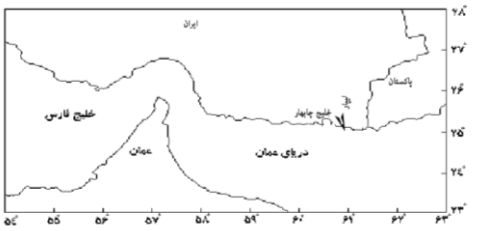
در این تحقیق به بررسی رابطه سیست و حالت پلانکتونی گونه ناشناخته سیست جدا شده از رسوبات

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-04]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1396.26.4.6.9]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.113922]

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 گونه های جنس *Dunaliella* قرمز رنگ می باشد. پنج نمونه رسوب از ایستگاهی (شکل ۱) با موقعیت طول (N"۱۵′۱۳°۲۵) و عرض جغرافیایی (E"۴۷′۴۹°۶۰) از عمق ۲۰ متری با بستر شنی گلی توسط نمونه بردار Ekman Grab با سطح جمع کنندگی 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.



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)

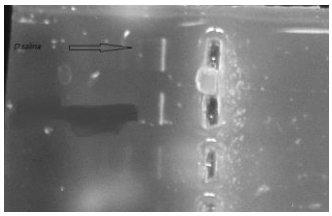
در آزمایشگاه حدود ۲-۳ گرم از رسوب با آب فیلتر شده دریا مخلوط گردید. سپس دو دقیقه سونیکیت در دستگاه سونیکاتور مدل Sc۱۹۰۰d انجام شد. مخلوط رسوب و آب دریا از الک‌های ۲۰-۱۲۵ میکرومتر گذرانده شد. رسوب باقی مانده در الک توسط آب دریا شسته و در پلیت تمیز و استریل ریخته شد (Anderson & Wall, 1978; Attaran Fariman, 2007). جداسازی انفرادی نمونه سیست رسوبات زیر میکروسکوپ اینورت (Nikon-TF100) با میکروپیپت انجام گردید. سیست‌های ناشناخته در اشکال مختلف از نمونه رسوب جدا شد و در پتری دیش حاوی محیط کشت F_2 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 ۱C°±۲۵ 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 انبوه-سازی 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 D2C-R و D1R-F انجام گرفت. برای انجام واکنش زنجیره پلیمراز (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 خالص سازی 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 Mega5، Clastalw و BioEdite برای انجام آنالیزهای مولکولی و ترسیم درخت فیلوژنی استفاده

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-04]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1396.26.4.6.9]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.113922]

گردید. در رسم درخت فیلوژنی گونه *Scrippsiella* به‌عنوان گونه خارجی جهت ریشه دادن به درخت در نظر گرفته شد.

نتایج

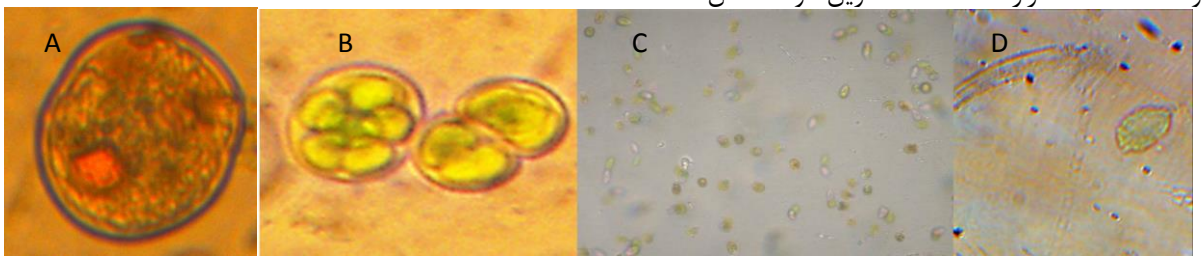
بررسی کمیت و کیفیت DNA با استفاده از ژل آگار یک ونیم درصد انجام شد و محصولات از نظر میزان غلظت DNA و آلودگی وضوح باندها مورد بررسی قرار گرفتند. ازآنجایی‌که مواد پروتئینی فاقد بار می‌باشند، حضور آن ها در DNA استخراج شده بصورت باندهایی درون چاهک بر روی ژل آگار مشاهده خواهد شد. بررسی‌های انجام‌شده نشان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



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

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

بررسی خصوصیات مورفولوژی نمونه شکوفا شده، آن را در گونه *D. salina* قرار داده است. استرین گونه خالص شده 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 برگرفته 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 (شکلC-D ۳). سلول شکوفا شده نیز از نظر ریخت شناسی بیشترین شباهت را به گونه *D. salina* دارد.



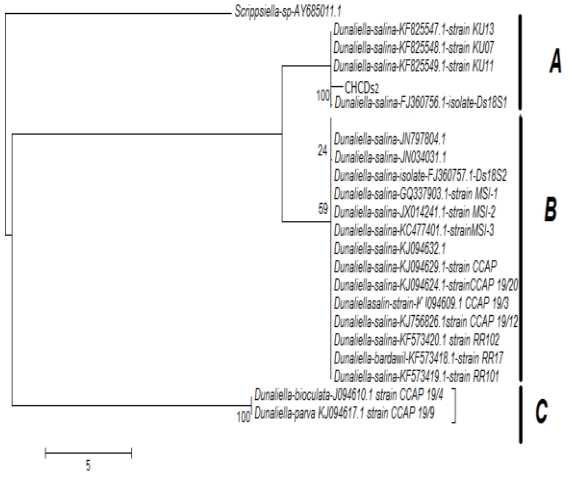
شکل ۳: A)سیست *D. salina* جداشده از رسوبات لیپار در سال ۱۳۹۴ (بزرگنمایی۱۰۰×)، B) مرحله عیر متحرک اپلانسپور (بزرگنمایی ۱۰۰×)، C-D) سلول شکوفا شده متحرک *D. salina* حاصل از کشت انفرادی سیست (بزرگنمایی ۲۰× و ۱۰۰×)

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

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

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-04]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1396.26.4.6.9]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.113922]

شده است. نتایج آنالیز مولکولی و ترسیم درخت فیلوژنی با روش Muximum Liklihood Test tree (ML) در سه کلاد مشخص (A, B and C) نشان داد که گونه ایران $CHCDs_2$ در کلاد A قرار می‌گیرد (شکل ۶). این کلاد با ۱۰۰ درصد بوت استرپ حمایت می‌شود و همانطور که در شکل ۴ نشان داده شده است، سلول شکوفا شده $CHCDs_2$ با صد درصد حمایت بوت استرپ گونه خواهری *D. salina* می‌باشد و گونه *D. bardawil* در 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 ازنظر ریخت شناسی و مورفولوژی هم بسیار شبیه می‌باشند و یک گروه منوفایلیتیک را تشکیل می-دهند. گونه *Scrippsiella* 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 Iranain *D. salina* species (CHCDs2) based on gene sequence of partial LSU-eRNA

بحث

بررسی مورفولوژی *Dunaliella* sp $CHCDs_2$ به‌وسیله مقایسه سلول شکوفا شده با گونه *D. salina* نشان‌داد، سلول شکوفاشده دارای سیست کروی می‌باشد که محتویات آن به رنگ قرمز یا نارنجی گزارش‌شده است. Teodoresco در مطالعه‌ای مشابه دریافت رنگ قرمز 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* درواقع پاسخی است به تنش‌های محیطی و باعث توانایی ماندن در استرس‌های محیطی تا جمع شدن غلظت بالایی از بتاکاروتن و دیگر پیگمان‌های کاروتنوئیدی باارزش می‌باشد (Ramos *et al*., 2011). نتایج مطالعات آن‌ها با پژوهش‌های مشابهی که توسط Ramaraj و همکاران انجام‌شد، مطابقت دارد و نشان دادند که گونه *D. salina* می‌تواند درصد بالایی بتاکاروتن تولید، همچنین دریافتند، تشخیص و تفکیک آن ازلحاظ 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 باگذشت سه ماه از کشت تک سیست درون پتری دیش، سلول‌های سبزرنگ ظاهر شدند که این سلول‌ها دارای اندازه‌ای کوچک و کروی شکل بودند. این سلول‌ها یک مرحله از چرخه زندگی برخی گونه‌های فیتوپلانکتون می‌باشند، با گذشت یک هفته سلول‌ها بزرگتر شدند ومحتویات درون آن‌ها به سلول‌های کروی ومنظم تقسیم گردید (شکل ۳B)که با پاره شدن دیواره غشایی سلول-های بزرگ، سلول‌های کوچک‌تر در محیط کشت شناور شدند، پس از گذشت یک ماه هر یک از سلول‌های کوچک شناور به یک سلول بالغ ومتحرک تبدیل گردید. Oren و همکاران چگونگی تبدیل‌شدن سیست به پلانکتون *D. salina* را توصیف کرده‌اند وبر اساس آن چرخه زندگی این‌گونه را به‌وضوح بیان می‌کند: ابتدا سیست شروع به طویل شدن کرده و فرمی بیضی به خود می‌گیرد سپس چندین دسته سلول کوچک درون آن ایجادشده که به‌وسیله لایه‌ای غشایی احاطه می‌گردند اندازه هرکدام از این سلول‌ها ۱۰ تا ۱۲ میکرومتر گزارش‌شده 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.*

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-04]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1396.26.4.6.9]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.113922]

salina تبدیل می‌گردند (Oren *et al.*, 2005). سلول-های 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 میلی-لیتر محیط کشت در ۲۸ روز می‌باشد و نرخ رشد این سلول‌ها را (۰/۱(dv.d^{-1} تا ۰/۵ 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 دردیگر 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 درواقع 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 برگرفته است و دو تاژک بلند از قسمت رأس بدن به سمت بیرون کشیده شده است این‌گونه فاقد شیار جانبی می‌باشد. این گونه یک پیرونوئید دارد که به-وسیله چندین جسم کشیده احاطه‌شده است و دو تاژک بلند از قسمت رأس بدن به سمت بیرون کشیده شده است و در سلول‌های جوان معمولاً یک پاپیلا مشاهده می‌شود، تاژک‌ها از خود سلول کشیده‌تر هستند (Wang *et al.*, 2014). این گونه‌ها علاوه بر شباهت بسیار زیاد توالی ژنی ازنظر ریخت‌شناسی و مورفولوژی هم بسیار شبیه می‌باشند گونه‌های *D. salina* و *D. bardawil* جز گونه‌های فیتوپلانکتونی مونوفایلیتیک می‌باشند و ازنظر ریخت-شناسی 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 وفیلوژنی جنس *Dunaliella* در دریاچه نمک چین موردبررسی 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، تجزیه‌وتحلیل داده‌ها نشان‌داد 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 گونه-های 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 درخت‌فیلوژنی 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 $CHCDs_2$ 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.

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-04]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1396.26.4.6.9]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.113922]

آنالیزهای LSU-rRNA و رسم درخت‌فیلوژنی با روش (ML) نشان داد گونه ایرانی با تمام گونه‌های *D. salina* به‌صورت مونوفایلیتیک و تک نیایی می‌باشد و همچنین شباهت ژنی با ۱۰۰ درصد حمایت بوت‌استرپ را با گونه-های موجود در کلاد C که از همین راسته می‌باشند نشان می‌دهد. به‌طورکلی 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 لیپار (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 کارشناسان 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 :(۴)۱.

زاده عباس شاه آبادی، ح.، ۱۳۹۰. خالص سازی و بررسی فیلوژنی داینوفلاژله های تشکیل دهنده بلوم دریای عمان (سواحل چابهار) با استفاده از شاخص 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 دونالییلا سالینا (*Dunaliella salina*) در واکنش به برخی از عوامل محیطی. پایان‌نامه 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. خالص‌سازی و بررسی فیلوژنی گونه *Amphora* cf *Coffeneformis* جداشده 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 intiating toxic dinofalgellate 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

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-04]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1396.26.4.6.9]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.113922]

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.

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-04]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1396.26.4.6.9]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.113922]

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 salin*a Teod. as a model forabiotic 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.

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-04]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1396.26.4.6.9]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.113922]

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

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-04]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1396.26.4.6.9]

[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.113922]

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 cm^2 area in 2015. Unknown live and orbicular single cysts were isolated from sediments and cultured in sterile conditions in phycolab using f_2 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