DOI: http://dx.doi.org/10.22092/botany.2016.107004

Rostaniha 17(1): 70–77 (2016)

رستنیها ۱۷(۱): ۷۷–۷۰ (۱۳۹۵)

جداسازی و شناسایی ریخت‌شناسی و مولکولی گونه‌های جلبک *Dunaliella* از دریاچه‌های شور حوض سلطان و آران و بیدگل

دریافت: ۱۳۹۴/۱۲/۰۸ / پذیرش: ۱۳۹۵/۰۴/۰۱

مهشید صدقی: دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، بانک میکروارگانیسم‌ها، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، جهاد دانشگاهی، تهران، ایران

فرخنده صبا: دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، بانک میکروارگانیسم‌ها، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، جهاد دانشگاهی، تهران؛ گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

مصطفی نوروزی✉: استادیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا (س)، تهران، ایران (noroozi.mostafa@alzahra.ac.ir)

محمد علی آموزگار: دانشیار پردیس علوم، دانشکده زیست شناسی و قطب تبارزایی موجودات زنده، بخش میکروبیولوژی، دانشگاه تهران؛ بانک میکروارگانیسم‌ها، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، جهاد دانشگاهی، تهران، ایران

سید ابوالحسن شاهزاده فاضلی: دانشیار بانک میکروارگانیسم‌ها، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، جهاد دانشگاهی، تهران؛ گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه و فناوری‌های نوین زیستی، دانشگاه علم و فرهنگ، جهاد دانشگاهی، تهران، ایران

چکیده

در این تحقیق، نمونه‌هایی از جلبک *Dunaliella* در تیر ۱۳۹۳ از اکوسیستم‌های آب شور دریاچه‌های حوض سلطان و آران و بیدگل جداسازی شدند و سپس گونه‌های مختلف آن در محیط اختصاصی Moh202 کشت گردید. آرایه‌های جداسازی شده به کمک میکروسکوپ نوری و روش‌های ریخت‌شناسی مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین، با استفاده از روش مولکولی، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و استفاده از جفت پرایمر ژن 18S rDNA گونه‌های مختلف این جنس مورد شناسایی دقیق‌تر و شناسایی‌های ریخت‌شناختی آن‌ها نیز مورد تایید قرار گرفت. نمونه‌برداری و جداسازی ریزجلبک *Dunaliella* از مناطق مختلف این دریاچه‌ها نشان داد که دو گونه مختلف از جنس *Dunaliella* شامل *D. parva* و *D. viridis* در دریاچه‌های مورد مطالعه وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: تنوع مولکولی، جلبک سبز، دریاچه نمک، *Dunaliella*

Isolation, morphological and molecular identification of *Dunaliella* species in Hoz-e Soltan and Aran-va-Bidgol salt Lakes (Iran)

Received: 27.02.2016 / Accepted: 21.06.2016

Mahshid Sedghi: MSc Graduate, Microorganisms Bank, Iranian Biological Resource Center (IBRC), (ACECR), Tehran, Iran

Farkhondeh Saba: MSc Graduate, Microorganisms Bank, Iranian Biological Resource Center (IBRC), (ACECR), Tehran; Department of Plant Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

Mostafa Noroozi✉**:** Assistant Prof., Department of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran (noroozi.mostafa@alzahra.ac.ir)

Mohammad Ali Amoozegar: Associate Prof., Department of Microbiology, Faculty of Biology and Center of Excellence in Phylogeny of Living Organisms, College of Science, University of Tehran, Tehran; Microorganisms Bank, Iranian Biological Resource Center (IBRC), (ACECR), Tehran, Iran

Seyed Abolhassan Shahzadeh Fazeli: Associate Prof., Microorganisms Bank, Iranian Biological Resource Center (IBRC), (ACECR), Tehran; Department of Molecular and Cellular Biology, Faculty of Basic Sciences and Advanced Technologies in Biology, University of Science and Culture, Tehran, Iran

Summary

In this study, *Dunaliella* has been isolated in Jun. 2014 from Hoz-e Soltan and Aran-va-Bidgol salt Lakes (Iran). The isolates have been identified morphologically with the aid of simple light and invert microscope after isolation and purification on their specific medium (Moh202). By using molecular techniques such as polymerase chain reaction (PCR) and amplification of 18S rDNA gene primers, further identification was done and morphological identification were confirmed. The isolation and molecular identification of the *Dunaliella* species from above-mentioned lakes revealed that, at least two species of *Dunaliella*, namely, *D. parva* and *D. viridis* exist in the studied area.

Keywords: *Dunaliella*, green algae, molecular diversity, saline lake

مقدمه

جلبک‌ها گروه بزرگی از موجودات هستند که از دو جنبه اقتصادی و اکولوژیکی دارای اهمیت فراوانی می‌باشند. از نظر اکولوژیکی، جلبک‌ها در پایه هرم انرژی اکوسیستم‌های عظیم قرار داشته و به عنوان تولید کنندگان اصلی زنجیره غذایی، تثبیت‌کنندگان ازت و ایجاد اکوسیستم خاص و تامین غذای آبزیان اهمیت دارند (Volkman *et al.* 1989). ریزجلبک تک‌یاخته *Dunaliella* در آب‌های شور ساحلی، آبگیرهای صخره‌ای و دریاچه‌های آب شور زندگی می‌کند. این جلبک برای زندگی در آب‌های خیلی شور (hyperhaline)، سازگار شده و یکی از گونه‌های حیاتی مقاوم به نمک می‌باشد که تا کنون شناخته شده است. جلبک مذکور تک‌سلولی، تاژک‌دار، بدون دیواره سلولی است و قادر به زندگی در تنش‌های محیطی مختلف می‌باشد (Abusara *et al.* 2011). این جنس دارای ۲۹ گونه می‌باشد که اغلب گونه‌های آن به دلیل توانایی در تولید گلیسرول، قادرند در محیط‌های شور زندگی کنند (Borowitzka & Siva 2007). ریزجلبک *D. salina* به عنوان یکی از گونه‌های مهم این جنس، علاوه بر اینکه در غلظت‌های بسیار بالای نمک رشد می‌کند، قادر است مقادیر بالای بتاکاروتن را در کلروپلاست خود تجمع کند (Nikookar *et al.* 2004, Fazeli *et al.* 2006, Borowitzka & Siva 2007, Hadi *et al.* 2008). بتاکاروتن به عنوان رنگیزه زرد برای فرآورده‌های غذایی و غذاهای رژیمی استفاده می‌شود. همچنین، بتاکاروتن به خاطر خاصیت ضدسرطانی و آنتی‌اکسیدانی شناخته شده و در صنایع دارویی کاربرد فراوانی دارد. در سال‌های اخیر کشت این جلبک برای تولید کارتنوییدها افزایش یافته است (Hosseini & Shariati 2006, Raja *et al.* 2007a, Jayappriyan *et al.* 2010).

از مزایا و کاربردهای ریزجلبک *Dunaliella* می‌توان به موارد متعدد زیر اشاره کرد: ۱- تولید صنعتی بتاکاروتن، ۲- جلوگیری از خروج ارز از کشور و خودکفایی منطقه در تولید بتاکاروتن، ۳- عدم نیاز به آب شیرین برای کشت، ۴- امکان تولید آب شیرین به عنوان محصول جانبی، ۵- امکان کشت و برداشت محصول در طول سال و ۶- نیز استفاده از مناطق شور حاشیه دریاچه‌های شور به عنوان زمین‌های کشت جلبک (Manaffar 2012).

جلبک *Dunaliella* در حالتی که در معرض تنش شوری قرار نداشته و درصد نمک دریاچه کم باشد، بتاکاروتن اندکی تولید می‌کند و لذا به خاطر وجود کلروفیل به رنگ سبز دیده می‌شود، اما با افزایش شوری آب در اثر تبخیر شدید، رنگریزه‌های کارتنوییدی آن افزایش یافته و در نتیجه به رنگ قرمز دیده می‌شود. همچنین، در صورت بالا بودن تراکم، این ریزجلبک می‌تواند در استخراج مواد بیولوژیک دریایی مهمی مثل بتاکاروتن‌ها مورد استفاده قرار گیرد. بتاکاروتن همراه کاروتنوییدهایی دیگر مانند آلفاکاروتن، زاگزانتین، کریپتوکزانتنین، لوتیین و پیگمان‌های نارنجی و قرمز رنگ از *Dunaliella* استخراج می‌شود. بتاکاروتن یکی از رایج‌ترین کاروتنوییدهای مورد استفاده است که پیش‌ساز ویتامین A و عامل ضدسرطانی در بافت‌های بدن می‌باشد و همچنین در برخی داروها از جمله در قرص‌های جوشان حاوی ویتامین C برای ایجاد رنگ طبیعی استفاده می‌شود (Goldberg 1996).

نمونه‌برداری از جلبک *Dunaliella* طی یکی دو دهه اخیر، از باتلاق شور گاوخونی صورت گرفت که در نتیجه، سه گونه مختلف از جنس *Dunaliella* (*D. parva*، *D. pseudosalina* و *D. salina*)، براساس تفاوت‌های ریخت‌شناسی و فیزیولوژیکی با روش‌های مولکولی شناسایی شدند (Shariati & Hadi 2000, Hadi *et al.* 2008).

بنابراین، هدف از اجرای این تحقیق، جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی جلبک تک‌سلولی از جنس *Dunaliella* از دریاچه‌های نمک حوض سلطان و آران و بیدگل می‌باشد. بدین منظور، دو گونه از جنس مذکور جداسازی و به روش‌های ریخت‌شناسی و آنالیز توالی وابسته به قطعه ژنی 18S rRNA شناسایی شدند.

روش بررسی

- نمونه‌برداری

برای دست‌یابی به سویه‌های *Dunaliella*، نمونه‌برداری‌ها از سه منطقه مختلف آب دریاچه‌های نمک حوض سلطان و آران و بیدگل، طی تیر ۱۳۹۳ صورت گرفت (جدول ۱).

دریاچه نمک حوض سلطان در ۴۰ کیلومتری شمال شهرستان قم و ۸۵ کیلومتری جنوب تهران و در حاشیه بزرگراه خلیج فارس قرار دارد. این دریاچه که به دریاچه ساوه قم و دریاچه شاهی نیز شهرت دارد، به مساحت تقریبی ۲۴۰ کیلومتر مربع در شمال شرق شهرستان قم واقع شده است و رشته کوه‌های البرز در شمال آن قرار دارد. این دریاچه از دو چاله جدا از هم تشکیل شده است. چاله غربی به نام حوض سلطان و چاله

شرقی به نام حوض مره است که به وسیله یک آبراهه به هم متصل شده‌اند. در فصول پر آب ابتدا چاله مره (حوض مره) پر می‌شود و سپس آب اضافی آن وارد حوض سلطان می‌شود (Rad *et al.* 2011). شایان ذکر است، آران و بیدگل نام شهرستانی در استان اصفهان است که دارای آب و هوایی گرم و خشک با تابستان‌های گرم و سوزان و زمستان‌هایی سرد و خشک می‌باشد. بیشینه دمای هوا در تابستان ۴۸ درجه و کمینه آن در زمستان به ۷- درجه سلسیوس می‌رسد. حدود ۱۹۰۰ کیلومتر مربع از دریاچه حوض سلطان در تپه‌های شنی قرار دارد که در اصطلاح محلی به آن بند ریگ می‌گویند. در اعماق و سطح زمین‌های نواحی شمال این شهرستان، معادن غنی و فراوانی وجود دارد که مهم‌ترین آن‌ها حوزه‌های وسیع نفت و دریاچه نمک با وسعت ۲۰۰۰ کیلومتر مربع می‌باشد (Salmani Arani 1998).

جهت نمونه‌برداری در هر ایستگاه، مقداری آب در ظروف فالکون ۵۰ میلی‌لیتری و همچنین در بطری‌های یک لیتری برداشته شد. نمونه‌های آب بلافاصله به آزمایشگاه ریزجلبک بانک میکروارگانیسم‌ها در مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران انتقال داده شد. نقاط ایستگاه‌های نمونه‌برداری در شکل ۱ مشخص شده است.

شکل ۱- عکس ماهواره‌ای دریاچه حوض سلطان و آران و بیدگل.
Fig. 1. Satellite image of Hoz-e Soltan and Aran-va-Bidgol Lakes (Iran).

- کشت و جداسازی

نمونه‌های آب برداشته شده از مناطق مورد نظر به آزمایشگاه منتقل شد و سپس جداسازی گونه‌های جنس *Dunaliella* به روش مستقیم زیر میکروسکوپ نوری Olympus CX31 و همچنین با کشت متوالی روی محیط کشت جامد انجام گرفت (Mishra *et al.* 2008, Jayappriyan *et al.* 2010). بدین منظور، ابتدا با استفاده از پیپت پاستور و با درشت‌نمایی ۴۰ میکروسکوپ اینورت، تعدادی از سلول‌های جلبک فوق جدا شد. در مرحله بعد، جهت جداسازی کامل این جنس از دیگر جلبک‌های تک‌سلولی، سلول‌های مورد نظر روی محیط کشت جامد (Walne و محیط کشت اختصاصی *Dunaliella* با شوری ۳۰ و ۶۰ و ۱۰۰ گرم در لیتر با آگار ۱/۵ درصد) انتقال داده شد. پلیت‌های آماده شده به انکوباتور با دمای ۲۳ درجه سلسیوس و در معرض نور فلورسنت با شدت ۵۰ $\mu molm^{-2}s^{-1}$ و با چرخه ۱۸ ساعت روشنایی و شش ساعت تاریکی انتقال داده شدند.

خالص‌سازی روی محیط کشت آگار (کشت سریالی) شش بار تکرار شد تا ضمن به دست آمدن تک‌کلونی، آلودگی باکتریایی نیز از محیط کشت حذف شود. کلنی‌های خالص ایجاد شده روی محیط کشت جامد با استفاده از لوپ برداشت شد و پس از اطمینان از خالص بودن ریزجلبک‌ها توسط میکروسکوپ نوری، هر کلنی به صورت مجزا در ارلن‌های حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت اختصاصی *Dunaliella* که نخستین بار توسط پروفسور Borowitzka استفاده گردیده، کشت داده شد. در مرحله بعد، نمونه‌های خالص‌سازی شده به منظور افزایش حجم به ارلن‌های ۲۵۰ تا ۵۰۰ میلی‌لیتری با محیط کشت اختصاصی *Dunaliella* انتقال داده شدند و در صورت وجود هر گونه ناخالصی مراحل فوق تکرار شد (Borowitzka *et al.* 1988).

تفاوت‌های ریخت‌شناسی اولیه شامل رنگ بیومس در محیط کشت مایع، شکل ریختی ریزجلبک به عنوان ویژگی‌های مهم اولیه برای جداسازی گونه‌های *Dunaliella* در نظر گرفته

شد. در ابتدا، شناسایی نمونه‌های خالص توسط خصوصیات ریخت‌شناسی و فیزیولوژیکی شامل اندازه و شکل سلول، شکل کلروپلاست و همچنین تحمل غلظت‌های مختلف نمک انجام شد (Borowitzka & Siva 2007).

با توجه به شباهت‌های ریخت‌شناسی گونه‌های مختلف این ریزجلبک و تغییرات ریخت‌شناسی آن‌ها تحت شرایط متفاوت، برای تایید شناسایی گونه‌های *Dunaliella* جداسازی شده، از روش‌های مولکولی استفاده شد (Olmos *et al.* 2000, Tempesta *et al.* 2010).

بررسی مولکولی

- روش استخراج DNA و شرایط PCR

استخراج DNA از محیط کشت مایع جلبک جداسازی و خالص شده با استفاده از روش rapid extraction با دانه‌های شیشه‌ای انجام شد (Sambrook *et al.* 1989, Ausubel *et al.* 1995, Saba *et al.* 2016). شناسایی مولکولی گونه‌ها با استفاده از ژن 18S rDNA صورت گرفت (Olmos *et al.* 2000, Jayappriyan *et al.* 2010). جهت تکثیر ناحیه 18S rDNA، از جفت آغازگر (پرایمر) SSU1 و ITS1DR با توالی 5'-cgg gat ccg tag tca tat gct tgt ctc-3' و همچنین 3'-cgg aat tcc ttc tgc agg ttc acc-3' استفاده شد (Olmos *et al.* 2000). برنامه PCR استفاده شده شامل دمای تفکیک کننده اولیه ۹۴ درجه سلسیوس به مدت سه دقیقه و ۳۰ ثانیه، ۳۶ چرخه شامل دمای واسرشت کننده ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵۰ ثانیه، دمای اتصال ۵۲ درجه سلسیوس به مدت ۵۰ ثانیه، دمای گسترش ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵۰ ثانیه و در نهایت دمای گسترش نهایی ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه می‌باشد. محصول PCR روی ژل الکتروفورز یک درصد مورد بررسی قرار گرفت (Olmos *et al.* 2000) و محصول نهایی PCR به دست آمده به شرکت پیشگام ارسال و تعیین توالی در شرکت Bioneer در کشور کره جنوبی انجام پذیرفت.

نتیجه

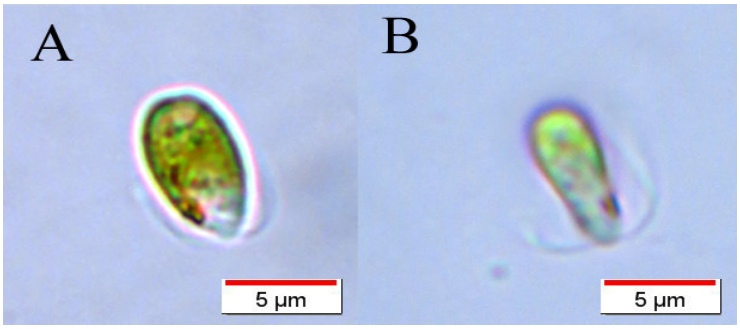
- مختصات جغرافیایی و شاخص‌های فیزیکوشیمیایی ایستگاه‌های نمونه‌برداری

نتایج بررسی برخی از شاخص‌های فیزیکوشیمیایی آب محل نمونه‌برداری و مختصات جغرافیایی هر یک به شرح جدول ۱ می‌باشد.

جدول ۱- مختصات جغرافیایی و شاخص‌های فیزیکوشیمیایی آب ناحیه مورد بررسی

کد نمونه	نام دریاچه	رنگ نمونه	طول و عرض جغرافیایی	pH	نوع نمونه
A1	آران و بیدگل	روشن	N34 23 34.9, E51 45 53.4	۶/۵۴	آب و رسوب
A2	آران و بیدگل	روشن	N34 39 17.7, E51 50 14.5	۶/۳۶	آب و رسوب
H1	حوض سلطان	-	N34 98 59.1, E50 90 23.1	۷/۲	رسوب

طبق مشاهدات انجام شده، کف دریاچه در ماه‌های تابستان در تمام ایستگاه‌ها پوشیده از کریستال نمک بوده است. بررسی دقیق با استفاده از میکروسکوپ نوری و رشد در محیط کشت جامد انجام شد. همچنین، بررسی‌های دقیق‌تر تفاوت‌های ریخت‌شناسی (اندازه و سلول و شکل کلروپلاست) و فیزیولوژیک (تحمل غلظت‌های مختلف نمک) مختلفی بین سویه‌های خالص‌سازی شده از ایستگاه‌های مختلف انجام شد. ویژگی‌های ریخت‌شناسی و شکل سویه‌ها به ترتیب در شکل ۲ و جدول ۲ نشان داده شده است. بالاترین میزان رشد *Dunaliella* در محیط کشت اختصاصی با نمک طعام ۶٪ مشاهده شد. برای بررسی دقیق‌تر گونه‌ها هر یک به صورت مجزا توسط روش مولکولی شناسایی شدند.



شکل ۲- تصاویر گونه‌های *Dunaliella*: A. *D. viridis* (3/4) و B. *D. parva* (8/1).

Fig. 2. Two species of *Dunaliella*: A. *D. viridis* (3/4), B. *D. parva* (8/1).

جدول ۲- مشخصات ریخت‌شناسی دو گونه *Dunaliella** جداسازی شده از دریاچه‌های مورد بررسی

ویژگی	نام دریاچه	نام سویه
تک‌سلولی، ابعاد سلول ۳ × ۶ میکرومتر شبیه به کلامیدوموناس* با وجه افتراق فقدان دیواره سلولی، کوچک‌تر از *D. salina*، تحت هر شرایط سبز رنگ باقی می‌ماند، دارای دو تاژک با طول یکسان، کلروپلاست فنجانی شکل، دارای پیرنویید مرکزی و حاوی رنگدانه‌های بتاکاروتن، نمک‌دوست به طوری که در غلظت‌های نمک بالاتر از ۶٪ نیز رشد می‌کند.	حوض سلطان	*D. viridis*
تک‌سلولی، ابعاد سلول ۲ × ۵ میکرومتر، فاقد دیواره سلولی، دارای دو تاژک با طول یکسان، کلروپلاست فنجانی شکل، سلول شبیه جلبک کلامیدوموناس با اندازه کوچک‌تر، کوچک‌تر از *D. viridis*، غلظت نمک بالای ۶٪ را تحمل نمی‌کند.	آران و بیدگل	*D. parva*

* به دلیل اینکه سلول‌های *Dunaliella* تحت شرایط مختلف دارای اشکال پلی‌مورف از تخم‌مرغی شکل کشیده و بیضوی می‌باشد، توصیه می‌شود برای شناسایی دقیق، از روش‌های مولکولی استفاده شود.

- محصول PCR

نتایج PCR ناحیه 18S rRNA با استفاده از جفت آغازگرهای SSU1 و ITS1DR مربوط به ژن 18s rRNA باندهایی با وزن مولکولی ۱۷۵۰جفت نوکلئوتید برای نمونه‌های جداسازی شده را تولید کرد. نتایج آنالیز توالی 18S rRNA نمونه‌های جلبکی نشان‌دهنده وجود دو گونه متفاوت است. نتایج شناسایی مولکولی ریزجلبک *Dunaliella* در جدول ۳ آورده شده است.

جدول ۳- نتایج شناسایی مولکولی دو گونه *Dunaliella*

میزان شباهت	سویه نزدیک	شماره دسترسی بانک ژن
٪۹۸	*D. parva* W. Lerche	M62998.1
٪۹۹	*D. viridis* Teodoresco	DQ009776.1

بحث

با توجه به غلظت بالای نمک در دریاچه‌های حوض سلطان و آران و بیدگل و همچنین یافته‌های به دست آمده در این تحقیق، تنها دو گونه از جلبک *Dunaliella* شامل *D. viridi* و *D. parva* جداسازی شد که می‌توان گفت شرایط محیطی در این دریاچه‌ها به گونه‌ای است که سایر ریزجلبک‌ها توانایی رشد در این اکوسیستم را ندارند. در مقایسه با دریاچه ارومیه که نسبت به آب‌های اقیانوس‌ها و آب شیرین دارای میزان تولید اولیه پایین (بیومس جلبکی) و تنوع کمتری از جلبک‌های تک‌سلولی می‌باشد و به دلیل میزان شوری آب و شرایط اکولوژیکی تنوع این ریزجلبک‌ها تفاوت می‌کند (Manaffar 2012). در بررسی‌هایی انجام شده در دریاچه ارومیه، ۱۲ جنس فیتوپلانکتون مورد شناسایی قرار گرفت که شامل شش جنس از سیانوفیسه، چهار جنس از کلروفیسه و دو جنس از باسیلاریوفیسه بود (Riahi *et al.* 2004). در مقایسه با نتایج حاصل از این پژوهش نیز می‌توان گفت پراکنش *Dunaliella* در دریاچه‌های آران و بیدگل و حوض سلطان به دلیل شوری بالا بیشتر از سایر ریزجلبک‌هاست. عاصم و همکاران (Asem *et al.* 2016) نیز چهار گونه شامل *D. bardawil*, *D. parva*, *D. salina*, *D. tertiolecta* از دریاچه ارومیه گزارش کردند. در این تحقیق، مشخص شد، تنوع سویه‌های *Dunaliella* در دریاچه‌های حوض سلطان و آران و بیدگل کمتر از ارومیه می‌باشد، به طوری که تنها دو گونه از *Dunaliella* مشاهده شد که از آن میان، *D. parva* شبیه جلبک دریاچه ارومیه بود در حالی که *D. viridis* هنوز از این دریاچه گزارش نشده است. شایان ذکر است، عسل‌پیشه و همکاران (Asal Pisheh *et al.* 2012)، توانایی روش‌های مولکولی برای شناسایی گونه‌های مختلف جلبک‌های تک‌سلولی واقع در تالاب سد مهاباد را نیز به اثبات رسانده بودند.

شناسایی مولکولی نمونه‌های خالص‌شده در این تحقیق با استفاده از توالی ناحیه 18S rDNA انجام گرفت که این توالی قبلا با موفقیت برای شناسایی چندین گونه از جنس *Dunaliella* استفاده شده بود (Olmos *et al.* 2000, Raja *et al.* 2007b, Hejazi *et al.* 2010, Jayappriyan *et al.* 2010). تحقیقات انجام یافته قبلی، نشان داد که برخی گونه‌های *Dunaliella* توسط پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق با موفقیت قابل شناسایی بوده و بدین ترتیب باندهای مربوط به *D. salina*، *D. parva* و *D. viridis* به ترتیب با اوزان ۱۷۵۰ قابل تشخیص می‌باشند (Olmos *et al.* 2000, Raja *et al.* 2007b, Hejazi *et al.* 2010, Jayappriyan *et al.* 2010). در ضمن با توجه به وجود گونه‌ها و سویه‌های مختلفی از جنس *Dunaliella* و نبود اطلاعات کامل ژنومی 18S rRNA از این ریزجلبک در پایگاه اطلاعات ژنومی NCBI، تعداد زیادی از جمعیت‌های این جنس مورد شناسایی دقیق قرار نگرفته و در حال حاضر این کار نیازمند تعیین توالی و مطالعات تکمیلی نظیر کلونینگ می‌باشد (Olmos *et al.* 2000, Raja *et al.* 2007b, Hejazi *et al.* 2010, Jayappriyan *et al.* 2010). نتایج بررسی‌های اکولوژیکی انجام شده توسط حجازی و همکاران (Hejazi *et al.* 2010) نشان داد که تنوع جلبکی در ارومیه به شدت تابع شرایط اکولوژیک منطقه است، به طوری که تنوع جلبک‌های جداسازی شده در فصل بهار بیشتر از تنوع جلبکی در فصل تابستان بوده که این کاهش تنوع در فصل تابستان می‌تواند به علت افزایش دما و در نتیجه افزایش شوری و تشدید خشکسالی در این فصل باشد. با توجه به این مطالعات، می‌توان دریافت شناسایی دو گونه مختلف *Dunaliella* در فصل تابستان صورت گرفته که احتمالا در فصولی مانند بهار به گونه‌های بیشتری می‌توان دست یافت. همچنین، نتایج بررسی‌های فیزیولوژیک دریاچه‌های حوض سلطان و آران و بیدگل در سه شوری ۳۰، ۶۰ و ۱۰۰ گرم در لیتر نشان می‌دهد که جلبک‌های کشت داده شده در ایستگاه‌های حوض سلطان در مقایسه با دریاچه آران و بیدگل دارای تحمل بالاتری نسبت به غلظت بالای نمک هستند. تحقیقات در آب‌های جزیره قشم نیز روی چهار گونه از جنس *Dunaliella* شامل *D. maritima*، *D. minutisima*، *D. quartolecta* و *D. viridis* براساس خصوصیات ریخت‌شناسی و همچنین خصوصیات فیزیولوژیک از جمله تولید گلیسرول تحت شرایط شوری (۱ تا ۴ مولار نمک)، رشد بهینه در غلظت ۱ یا ۲ مولار نمک (NaCl)، قابلیت تغییر رنگ جلبک از سبز به نارنجی-قرمز و یا عدم قابلیت تغییر رنگ در غلظت‌های بالای نمک (۴ مولار)، انجام شده است (Hosseini *et al.* 2013)؛ اما بررسی‌های مولکولی در مطالعه حاضر نشان داد که تنوع زیادی از گونه‌های جلبک فوق در ایستگاه‌های دریاچه حوض سلطان وجود ندارد و تنها دو گونه متفاوت از *Dunaliella* در این دریاچه‌ها یافت شد، ضمن آنکه این دو گونه توانایی رشد در غلظت‌های ۱ تا ۶ مولار نمک را نیز دارا می‌باشند. از سوی دیگر، تحقیقات انجام یافته روی گونه‌های مختلف جلبک *Dunaliella* نشان داده است که برخی از گونه‌های این جنس توانایی رشد در آب‌های شور با میزان نمک بالا را دارا هستند که این

امر نشان‌دهنده برتری این ریزجلبک برای تولید انبوه زیست توده و بتاکاروتن در استخرهای رو باز آب شور می‌باشد (Rad *et al.* 2011).

شایان ذکر است، امروزه جداسازی و شناسایی فلور جلبکی آب‌های هر منطقه از جمله اهداف مهم تحقیقاتی در اغلب کشورهای جهان محسوب می‌شود، لذا بررسی حاضر در ادامه مطالعاتی که قبلا روی فلورهای تالاب‌ها و جلبک‌های آب‌های شیرین و لب‌شور در مناطق مختلف کشورمان بویژه ارومیه و دیگر دریاچه‌های شور صورت گرفته انجام گردید.

سپاسگزاری

این پروژه با حمایت مالی و تجهیزاتی مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران به انجام رسید که بدین‌وسیله از کلیه کارشناسان این مرکز که نگارندگان را در اجرای این پروژه یاری نمودند تشکر و قدردانی می‌شود.

References

Abusara, N.F., Emeish, S. & Jaber, S.A.K. 2011. The effect of certain environmental factors on growth and β-carotene production by *Dunaliella* sp. isolated from the Dead Sea. Jordan Journal of Biological Sciences 4(1): 29–36.

Asal Pisheh, Z., Heidari, R. & Manaffar, R. 2012. Characterization of two unicellular algae species *Scenedesmus obliquus* and *Desmodesmus cuneatus* from Mahabad dam Lake, West Azerbaijan. Journal of Plant Biology 11: 61–72 (In Persian with English summary).

Asem, A., Eimanifar, A. & Wink, M. 2016. Update of "Biodiversity of the Hypersaline Urmia Lake National Park (NW Iran)". Diversity 8(6): 1–9. doi:10.3390/d8010006.

Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. & Struhl, K. 1995. Short protocols in molecular biology. A compendium of methods from current protocols in molecular biology. 3rd ed. John Wiley & Sons.

Borowitzka, M.A. 1988. Vitamins and fine chemicals. Pp. 153–196. *In*: Borowitzka, M.A. & Borowitzka, L.J. (eds). Microalgal Biotechnology. Cambridge University Press, Cambridge.

Borowitzka, M.A. & Siva, C.J. 2007. The taxonomy of the genus *Dunaliella* (*Chlorophyta*, *Dunaliellales*) with emphasis on the marine and halophilic species. Journal of Applied Phycology 19: 567–590.

Fazeli, M.R., Tofighi, H., Samadi, N. & Jamalifar, H. 2006. Effects of salinity on β-carotene production by *Dunaliella tertiolecta* DCCBC26 isolated from the Urmia salt Lake, north of Iran. Bioresource Technology 97(18): 2453–2456.

Goldberg, I. 1996. Functional foods, designer foods, Pharmafoods, Nutraceuticals. Londres, Gran Bretana: Chapman and Hall, New York.

Hadi, M.R., Shariati, M. & Afsharzadeh, S. 2008. Microalgal biotechnology: carotenoid and glycerol production by *Dunaliella* sp. algae isolated from the Gav-Khooni salt Marsh, Iran. Biotechnology and Bioprocess Engineering 13(5): 540–544.

Hejazi, M.A., Barzegari, A., Gharajeh, N.H. & Hejazi, M.S. 2010. Introduction of a novel 18S rDNA gene arrangement along with distinct ITS region in the saline water microalga *Dunaliella*. Saline Systems 6: 4.

Hosseini, B.B.M., Hadi, M.R., Afsharzadeh, S. & Ghaderi, F. 2013. Identification of four *Dunaliella* from Gheshm Island. Journal of Aquaculture and Fisheries 13: 1–11 (In Persian with English Abstract).

Hosseini, T.A. & Shariati, M. 2006. Pilot culture of three strains of *Dunaliella salina* for β-carotene production in open ponds in the central region of Iran. World Journal of Microbiology and Biotechnology 22: 1003–1006.

Jayappriyan, K.R., Rajkumar, R., Sheeja, L., Nagaraj, S., Divya, S., Divya, S. & Rengasamy, R. 2010. Discrimination between the morphological and molecular identification in the genus *Dunaliella*. International Journal of Current Research 8: 73–78.

Manaffar, R. 2012. Genetic diversity of *Artemia* populations in Lake Urmia, Iran. PhD thesis. Ghent University, Belgium.

Mishra, A., Mondoli, A. & Jha, B. 2008. Physiological characterization and stress-induced metabolic responses of *Dunaliella salina* isolated from salt pan. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 35: 1093–1101.

Nikookar, K., Moradshahi, H. & Kharati, M. 2004. Influence of salinity on the growth pigmentation and ascorbate peroxidase activity of *Dunaliella salina* isolated from Maharlu salt Lake in Shiraz. Iranian Journal of Science and Technology, Transaction A 28(A1): 117–125.

Olmos, J., Paniagua, J. & Contreas, R. 2000. Molecular identification of *Dunaliella* sp. utilizing the 18S rDNA gene. Letters in Applied Microbiology 30(1): 80–84.

Rad, F.A., Aksoz, N. & Hejazi, M.A. 2011. Effect of salinity on cell growth and β-carotene production in *Dunaliella* sp. isolates from Urmia Lake in northwest of Iran. African Journal of Biotechnology 10(12): 2282–2289.

Raja, R., Hemaiswarya, S. & Rengasamy, R. 2007a. Exploitation of *Dunaliella* for β-carotene production. Applied Microbiology Biotechnology 74: 517–523.

Raja, R., Hemaiswarya, S., Balasubramanyam, D. & Rengasamy, R. 2007b. PCR-identification of *Dunaliella salina* (*Volvocales*, *Chlorophyta*) and its growth characteristics. Microbiological Research 162(2): 168–176.

Riahi, H., Soltani, N. & Shakouri, Sh. 2004. A study on algae flora in Urmia Lake. Research & Reconstruction 25: 23–25 (In Persian with English Abstract).

Saba, F., Papizadeh, M., Khansha, J., Sedghi, M., Rasooli, M., Amoozegar, M.A., Soudi, M.R. & Shahzadeh Fazeli, S.A. 2016. A rapid and reproducible genomic DNA extraction protocol for sequence-based identification of archaea, bacteria, cyanobacteria, diatoms, fungi and green algae. Journal of Medical Bacteriology 5(3–4): 22–28.

Salmani Arani, H. 1998. Take a look to Aran-va-Bidgol. Published by Aran-va-Bidgol Literary Association. 96 pp. (In Persian).

Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory.

Shariati, M. & Hadi, M.R. 2000. Isolation, purification and identification of three unicellular green alga species: *Dunaliella salina*, *D. parva* and *D. pseudosalina* from salt Marsh of Gav-Khooni of Isfahan. Iranian Journal of Biology 9(1–4): 45–54.

Tempesta, S., Paoletti, M. & Pasqualetti, M. 2010. Morphological and molecular identification of a strain of the unicellular green algae *Dunaliella* sp. Isolated from *Tarquinia salterns*. Transitional Waters Bulletin 4: 60–70.

Volkman, J.K., Jeffrey, S.W., Nichols, P.D., Rogers, G.I. & Garland, C.D. 1989. Fatty acids and lipid classes of ten species of microalgae used in mariculture. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 128: 219–240.