

بررسی تنوع مولکولی گونه‌های جلبک *Dunaliella* در تعدادی از ایستگاه‌های دریاچه ارومیه

سمیه قربانی^۱، رامین مناف‌فر^{۲*}، افسانه طاعی^۳ و رضا ملک‌زاده^۲
^۱ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
^۲ پژوهشکده آرتمیا و جانوران آبی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
^۳ گروه زیست‌شناسی گیاهی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

چکیده

جلبک *Dunaliella* جنس چیره تک‌سلولی یوکاریوت دریاچه ارومیه است که در سال‌های اخیر به علت خشکسالی شدید دریاچه ارومیه تراکم جمعیت آن به شدت کاهش یافته است. در پژوهش حاضر، تنوع گونه‌های مختلف این جنس با روش مولکولی در تعدادی از ایستگاه‌های دریاچه ارومیه بررسی شد. کولی با انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) و استفاده از جفت پرایمر ژن 18srDNA، گونه‌های مختلف این جنس شناسایی شد. نمونه‌برداری و جداسازی جلبک *Dunaliella* از دریاچه ارومیه نشان داد که با وجود بحران خشکسالی و کاهش تراکم این جلبک حداقل چهار گونه مختلف از جنس *Dunaliella* شامل: *D. salina*، *D. parva*، *D. bardawil* و *D. tertiolecta* در دریاچه ارومیه و در ایستگاه‌های مطالعه شده وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: تنوع مولکولی، جلبک تک‌سلولی، دریاچه ارومیه، *Dunaliella*

مقدمه

(Volkman *et al.*, 1989). از لحاظ اقتصادی این جلبک‌ها در تهیه علوفه، کود و تولید بسیاری از پلی‌ساکاریدهای با ارزش مانند آگار، کاراژینان (carrageenans) و آلژینات‌ها (alginates) حایز اهمیت بوده، مصرف مستقیم این گیاهان و فیکوکلونیدهای قابل استخراج از آنها در حال گسترش است (Chapman and Chapman, 1980).

جلبک‌ها گروه بزرگی از موجودات هستند که از جنبه‌های اقتصادی و بوم‌شناختی اهمیت زیادی دارند. از نظر بوم‌شناختی، جلبک‌ها در پایه هرم انرژی بوم‌نظام‌های عظیم آبی بوده، به عنوان تولیدکنندگان اصلی زنجیره غذایی، تثبیت‌کنندگان ازت و ایجاد بوم‌نظام ویژه و تأمین غذای آبزیان اهمیت دارند

؛Borowitzka and Siva, 2007؛Fazeli *et al.*, 2006
(Hadi *et al.*, 2008). بتاکاروتن رنگیزه‌ای زردرنگ در
فرآورده‌های غذایی و غذاهای رژیمی است و به دلیل
دارا بودن خواص ضدسرطانی و آنتی‌اکسیدانی در
صنایع دارویی کاربرد فراوانی یافته و در سال‌های اخیر
کشت این جلبک برای تولید کارتنوئیدها افزایش یافته
است (Raja *et al.*, 2006؛ Hosseini and Shariati, 2006؛
Jayappriyan *et al.*, 2010؛ 2007a).

جدول ۱- رده‌بندی و جایگاه جنس *Dunaliella* (Borowitzka
and Siva, 2007).

رده‌بندی <i>Dunaliella</i>	
<i>Eukaryota</i>	دامنه
<i>Plantae</i>	سلسله
<i>Viridaplantae</i>	زیرسلسله
<i>Chlorophyta</i>	شاخه
<i>Chlorophyceae</i>	رده
<i>Dunaliellales</i>	راسته
<i>Dunaliellaceae</i>	خانواده
<i>Dunaliella</i>	جنس

دریاچه ارومیه بزرگ‌ترین پهنه آبی در شمال غربی
ایران، بین دو استان آذربایجان غربی و آذربایجان شرقی
در مختصات جغرافیایی ۳۷ درجه تا ۳۸/۵ درجه عرض
شمالی و ۴۵ تا ۴۶ درجه طول شرقی واقع شده است.
سطح آن نسبت به سطح آب دریاهاى آزاد ۱۳۰۰ متر
بالا تر است. این دریاچه بیستمین دریاچه بزرگ دنیا و
دومین دریاچه شور پس از بحرالمت محسوب می‌شود.
میانگین مساحت آن ۵۰۰۰ کیلومتر مربع برآورد شده
است. حدود ۲۰ رودخانه دایمی و فصلی و همچنین
تعدادی از جریان‌های زیرسطحی و فصلی، دریاچه
ارومیه را تغذیه می‌کنند (Manaffar, 2012). این

جلبک‌های تک‌سلولی منبع تولید بسیاری از مواد
غذایی مختلف هستند (Goldberg, 1996). هم اکنون
انواع مختلفی از گونه‌ها و جنس‌های مختلف از
جلبک‌های تک‌سلولی در دنیا به شکل انبوه در مخازن
پلی اتیلنی، استخرهای بتونی و خاکی به شکل کاملاً
خالص و تجاری کشت داده می‌شوند (Lavens and
Sorgeloos, 1996). بررسی تنوع گونه‌ای جلبک‌های
بومی منطقه و بررسی ارزش غذایی و اهمیت آنها از
مهم‌ترین پژوهش‌های بنیادی در ابتدای راه
تجاری‌سازی و صنعتی کردن پرورش جلبک‌ها است.
بر اساس مطالعات انجام شده منابع آب‌های داخلی منبع
بسیار مهم و سرشاری از انواع جلبک‌های تک‌سلولی
هستند (Hadi *et al.*, 2000؛ Shariati and Hadi, 2000؛
Asal Pische *et al.*, 2012؛ 2008). شناسایی گونه و
جنس‌های این جلبک‌ها نخستین گام در کاربردی
نمودن استفاده از جلبک‌ها و کشت آنهاست و با
شناسایی و بررسی فیزیولوژیک آنها می‌توان سیستم‌های
کشت، محیط‌های کشت و ارزش غذایی آنها را بررسی
و گونه‌ها و جنس‌های بومی مفید برای آبرزی پروری را
به شکل خالص جداسازی کرد.

Dunaliella از جلبک‌های تک‌سلولی مهم متعلق
به رده Chlorophyceae و دارای ۲۹ گونه است.
گونه‌های این جنس به دلیل توانایی تولید گلیسیرول
قادر به زندگی در شوری‌های بسیار بالا بوده، مقادیر
بالای انواع کارتنوئید به ویژه بتاکاروتن را نیز در خود
جمع می‌کند (Borowitzka and Siva, 2007؛ Hadi
et al., 2008؛ Abusara *et al.*, 2011) (جدول ۱).
D. salina یکی از گونه‌های مهم تولید کننده
بتاکاروتن شناخته شده است (Nikookar *et al.*, 2004)؛

نظیر *Dunaliella* و Cyanophyceae و Diatoms گزارش شده است. البته جنس *Dunaliella* فیتوپلانکتون چیره در دریاچه ارومیه است (Manaffar, 2013; Sorgeloos, 1997).

هدف از اجرای این پژوهش، بررسی، شناسایی و کشت خالص گونه های مختلف جلبک تک سلولی *Dunaliella* از دریاچه ارومیه و به ویژه بررسی تنوع این جلبک در دریاچه ارومیه پس از بحران چندین ساله خشکسالی است. بدین منظور گونه های مختلف این جنس از لحاظ ریخت شناسی و مولکولی شناسایی و پس از جداسازی روی محیط کشت جامد به شکل انبوه در سیستم پرورش بسته کشت داده شدند.

مواد و روش ها نمونه برداری

نمونه برداری از آب دریاچه ارومیه طی دو فصل بهار و تابستان سال ۱۳۹۰ از پنج نقطه مختلف ساحلی دریاچه ارومیه در ساعات میانی روز که تابش نور خورشید بیشینه است، انجام شد. بدین منظور در هر ایستگاه از کل ستون آب، ۱۰ لیتر از آب توسط ظروف پلی اتیلنی برداشت شد. میزان شوری آب توسط دستگاه شوری سنج (Refractometer model ATAGO) و اسیدیته توسط دستگاه pH متر (model HANA) در محل نمونه برداری تعیین شد. نمونه های آب بلافاصله به آزمایشگاه جلبک شناسی پژوهشکده آرتمیا و جانوران آبرزی دانشگاه ارومیه انتقال داده شد. مختصات جغرافیایی محل های نمونه برداری در شکل ۱ مشخص شده است.

دریاچه به عنوان یکی از تالاب های بین المللی در کنوانسیون رامسر و همچنین، به عنوان ذخیره گاه زیست کره یونسکو به ثبت رسیده است (Birkett and Mason, 1995).

در سال های اخیر به علتی بحران خشکسالی منطقه ای، دریاچه ارومیه نیز دستخوش خشکسالی گسترده ای شده است. بستر خشک حاصل از پس روی شدید دریاچه (بیش از ۳۰۰۰ کیلومتر مربع) به ویژه در نواحی جنوبی دریاچه ارومیه شاهد این ادعا است. تاکنون حدود ۴ متر از میانگین سطح آب دریاچه در سال های ۱۳۷۵-۱۳۷۸ که سال های پُر آبی دریاچه ارومیه بوده است، کاهش یافته است. میانگین شوری آب دریاچه که در سال های پُر آبی در حدود ۱۵۰ گرم در لیتر بود، هم اکنون به بیش از ۳۰۰ گرم در لیتر (حالت اشباع) رسیده است (Rad et al., 2011).

به علت افزایش دما و شوری آب، جمعیت *Artemia* (تنها جانور دریاچه ارومیه) به شدت کاهش یافته است (Manaffar, 2012). در حقیقت، بخشی از کاهش جمعیت *Artemia* به علت کاهش شدید جمعیت جلبک تک سلولی *Dunaliella* در دریاچه است (Rad et al., 2011). شوری بالا همچنین، باعث ایجاد تنش و تولید بتاکارتن در این جلبک می شود. حتی در برخی مواقع نیز تجمع این جلبک در داخل دریاچه باعث ایجاد رنگ قرمز در برخی نواحی دریاچه شده است (Rad et al., 2011). پژوهش های انجام شده پیش از بحران خشکسالی در دریاچه ارومیه نشان داده است که گونه های مختلفی از جنس های متفاوت جلبک های تک سلولی در دریاچه ارومیه وجود داشته است. جنس های گوناگون از رده Chlorophyceae

پس از آن، برای جداسازی کامل این جنس از دیگر جلبک‌های تک‌سلولی، استوک حاصل از مرحله پیش روی محیط کشت جامد (محیط کشت walne با شوری ۳۰ و ۱۰۰ گرم در لیتر در آگاروز یک درصد) منتقل شد. پلیت‌های آماده شده به انکوباتور با دمای ۲۳ درجه سانتیگراد و در معرض نور ممتد فلورسنت با شدت $50 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ انتقال داده شدند. کشت تک‌کلونی روی محیط کشت آگار (کشت سریالی) حدود ۵ بار تکرار شد تا ضمن خلوص بیشتر آلودگی باکتریایی نیز از محیط کشت حذف شود. کلونی‌های منفرد ایجاد شده با پیت پاستور برداشت شده، پس از اطمینان از خلوص آنها توسط میکروسکوپ نوری، به شکل مجزا در لوله‌های آزمایش حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت walne کشت داده شد. سپس، نمونه‌های خالص‌سازی شده به منظور افزایش حجم به ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری با محیط کشت walne انتقال داده شدند. در صورت وجود هر گونه ناخالصی جلبکی، مراحل یاد شده در بالا تکرار شد.

تفاوت‌های ریخت‌شناختی ابتدایی شامل رنگ کلونی، رنگ بیوماس در محیط کشت مایع، ریخت‌شناختی جلبک و سایر عوامل فیزیولوژیک نظیر سرعت رشد در دو شوری متفاوت به عنوان شاخص‌های مهم ابتدایی برای جداسازی کلونی‌ها در نظر گرفته شد. برای شناسایی نخستین نمونه‌های خالص از ویژگی‌های ریخت‌شناختی و فیزیولوژیک شامل اندازه و شکل سلول و شکل کلروپلاست استفاده شد (Borowitzka and Siva, 2007). با توجه به شباهت‌های ریخت‌شناختی گونه‌های مختلف جنس *Dunaliella* و تغییر ریخت‌شناسی و رفتار فیزیولوژیک این گونه تحت شرایط رشدی متفاوت،



شکل ۱- عکس هوایی دریاچه ارومیه و محل‌های نمونه‌برداری. ۱: ابتدای جاده شهید کلاتری در سمت جنوب، ۲: انتهای جاده شهید کلاتری در سمت جنوب، ۳: گمیچیلر، ۴: انتهای جاده شهید کلاتری در سمت شمال، ۵: ابتدای جاده شهید کلاتری در سمت شمال.

کشت و جداسازی

نمونه‌های آبی هر ایستگاه، پس از جدا کردن ناخالصی‌ها توسط فیلتر ۱۰۰ میکرونی معمولی، در دو شوری ۳۰ و ۱۰۰ گرم در لیتر در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری در محیط کشت ویژه جلبک‌های تک‌سلولی (walne)، تحت جریان ملایم هوادهی و نور فلورسنت کشت داده شد (Mishra et al., 2008؛ Jayappriyan et al., 2010). جداسازی جنس *Dunaliella* با روش مستقیم زیر میکروسکوپ معمولی (invert) و همچنین با کشت سریالی روی محیط کشت جامد انجام شد (Mishra et al., 2008؛ Jayappriyan et al., 2010). بدین منظور نخست کوشش شد با استفاده از پیت پاستور و با درشت‌نمایی ۴۰ میکروسکوپ معمولی، تعدادی از سلول‌های جلبک *Dunaliella* جدا شود.

نتایج

شاخص های فیزیوشیمیایی محل نمونه برداری

نتایج بررسی برخی از شاخص های فیزیوشیمیایی نمونه آبی محل نمونه برداری در جدول ۲ مشخص شده است.

نتایج نشان داد که علاوه بر افزایش تدریجی شوری آب در تابستان، اسیدیته نیز به طور تدریجی کاهش یافته است. همچنین، رنگ آب نیز در تابستان در همه ایستگاه ها قرمز بوده، کف دریاچه نیز در تمام ایستگاه ها پوشیده از کریستال نمک بوده است. نتایج بررسی های نخستین نشان داد که تنوع گونه ای در فصل بهار بیش از فصل تابستان و همچنین، در ایستگاه شماره سه بیش از دیگر ایستگاه ها بود. بررسی دقیق با استفاده از میکروسکوپ نوری و پرورش در محیط کشت جامد، تفاوت های ریخت شناختی و فیزیولوژیک مختلفی (سرعت رشد متفاوت و رنگ کلونی) بین کلونی های خالص سازی شده از ایستگاه های مختلف مشاهده شد که برای بررسی دقیق تر گونه های احتمالی به شکل مجزا با روش مولکولی بررسی شد.

محصول PCR

انجام PCR اختصاصی ناحیه ژنومی 18srDNA به وسیله جفت آغازگرهای MA1 و MA2 باندهایی با وزن های مولکولی ۲۱۷۰، ۲۵۷۰، ۱۱۷۰ و ۲۵۷۰ جفت نوکلئوتید برای نمونه های جداسازی شده (شکل ۲) را تولید کرد که به ترتیب با اعداد ۱ تا ۴ در شکل ۳ مشخص شده اند. نتایج PCR نمونه های جلبکی نشان دهنده وجود تنوع گونه ای است.

بررسی نتایج برش آنزیمی انجام شده توسط آنزیم *TaqI* نشان دهنده کمینه چهار الگوی مختلف برش

شناسایی دقیق گونه ها با روش های ریخت شناختی معمول امکان پذیر نیست بلکه صرفاً با روش های مولکولی امکان پذیر است (Olmos *et al.*, 2000; Tempesta *et al.*, 2010).

بررسی مولکولی

روش استخراج DNA و شرایط PCR

استخراج DNA از سوسپانسیون سلولی کلونی های جداسازی شده و خالص با روش Hexa CTAB (decyltrimethylammonium bromide) انجام شد (Ausubel *et al.*, 1995; Sambrook *et al.*, 1989). برای شناسایی مولکولی گونه های *Dunaliella* از ژن 18srDNA استفاده شد (Olmos *et al.*, 2000; Jayappriyan *et al.*, 2010). برای تکثیر ناحیه 18srDNA، از جفت آغازگر MA1 و MA2 با توالی 5'-cgg gat ccg tag tca tat gct tgt ctc-3' و 5'-cgg aat tcc ttc tgc agg ttc acc-3' استفاده شد (Olmos *et al.*, 2000). برنامه PCR شامل دمای تفکیک کننده ابتدایی ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه، ۳۳ چرخه شامل دمای واسرشت کننده ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه، دمای اتصال ۵۲ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه، دمای گسترش ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه و ۲۰ ثانیه و در نهایت، دمای گسترش نهایی ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۴ دقیقه بود. محصول PCR روی ژل الکتروفورز ۱/۵ درصد بررسی شد (Olmos *et al.*, 2000).

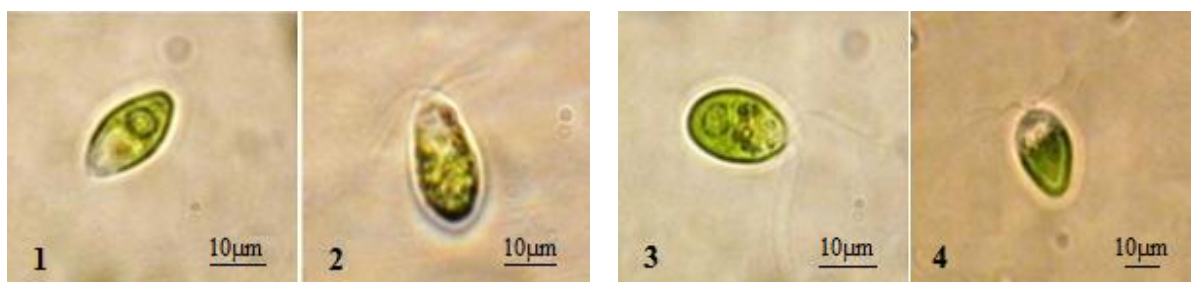
برش آنزیمی

محصول PCR با آنزیم اندونوکلاز *TaqI* بریده شد. بدین منظور بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده اقدام شد و محصول برش آنزیمی روی ژل آگاروز ۱/۷ درصد بررسی شد.

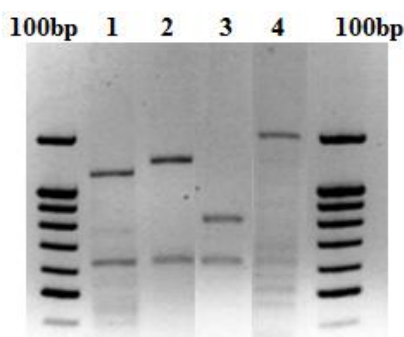
است. این برش آنزیمی در تأیید بررسی ریخت‌شناختی و بررسی وزن محصول PCR نشان‌دهنده همان تنوع چهارگانه مشاهده شده در نمونه‌های جلبکی مطالعه شده است (شکل ۴).

جدول ۲- شاخص‌های فیزیکوشیمیایی آب ناحیه بررسی شده

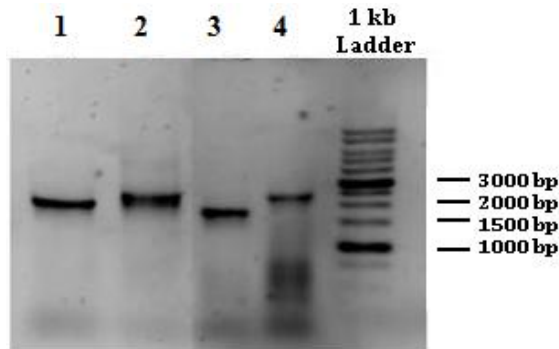
عمق آب cm	کف دریاچه	رنگ آب	اسیدیته	شوری g/l	ایستگاه	فصل نمونه‌برداری
۴۰	رسوبات	روشن	۷/۲	۳۲۴	۱	بهار خردادماه ۹۰
۶۵	رسوبات	روشن	۷/۳	۳۴۰	۲	
۳۰	کریستال نمک	روشن	۷/۲۸	۳۲۲	۳	
۵۰	رسوبات	روشن	۷/۲۶	۳۲۴	۴	
۳۰	رسوبات	قرمز	۷/۲	۳۲۸	۵	
۲۲	کریستال نمک	قرمز	۶/۹۵	۳۸۰	۱	تابستان شهریورماه ۹۰
۲۰	کریستال نمک	قرمز	۶/۸۷	۳۲۰	۲	
۱۰	کریستال نمک	قرمز	۶/۷۶	۳۶۰	۳	
۳۰	کریستال نمک	قرمز	۶/۸۹	۳۰۰	۴	
۳۵	کریستال نمک	قرمز	۶/۸۶	۳۸۰	۵	



شکل ۲- تصویر میکروسکوپ نوری از جنس *Dunaliella* خالص شده از پنج ایستگاه مطالعه شده دریاچه ارومیه. بررسی دقیق توسط میکروسکوپ نوری بر تفاوت‌های ریخت‌شناختی و احتمال متفاوت بودن این چهار گونه تأیید دارد. 1) *D. salina*، 2) *D. bardawil*، 3) *D. tertiolecta*، 4) *D. parva*



شکل ۴- برش آنزیمی محصول PCR جلبک‌های خالص شده از دریاچه ارومیه. اعداد اشاره شده با نمونه‌های شکل‌های ۲ و ۳ مطابقت دارند.



شکل ۳- محصول PCR حاصل از نمونه‌های جلبک‌های خالص شده از دریاچه ارومیه. تنها الگوهای جدید نشان داده شده است. اعداد ۱ تا ۴ با نمونه‌های ارایه شده در شکل ۲ مطابقت دارد.

بحث

بررسی و شناسایی فلور جلبکی آب های هر منطقه از اهداف مهم پژوهشی در اغلب کشورهای جهان است. در سال های اخیر پژوهش های محدودی در کشور ایران روی فلور تالاب ها و جلبک های آب های شیرین و لب شور انجام شده است. از جمله پژوهش های اخیر انجام شده، بررسی و شناسایی تراکم و پراکنش فیتوپلانکتون های دریاچه سد لار است که در آن، طی شش مرحله نمونه برداری ۱۴ جنس از شاخه جلبک های Diatoms، ۱ جنس از شاخه Euglenophyceae، ۷ جنس از شاخه جلبک های سبز، ۳ جنس از شاخه جلبک های Pyrrrophyta، ۱ جنس از شاخه جلبک های Chlorophyceae و ۲ جنس از شاخه جلبک های سبز آبی را شناسایی کند (Salavatian et al., 2010). طی نمونه برداری هایی که از باتلاق شور گاوخونی انجام شد، سه گونه مختلف از جنس *Dunaliella* بر اساس تفاوت های ریخت شناسی و فیزیولوژیک خالص سازی شد و با روش های مولکولی گونه های *D. parva*، *D. pseudosalina* و *D. salina* شناسایی شدند (Shariati and Hadi, 2000). همچنین، Orlova همکارانش ۳۵۷ گونه از ریز جلبک های دریایی را طی سال های ۱۹۹۱ تا ۲۰۰۶ در دریای Amursky Bay واقع در کشور روسیه شناسایی کردند (Orlova et al., 2009).

پژوهش های انجام شده روی گونه های مختلف جنس *Dunaliella* نشان داده است که تعدادی از گونه های این جنس می توانند در شوری های بالا به خوبی رشد کنند و حتی توانایی تولید مقادیر بالایی از

بتاکارتن را دارند (Rad et al., 2011). این بررسی ها همچنین نشان داده است که حتی برخی گونه ها از جمله *D. salina* در تولید بتاکارتن نسبت به دیگر گونه ها توانایی بیشتری دارند (Garcia et al., 2007; Hadi et al., 2008).

دریاچه ارومیه به عنوان دریاچه الیگوتروف (Manaffar, 2012) با میزان تولید اولیه پایین (بیوماس جلبکی) دارای تنوع و مقدار کمتری از جلبک های تک سلولی نسبت به آب های اقیانوس ها و آب های شیرین است. تنوع جنس ها بسته به میزان شوری آب متفاوت است. در بررسی هایی که در سال ۱۳۷۳ روی دریاچه ارومیه انجام شد، حدود ۱۲ جنس فیتوپلانکتون شناسایی شد که شامل ۶ جنس از Cyanophyceae، ۴ جنس از Chlorophyceae و ۲ جنس از Bacillariophyceae بود (Manaffar, 2013). در بررسی دقیق تر در سال ۱۳۷۵، در ۱۸ ایستگاه از دریاچه ارومیه، ۶ جنس از سه رده Chlorophyceae، Bacillariophyceae و Cyanophyceae شناسایی شد که از نظر تنوع، جنس های مختلف رده Chlorophyceae و Bacillariophyceae هر کدام با یک جنس کمترین تنوع را نشان دادند. البته در بین فیتوپلانکتون ها، جنس *Dunaliella* به طور غالب (۸۰ درصد) در ۱۸ ایستگاه مشاهده شد (Manaffar, 2013). در تحقیقات پژوهشگران بلژیکی در سال ۱۹۹۷ روی ۱۸ ایستگاه از دریاچه ارومیه، مشخص شد که جنس *Dunaliella*، جلبک سبز تک سلولی غالب در این محل ها بوده، به طوری که غلظت آن ۱۰ برابر گونه های دیگر بود (Sorgeloos, 1997).

وجود دارد. نتایج حاصل از برش آنزیمی نیز حداقل چهار الگوی مختلف برش را نشان می‌دهد (شکل‌های ۳ و ۴).

شایان ذکر است با توجه به وجود گونه‌ها و سویه‌های مختلف از جنس *Dunaliella* و مشخص نبودن اندازه دقیق باند، تعداد زیادی از جمعیت‌های این جنس، شناسایی دقیق یا احتمالی گونه‌های یافت شده در پژوهش حاضر با توزین باند تولید شده غیر علمی بوده، نیازمند تعیین توالی و مطالعات تکمیلی است. نتایج بررسی‌های بوم‌شناختی نشان داد که تنوع جلبکی در این ایستگاه‌ها به شدت تابع شرایط بوم‌شناختی منطقه است، به طوری که تنوع جلبک‌های جداسازی شده در فصل بهار بیشتر از تنوع جلبکی در فصل تابستان بود. این کاهش می‌تواند به دلیل افزایش دما و در نتیجه افزایش شوری و تشدید خشکسالی در این فصل باشد. همچنین، نتایج بررسی‌های ریخت‌شناختی و فیزیولوژیک جلبک‌های خالص‌سازی شده و کشت شده در دو شوری ۳۰ و ۱۰۰ گرم در لیتر نشان داد که تنوع جلبکی در ایستگاه ۳ بیشتر بود و بررسی‌های مولکولی نیز آن را تأیید کرد. در هر حال، پژوهش حاضر نشان داد که تنوع زیادی از گونه‌های *Dunaliella* در ایستگاه‌های دریاچه ارومیه وجود دارد که در ادامه این پژوهش به شکل جامع در تمامی نقاط دریاچه با استفاده از تعیین توالی در حال اجراست.

سپاسگزاری

این مطالعه با حمایت مالی و تجهیزات پژوهشگرانه آرتمیا و جانوران آبزی دانشگاه ارومیه انجام شد. از کارشناسان این پژوهشگرانه که در اجرای این پروژه نقش داشته‌اند، قدردانی و سپاسگزاری می‌شود.

شایان ذکر است که شناسایی میکروارگانیسم‌ها به ویژه جلبک‌های تک‌سلولی توسط ویژگی‌های ریخت‌شناختی و فیزیولوژیکی از دقت کافی برخوردار نیست، اما توسعه ابزارهای بیوتکنولوژیک پیشرفته مانند PCR امکان شناسایی دقیق میکروارگانیسم‌ها را فراهم کرده است (Olmos *et al.*, 2000).

پیش از این، روش‌های مولکولی برای شناسایی گونه‌های مختلف جلبک‌های تک‌سلولی ثابت شده بود (Asal Pishhe *et al.*, 2012). در پژوهش حاضر، شناسایی مولکولی نمونه‌های خالص شده توسط توالی ناحیه 18srDNA انجام شد که پیش از این توالی با موفقیت برای شناسایی چندین گونه از جنس *Dunaliella* استفاده شده بود (Olmos *et al.*, 2000؛ Hejazi *et al.*, 2010؛ Raja *et al.*, 2007b؛ Jayappriyan *et al.*, 2010). پیش از این، کاربرد پرایمرهای استفاده شده در این پژوهش برای شناسایی جلبک *Dunaliella* موفقیت‌آمیز بوده است (Olmos Hejazi *et al.*, Raja *et al.*, 2007b؛ *et al.*, 2000؛ Jayappriyan *et al.*, 2010). بدین ترتیب باندهایی که به *D. parva*، *D. salina*، *D. tertiolecta* و *D. bardawil* مربوط بودند به ترتیب با وزن‌های ۱۷۷۰، ۲۱۷۰، ۲۵۷۰ و ۲۵۷۰ جفت باز تشخیص داده شدند. پژوهش‌های Hejazi و همکاران (۲۰۱۰) نشان داد که برش آنزیمی با آنزیم *TaqI* قادر است محصول PCR تولید شده را به حداقل چهار قطعه کوچکتر در *D. salina* برش دهد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که دست کم چهار گونه (یا سویه) مختلف از جلبک تک‌سلولی *Dunaliella* با وزن‌های مولکولی بین ۱۵۰۰ تا ۲۵۰۰ کیلو باز که به ژن 18srDNA مربوط می‌شود،

منابع

- Abusara, N. F., Emeish, S. and 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 Pische, Z., Heydari, R. and Manaffar, R. (2012) Characterization of two unicellular algae species *Senedesmus obliquus* and *Desmdeumus cuneatus* from Mahabad dam lake, west Azarbyjan. *Journal of Plant Biology* 4(11): 61-72 (in Persian).
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. (1995) Short protocols in molecular biology. a compedium of methods from current protocols in molecular biology. 3rd Ed, John Wiley & Sons, Inc., New York
- Birkett, C. and Mason, I. (1995) A new global database for remote sensing programme studying climatically sensitive large lakes. *Journal of Great Lake Research* 21(3): 307-318.
- Borowitzka, M. A. and 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.
- Chapman, V. J. and Chapman, D. J. (1980) *Seaweeds and their uses*. 3rd edition, Chapman and Hall, London.
- Fazeli, M. R., Tofighi, H., Samadi, N. and 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.
- Garcia, F., Freile-Pelegrin, Y. and Robledo, D. (2007) Physiological characterization of *Dunaliella* sp. (Chlorophyta, Volvocales) from Yucatan, Mexico. *Bioresource Thechnology* 98: 1359-1365.
- Goldberg, I. (1996) *Functional foods, designer foods, pharmafood, nutraceuticals*. londres, gran bretana: Chapman and Hall, New York.
- Hadi, M. R., Shariati M. and Afsharzadeh S. (2008) Microalgal biotechnology: carotenoid and glycerol production by *Dunaliella* sp. algae isolated from the Gave Khooni salt marsh, Iran. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 13(5): 540-544.
- Hejazi, M. A., Barzegari, A., Hosseinzadeh, G. N. and Hejazi, M. S. (2010) Introduction of a novel 18SrDNA gene arrangement along with distinct ITS region in the saline water microalga *Dunaliella*. *Saline Systems* 6: 4.
- Hosseini, T. A. and 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. and Rengasamy, R. (2010) Discrimination between the morphological and molecular identification in the genus *Dunaliella*. *International Journal of Current Research* 8: 73-78.
- Lavens, P. and Sorgeloos, P. (1996) *Manual on the production and use of live food for aquaculture*. Laboratory of Aquaculture and *Artemia* Reference center, University of Ghent Belgium, Belgium.
- Manaffar, R. (2012) Genetic diversity of *Artemia* populations in Lake Urmia, Iran. PhD thesis, Ghent University, Belgium.
- Manaffar, R. (2013) Study on species diversity and natural abundance on unicellular algae in Lake Urmia. Final report of research project, Urmia University, Urmia, Iran (in Persian).
- Mishra, A., Mondoli, A. and Jha, B. (2008) Physiological characterization and stress-induced metabolic responses of *Dunaliella salina* isolated from salt pan. *Journal Industrial Microbiology Biotechnology* 35: 1093-1101.

- Nikookar, K., Moradshahi, H. and 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: Science 28(A1): 117-125.
- Olmos, J., Paniagua, J. and Contreas, R. (2000) Molecular identification of *Dunaliella* sp. utilizing the 18SrDNA gene. Letters in Applied Microbiology 30(1): 80-84.
- Orlova, T. Y., Stonik, I. V. and Shevchenko, O. G. (2009) Flora of planktonic microalgae of Amursky Bay, sea of Japan. Russian Journal of Marine Biology 35(1): 60-78.
- Rad, F. A., Aksoz, N. and 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. and Rengasamy, R. (2007b) Exploitation of *Dunaliella* for β -carotene production. Applied Microbiology Biotechnology 74: 517-523.
- Raja, R., Hemaiswarya, S., Balasubramanyam, D. and Rengasamy, R. (2007a) PCR-identification of *Dunaliella salina* (Volvocales, Chlorophyta) and its growth characteristics. Microbiological Research 162(2): 168-76.
- Salavatian, S. M., Abdolapour, H., Nezami, Baluchie, Sh., Makarami, M. and Pourgolami mogaddam, A. (2010) Identification and comparison of seasonal phytoplankton density in Lar dam lake. Journal of Wetland Ecobiology 2(3): 26-38 (in Persian).
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Shariati, M. and Hadi, M. R. (2000) Isolation, purification and identification of three unicellular green alga species of *D. salina*, *D. parva* and *D. pseudosalina* from salt marsh of Gave Khooni of Isfahan. Iranian Journal of Biology 9(1-4): 45-54.
- Sorgeloos, P. (1997) Lake Urmia cooperation project- contract item A, report on the determination and identification of biological characteristics of *Artemia urmiana* for application in aquaculture. Laboratory of Aquaculture and *Artemia* Reference Center, Gent University, Belgium.
- 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. and 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.

A study on molecular diversity of *Dunaliella* algae species in some of Urmia Lake's stations

Somayeh Ghorbani¹, Ramin Manaffar^{2*}, Afsaneh Taei³ and Reza Malekzadeh²

¹Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Urmia, Urmia, Iran

²*Artemia* and Aquatic Animals Research Institute, University of Urmia, Urmia, Iran

³Department of Plant Science, College of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran

Abstract

Dunaliella is a dominant unicellular Eukaryote alga genus in the Urmia Lake. Recently, the density of this genus has been vastly decreased owing to Urmia Lake intense desiccation. This study investigated the species diversity of *Dunaliella* in Urmia Lake stations. Species determination was based upon Polymerase Chain Reaction (PCR) method using the combinations of 18srDNA gene primers. The sampling and subsequent isolation of the *Dunaliella* species from the Urmia Lake stations revealed that in spite of the Urmia Lake intense crisis and severe density decrease of the algae, at least 4 species of *Dunaliella* namely *D. bardawil*, *D. parva*, *D. salina* and *D. tertiolecta* existed in the studied stations of the Urmia Lake.

Key words: Molecular diversity, Unicellular algae, Urmia Lake, *Dunaliella*

* Corresponding Author: r.manaffar@urmia.ac.ir