زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال پنجم، شماره هفدهم، پاییز ۱۳۹۲، صفحه ۸۹-۹۸
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۰۶/۲۶
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۱/۱۰/۱۳
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۱/۱۲/۰۷

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 آبزی، 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 پلیمراز (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. bardawil*، *D. parva*، *D. salina* و *D. tertiolecta* در دریاچه ارومیه و در ایستگاه‌های مطالعه شده وجود دارد.

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

مقدمه

جلبک‌ها گروه بزرگی از موجودات هستند که از جنبه‌های اقتصادی و بوم‌شناختی اهمیّت زیادی دارند. از نظر بوم‌شناختی، جلبک‌ها در پایه هرم انرژی بوم‌نظام‌های عظیم آبی بوده، به عنوان تولید کنندگان اصلی زنجیره غذایی، تثبیت کنندگان ازت و ایجاد بوم‌نظام ویژه و تأمین غذای آبزیان اهمیّت دارند (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 اهمیّت بوده، مصرف مستقیم این گیاهان و فیکوکلوئیدهای قابل استخراج از آنها در حال گسترش است (Chapman and Chapman, 1980).

*نویسنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: r.manaffar@urmia.ac.ir، شماره تماس: ۰۴۴۱۳۴۴۰۲۹۵

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 اهمیّت 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 (Shariati and Hadi, 2000؛ Hadi *et al*,. 2008؛ Asal Pishe *et al*., 2012) 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 آبزی پروری را به شکل خالص جداسازی کرد.

Dunaliella از جلبک‌های تک سلولی 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؛ 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 (Hosseini and Shariati, 2006؛ Raja *et al*., 2007a؛ Jayappriyan *et al*., 2010).

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

رده‌بندی *Dunaliella*	
دامنه	*Eukaryota*
سلسله	*Plantae*
زیرسلسله	*Viridaeplantae*
شاخه	*Chlorophyta*
رده	*Chlorophyceae*
راسته	*Dunaliellales*
خانواده	*Dunaniellaceae*
جنس	*Dunaliella*

دریاچه ارومیه بزرگ‌ترین پهنه آبی در شمال‌غربی 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 دریاهای آزاد ۱۳۰۰ متر بالاتر است. این دریاچه بیستمین دریاچه بزرگ دنیا و دومین دریاچه شور پس از بحرالمیت 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

دریاچه به عنوان یکی از تالاب‌های بین‌المللی در کنوانسیون رامسر و همچنین، به عنوان ذخیره‌گاه زیست‌کره یونسکو به ثبت رسیده است (Birkett and Mason, 1995).

در سال‌های اخیر به علتی بحران خشکسالی منطقه‌ای، دریاچه ارومیه نیز دستخوش خشکسالی گسترده‌ای شده است. بستر خشک حاصل از پس‌روی 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 سال‌های ۱۳۷۵-۱۳۷۸ که سال‌های پُر آبی دریاچه ارومیه بوده است، کاهش یافته است. میانگین شوری آب دریاچه که در سال‌های 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 تک‌سلولی *Dunaliella* در دریاچه است (Rad *et al*., 2011). شوری بالا همچنین، باعث ایجاد تنش و تولید بتاکارتن در این جلبک می‌شود. 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). پژوهش‌های انجام شده پیش از بحران خشکسالی در دریاچه ارومیه نشان داده است که گونه‌های مختلفی از جنس‌های متفاوت جلبک‌های تک‌سلولی در دریاچه ارومیه وجود داشته است. جنس‌های گوناگون از رده Chlorophyceae نظیر *Dunaliella*، Diatoms و Cyanophyceae 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 گونه‌های مختلف جلبک تک‌سلولی *Dunaliella* از دریاچه ارومیه و به ویژه بررسی تنوع این جلبک در دریاچه ارومیه پس از بحران چندین ساله خشکسالی است. بدین منظور گونه‌های مختلف این جنس از لحاظ ریخت‌شناسی و مولکولی شناسایی و پس از جداسازی روی محیط کشت جامد به شکل انبوه در سیستم پرورش بسته کشت داده شدند.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

نمونه‌برداری 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 شوری‌سنج (Refractometer model ATAGO) و اسیدیته توسط دستگاه pHمتر (model HANA) در محل نمونه‌برداری تعیین شد. نمونه‌های آب بلافاصله به آزمایشگاه جلبک‌شناسی پژوهشکده آرتمیا و جانوران آبزی دانشگاه ارومیه انتقال داده شد. مختصات جغرافیایی محل‌های نمونه‌برداری در شکل ۱ مشخص شده است.

شکل ۱- عکس هوایی دریاچه ارومیه و محل‌های نمونه‌برداری. ۱: ابتدای جاده شهید کلانتری در سمت جنوب، ۲: انتهای جاده شهید کلانتری در سمت جنوب، ۳: گمیچیلر، ۴: انتهای جاده شهید کلانتری در سمت شمال، ۵: ابتدای جاده شهید کلانتری 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 (Jayappriyan *et al*., 2010؛ Mishra *et al*., 2008). بدین منظور نخست کوشش شد با استفاده از پیپت پاستور و با درشت‌نمایی ۴۰ میکروسکوپ معمولی، تعدادی از سلول‌های جلبک *Dunaliella* جدا شود. 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 ۵۰ $\mu molm^{-2}s^{-1}$ 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 پیپت 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،

شناسایی دقیق گونه‌ها با روش‌های ریخت‌شناختی معمول امکان‌پذیر نیست بلکه صرفاً با روش‌های مولکولی امکان‌پذیر است (Olmos *et al*., 2000؛ Tempesta *et al*., 2010).

بررسی مولکولی

روش استخراج DNA و شرایط PCR

استخراج DNA از سوسپانسیون سلولی کلونی‌های جداسازی شده و خالص با روش CTAB (Hexa decyltrimethylammonium bromide) انجام شد (Ausubel *et al*., 1995؛ Sambrook *et al*., 1989). برای شناسایی مولکولی گونه‌های *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 اندونوکلئاز *Taq*I بریده شد. بدین منظور بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده اقدام شد و محصول برش آنزیمی روی ژل آگاروز ۱/۷ درصد بررسی شد.

نتایج

شاخص‌های فیزیکوشیمیایی محل نمونه‌برداری

نتایج بررسی برخی از شاخص‌های فیزیکوشیمیایی نمونه آبی محل نمونه‌برداری 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 ایستگاه‌ها قرمز بوده، کف دریاچه نیز در تمام ایستگاه‌ها پوشیده از کریستال نمک بوده است. نتایج بررسی‌های نخستین نشان داد که تنوع گونه‌ای در فصل بهار بیش از فصل تابستان و همچنین، در ایستگاه شماره سه بیش از دیگر ایستگاه‌ها بود. بررسی دقیق با استفاده از میکروسکوپ نوری و پرورش در محیط کشت جامد، تفاوت‌های ریخت‌شناختی و فیزیولوژیک مختلفی (سرعت رشد متفاوت و رنگ کلونی) بین کلونی‌های خالص‌سازی شده از ایستگاه‌های مختلف مشاهده شد که برای بررسی دقیق‌تر گونه‌های احتمالی به شکل مجزا با روش مولکولی بررسی شد.

محصول PCR

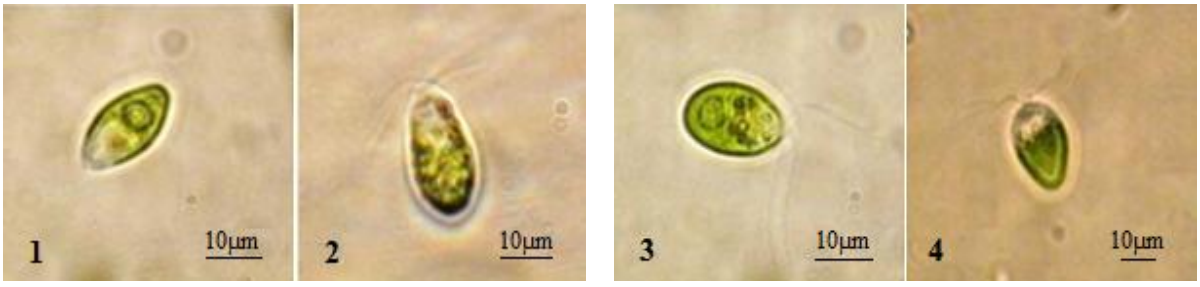
انجام PCR اختصاصی ناحیه ژنومی 18srDNA به وسیله جفت آغازگرهای MA1 و MA2 باندهایی با وزن‌های مولکولی ۲۱۷۰، ۲۵۷۰، ۱۱۷۰ و ۲۵۷۰ جفت نوکلئوتید برای نمونه‌های جداسازی شده (شکل ۲) را تولید کرد که به ترتیب با اعداد ۱ تا ۴ در شکل ۳ مشخص شده‌اند. نتایج PCR نمونه‌های جلبکی نشان‌دهنده وجود تنوع گونه‌ای است.

بررسی نتایج برش آنزیمی انجام شده توسط آنزیم *Taq*1 نشان‌دهنده کمینه چهار الگوی مختلف برش

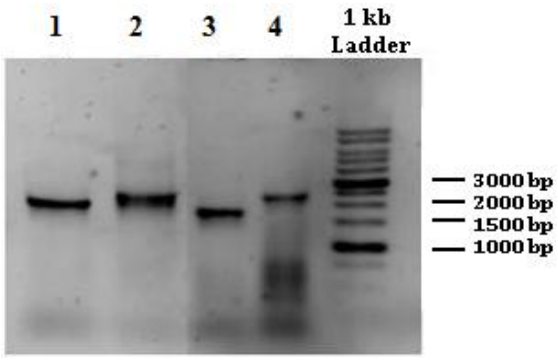
است. این برش آنزیمی در تأیید بررسی ریخت‌شناختی و بررسی وزن محصول PCR نشان‌دهنده همان تنوع چهارگانه مشاهده شده در نمونه‌های جلبکی مطالعه شده است (شکل ۴).

جدول ۲- شاخص‌های فیزیکوشیمیایی آب ناحیه بررسی شده

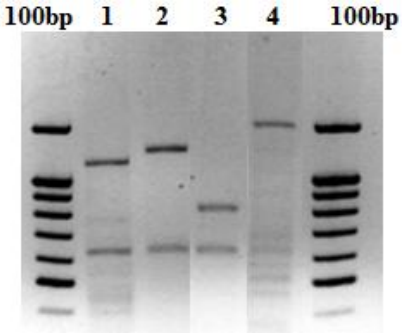
فصل نمونه‌برداری	ایستگاه	شوری g/l	اسیدیته	رنگ آب	کف دریاچه	عمق آب cm
بهار خردادماه ۹۰	۱	۳۲۴	۷/۲	روشن	رسوبات	۴۰
	۲	۳۴۰	۷/۳	روشن	رسوبات	۶۵
	۳	۳۲۲	۷/۲۸	روشن	کریستال نمک	۳۰
	۴	۳۲۴	۷/۲۶	روشن	رسوبات	۵۰
	۵	۳۲۸	۷/۲	قرمز	رسوبات	۳۰
تابستان شهریورماه ۹۰	۱	۳۸۰	۶/۹۵	قرمز	کریستال نمک	۲۲
	۲	۳۲۰	۶/۸۷	قرمز	کریستال نمک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



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 ۳- محصول PCR حاصل از نمونه‌های جلبک 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.



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

بحث

بررسی و شناسایی فلور جلبکی آب‌های هر منطقه از اهداف مهم پژوهشی در اغلب کشورهای جهان است. در سال‌های اخیر پژوهش‌های محدودی در کشور ایران روی فلور تالاب‌ها و جلبک‌های آب‌های شیرین و لب شور انجام شده است. از جمله پژوهش‌های اخیر انجام شده، بررسی و شناسایی تراکم و پراکنش فیتوپلانکتون‌های دریاچه سد لار است که در آن، طی شش مرحله نمونه‌برداری ۱۴ جنس از شاخه جلبک‌های Diatoms، ۱ جنس از شاخه Euglenophyceae، ۷ جنس از شاخه جلبک‌های سبز، ۳ جنس از شاخه جلبک‌های Pyrrophyta، ۱ جنس از شاخه جلبک‌های Chlorophyceae و ۲ جنس از شاخه جلبک‌های سبز آبی را شناسایی کند (Salavatian *et al*., 2010). طی نمونه‌برداری‌هایی که از باتلاق شور گاوخونی انجام شد، سه گونه مختلف از جنس *Dunaliella* بر اساس تفاوت‌های ریخت‌شناسی و فیزیولوژیک خالص‌سازی شد و با روش‌های مولکولی گونه‌های *D. parva*، *D. pseudosalina* و *D. salina* شناسایی شدند (Shariati and Hadi, 2000). همچنین، Orlova و همکارانش ۳۵۷ گونه از ریز جلبک‌های دریایی را طی سال‌های ۱۹۹۱ تا ۲۰۰۶ در دریای Amursky Bay واقع در کشور روسیه شناسایی کردند (Orlova *et al*., 2009).

پژوهش‌های انجام شده روی گونه‌های مختلف جنس *Dunaliella* نشان داده است که تعدادی از گونه‌های این جنس می‌توانند در شوری‌های بالا به خوبی رشد کنند و حتی توانایی تولید مقادیر بالایی از بتاکارتن را دارند (Rad *et al*., 2011). این بررسی‌ها همچنین نشان داده است که حتی برخی گونه‌ها از جمله *D. salina* در تولید بتاکاروتن نسبت به دیگر گونه‌ها 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 جلبک‌های تک‌سلولی نسبت به آب‌های اقیانوس‌ها و آب‌های شیرین است. تنوع جنس‌ها بسته به میزان شوری آب متفاوت است. در بررسی‌هایی 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 دقیق‌تر در سال ۱۳۷۵، در ۱۸ ایستگاه از دریاچه ارومیه، ۶ جنس از سه رده Chlorophyceae، Bacillariophyceae و Cyanophyceae شناسایی شد که از نظر تنوع، جنس‌های مختلف رده Bacillariophyceae با ۴ جنس بیشترین و رده‌های Chlorophyceae و Cyanophyceae هر کدام با یک جنس کمترین تنوع را نشان دادند. البته در بین فیتوپلانکتون‌ها، جنس *Dunaliella* به طور غالب (۸۰ درصد) در ۱۸ ایستگاه مشاهد شد (Manaffar, 2013). در تحقیقات پژوهشگران بلژیکی در سال ۱۹۹۷ روی ۱۸ ایستگاه از دریاچه ارومیه، مشخص شد که جنس *Dunaliella*، جلبک سبز تک‌سلولی غالب در این محل‌ها بوده، به طوری که غلظت آن ۱۰ برابر گونه‌های دیگر بود (Sorgeloos, 1997).

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 Pishe *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 *et al*., 2000؛ Raja *et al*., 2007b؛ Hejazi *et al*., 2010؛ Jayappriyan *et al*., 2010). بدین ترتیب باندهایی که به *D. tertiolecta*، *D. salina*، *D. parva* 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 *Taq1* 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 کیلوباز که به ژن 18srDNA مربوط می‌شود، 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 پژوهشکده آرتمیا و جانوران آبزی دانشگاه ارومیه انجام شد. از کارشناسان این پژوهشکده که در اجرای این پروژه نقش داشته‌اند، قدردانی و سپاسگزاری 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 Pishe, Z., Heydari, R. and Manaffar, R. (2012) Charachterization of two unicellular algae species *Senedesmus obliquus* and *Desmdemus 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 sensititive 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., Abdollapour, 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 molecula 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) Faty 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 Ghorbani [1], Ramin Manaffar [2]*, Afsaneh Taee [3] and Reza Malekzadeh [2]

[1] Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Urmia, Urmia, Iran
[2] *Artemia* and Aquatic Animals Research Institute, University of Urmia, Urmia, Iran
[3] Department 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 owning 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