

معرفی نشانگر ژنتیکی مناسب برای شناسایی و جداسازی گونه‌های ریز جلبک سندسموس (*Scenedesmus*)

چکیده

جلبک تک‌سلولی *Scenedesmus* یک جلبک سبز با ارزش صنعتی و غذایی فراوان است. از این رو شناسایی بیشتر این جنس و گونه‌های پر تولید آن، بسیار سودمند خواهد بود. معمولاً شناسایی گونه‌های این ریز جلبک با روش‌های معمول مورفولوژیک و فیزیولوژیک مختلف چندان موفق نبوده است، چون که این صفات تحت شرایط رشدی مختلف، می‌توانند تغییر کنند و باعث سردرگمی در رده‌بندی این جلبک شود. از این رو در این تحقیق برای شناسایی بهتر و دقیق‌تر این جلبک به لحاظ مولکولی، از نشانگرهای مولکولی استفاده شد و تنوع ژنتیکی تعدادی از سویه‌های ریز جلبک سندسموس موجود در رود ارس با استفاده از نشانگرهای مولکولی، مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه DNA دو نمونه جلبکی سندسموس مربوط به رود ارس و محل پرورش ماهی‌های زینتی در تبریز استخراج شده و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی ژن‌های ITS، tufA، 18s rRNA، CV انجام گرفت، در ادامه توالی یابی محصولات PCR انجام شده و توالی‌ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. درخت فیلوژنی مربوط به نشانگرها توسط نرم‌افزار Mega7 به سه مدل Maximum likelihood, Neighbor-joining, Maximum parsimon رسم گردیده و درخت‌ها با هم مقایسه و بر اساس نتایج حاصل، نشانگر tufA به عنوان نشانگر مناسب انتخاب شد. با بررسی درخت فیلوژنتیکی مربوط به نشانگر tufA، نمونه مورد مطالعه سندسموس مربوط به رود ارس و محل پرورش ماهی‌های زینتی در تبریز به جلبک *S. accuminatus* که در این تحقیق به عنوان شاهد استفاده شده بود در یک خوشه قرار گرفته و رابطه خویشاوندی نزدیکی دارد که تأییدی بر شباهت مورفولوژیک این جلبک‌ها نیز می‌باشد. به نظر می‌رسد استفاده از این نشانگر در مقایسه با نشانگرهای 18s rRNA، CV و ITS دقیق‌تر می‌باشد.

واژگان کلیدی: *Scenedesmus*، شناسایی مورفولوژیک، نشانگر مولکولی، رود ارس.

یلدا سیدحسینی^۱

جعفر رازقی^{۲*}

نادر فرساد اختر^۳

۱. دانش‌آموخته علوم گیاهی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

۲. دانشیار گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

۳. استادیار گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

*مسئول مکاتبات:

Jafar_razeghi@tabrizu.ac.ir

کد مقاله: ۱۴۰۰۳۰۹۱۵

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۱۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۳۰

این مقاله پژوهشی و برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد است.

مقدمه

ریز جلبک‌های مختلفی در محیط‌های آبی و برخی از زیستگاه‌های زمینی یافت می‌شود. آن‌ها صدها میلیون سال است که نقش مهمی در اکوسیستم جهانی ایفا می‌کنند (Kumar, 202). پیشرفت علمی، اقتصادی و فرهنگی جوامع و سبک زندگی، افراد را به سمت شناخت بیشتر جلبک‌های دریایی سوق داده است. سال‌هاست که فعالیت بیولوژیکی جلبک‌ها به دلیل وجود ترکیبات عمل‌گرا که ممکن است در گیاهان وجود نداشته باشد توجه محققین را به خود جلب نموده است (سادات امیری، ۱۳۹۹). یکی از مهم‌ترین آن‌ها ریز جلبک *Scenedesmus* است که شناسایی آن گام بزرگی از تسویه پس آب‌گرفته (Ye et al., 2020) تا به عنوان سوخت زیستی نقش مهمی ایفا کرده است (Gani et al., 2020; Eida M et al., 2018).

Scenedesmus یک جنس از جلبک‌های سبز در رده‌ی Chlorophyceae است که به‌صورت کلنی و غیر حرکتی هستند. در حال حاضر ۷۴ گونه‌ی تأییدشده از *Scenedesmus* وجود دارد. Hegwald زیرشاخه *Scenedesmodia* را به سه دسته‌ی عمده *Desmodesmus*، *Scenedesmus*، *Acutodesmus* تفکیک نمود که بررسی فسیل‌های ۷۰ الی ۱۰۰ میلیون ساله نشان می‌دهد که سندسموس جوان‌تر از دودسته معرفی‌شده‌ی دیگر است. سندسموس به علت پرکاربرد بودن در زمینه سوخت‌های زیستی یکی از پرتعدادترین گونه‌های جلبک دریایی است و به دلیل تنوع بسیار بالا از نظر مورفولوژی شناسایی آن بسیار مشکل است (Guiry and Guiry, 2015; Hegwald, 1997). *Scenedesmus* اغلب به‌صورت کلنی‌های ۴ الی ۸ سلولی یافت می‌شود که در داخل دیواره‌ی مادری محصور می‌شوند. این کلنی‌ها دارای شکل‌های مختلفی مانند خطی، نامنظم، متناوب و انگشتی و غیره می‌باشند. تشکیل کلنی‌ها به عوامل مختلف بستگی دارد. در نرخ رشد بالا سلول‌های سندسموس ترجیح می‌دهند که به‌صورت غیر کلنی باشند. کلنی‌های بزرگ‌تر نسبت سطح به حجم کوچک‌تر دارند که جذب مواد غذایی و برداشت نور را محدود می‌کند و جرم بیشتری دارند که باعث نشست آن‌ها می‌شود که این نشست در حضور موجوداتی مانند *Daphnia* که تهدیدی برای جلبک‌های تک‌سلولی هستند به‌عنوان یک ابزار حفاظتی مؤثر محسوب می‌شود (Lüring et al., 1999). با توجه به تنوع جلبک سندسموس شناسایی مورفولوژیکی این جلبک کار بسیار دشواری است، ازاین‌رو در کنار روش‌های مورفولوژیکی از روش‌های مولکولی نیز برای تأیید استفاده می‌شود (Sarwa and Verma, 2017).

در یکی از پژوهش‌های انجام‌گرفته از 18s rRNA برای آنالیز مولکولی استفاده‌شده است که هدف از این پژوهش توصیف و آزمایش گونه‌ی *Scenedesmus* محلی برای ماده خام سوخت‌های فسیلی است که بر روی دو نوع *Scenedesmus* و *Scenedesmus dimorphus* جمع‌آوری‌شده از دریاچه‌ای در هند آزمایش‌هایی انجام شد و بر اساس اطلاعات به‌دست‌آمده از پارامترهای رشد و انرژی به این نتیجه رسیدند که *S. dimorphus* به‌عنوان ماده خام برای سوخت‌های زیستی در مقایسه با *S. quadricauda* بسیار مناسب‌تر است (Gour et al., 2016). در پژوهش دیگری نیز از نشانگر *tufA* برای شناسایی و متمایز کردن گونه‌های کلرلا از گونه‌های کلرلا مانند استفاده‌شده است. از آنجایی که کلرلا در حال تبدیل‌شدن به سوخت‌های زیستی نسل دوم است شناسایی این گونه نیز از اهمیت زیادی برخوردار است اما به‌راحتی از لحاظ مورفولوژیکی با گونه‌های کلرلا مانند اشتباه گرفته می‌شود بنابراین نشانگر *tufA* برای شناسایی این جلبک استفاده‌شده و نتایج قابل قبولی داده است (Zou et al., 2016).

در پژوهش دیگری که بر روی جلبک‌های قهوه‌ای گونه پادینا در خلیج فارس انجام‌گرفته است، با استفاده از پرایمر *rbcl* گونه‌های *P. australis* و *P. boergessenii* با دو روش شناسایی شدند. دو گونه شناسایی‌شده بر روی درخت فیلوژنی با ۹۹ درصد احتمال در یک کلاستر قرار گرفته و شباهت ژنتیکی بالایی را نسبت به گونه‌های مقایسه شده نشان دادند درحالی‌که بررسی مورفولوژیکی دو گونه نشان می‌دهد که از نظر رنگ، طول تال، بریدگی حاشیه‌ها کاملاً متفاوت بوده است. به‌طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که بررسی‌های مولکولی نقش مهمی در شناسایی و طبقه‌بندی جلبک‌های قهوه‌ای داشته، می‌توان از آنالیز داده‌های مولکولی جهت تعیین جایگاه تاکسونومی و فیلوژنتیکی جلبک‌های مذکور بهره برد (طاهر پور و همکاران، ۱۳۹۵).

در مطالعه دیگر انجام‌گرفته موقعیت فیلوژنتیکی و تاکسونومی جلبک *Dunaliella viridis* با استفاده از نشانگر مولکولی ITS موردبررسی قرار گرفته بود که در این مطالعه جلبک از معدن نمک مربوط به منطقه‌ای از کشور ویتنام جمع‌آوری شد و درخت‌های فیلوژنتیکی مستقل از توالی‌های ITS1 و ITS2 نشان داد که جلبک مربوطه با بوت استرپ ۹۲ درصد در گروه *Dunaliella viridis* قرار گرفته است (Tran et al., 2013).

در مطالعه‌ای دیگر که از *rbcL* و ITS1F-4R برای شناسایی آرتروسپیرا و دونالیا انجام‌گرفته است نشان داد که پرایمر *rbcL* نسبت به پرایمر دیگر از قدرت اتصال بیشتری برخوردار است و برای شناسایی مولکولی بسیار کارآمد می‌باشد (Patel et al., 2018; Akash et al., 2018).

در مطالعه دیگری که از پرایمرهای ITS1-ITS4 برای شناسایی مولکولی و مقایسه با ریخت‌شناسی سندموس‌های موجود در رودخانه Ergene ترکیه انجام شد، پژوهش‌ها نشان داد که باوجود اینکه بررسی‌های ریخت‌شناسی گونه‌های *Scenedesmus-Like* کافی به نظر می‌رسد اما مطالعات مولکولی روشی راحت‌تر و مطمئن‌تر در شناسایی گونه‌ها می‌باشد (Fusun et al., 2017). نشانگری که در مطالعات اخیر موردتوجه قرار گرفته است نشانگر tufA است. در مورد tufa، مطالعات انجام‌شده ثابت کرده است که این ژن بهترین نشانگر برای شناسایی جلبک‌های سبز در سطح گونه است (Kazi et al., 2013). ژن tufA یک ژن کلروپلاستی است که کدکننده‌ی فاکتور TU است. TU در طی فرایند ترجمه از کلروپلاست به ژنوم هسته‌ای انتقال می‌یابد، فاکتور TU در طی فرایند ترجمه (پروتئین‌سازی) مسئول تسهیل بخشیدن اتصال کمپلکس aa-tRNA به جایگاه E در ریبوزوم می‌باشد.

هدف از پژوهش حاضر، استفاده از نشانگرهای مولکولی جهت شناسایی بهتر و دقیق‌تر جلبک سندموس و معرفی مارکر ژنتیکی مناسب برای این منظور است که نتایج حاصل می‌تواند در شناخت تنوع زیستی جلبک‌های رود ارس و استفاده از آن‌ها در مطالعات مختلف موردتوجه باشد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش از جلبک *Scenedesmus* که از رودخانه ارس و محل پرورش ماهی‌های زینتی جمع‌آوری و ایزوله شده و آب شرب تبریز استفاده شده است. همچنین از دو جلبک *Scenedesmus acuminatus* و *Scenedesmus obliquus* به‌عنوان شاهد استفاده شده است. جلبک‌ها در محیط کشت BG۱۱ کشت داده شدند. پس از واکنش مکرر، استخراج DNA از نمونه‌ها با استفاده از روش جلبک‌ها (Cetyltrimethylammonium bromide) CTAB تغییریافته توسط حجازی و همکاران (۲۰۱۰) انجام گرفت. جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، حجم نهایی محلول به ۱۰/۵ میکرو لیتر رسید به‌طوری‌که برای هر واکنش ۶ میکرو لیتر آب استریل، ۳ میکرو لیتر Master Mix و ۰/۵ میکرو لیتر از هر کدام از پرایمرهای F و R موردنظر (جدول ۱) (Senousy, 2004; Vieira et al., 2016; Tran et al., 2013) و ۰/۵ میکرو لیتر DNA (۲ میلی گرم بر لیتر) استخراجی تهیه شد. عمل PCR در دستگاه ترموسایکلر (مدل ۴۸۵۲GE، چین) با چرخه دمایی که برای پرایمرهای مورد استفاده به‌صورت جداگانه به دستگاه داده شده انجام شد. دناتوراسیون اولیه در ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه و سپس ۴۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد جهت دناتوراسیون، ۵۵_۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه جهت اتصال پرایمر، ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه جهت بسط پرایمر برای ۴۰ چرخه و بسط نهایی در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه انجام شد. کیفیت باندهای محصول PCR به کمک الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد بررسی گردید. محصولات PCR برای تعیین توالی به شرکت توپازژن فرستاده شدند.

توالی‌های به‌دست‌آمده به‌وسیله نرم‌افزار Chromas و BioEdit بررسی و ویرایش شدند. به‌منظور مقایسه توالی نمونه‌های مورد مطالعه با دیگر توالی‌های موجود در پایگاه اطلاعات ژنتیکی (NCBI) از برنامه BLAST توالی‌های DNA گونه‌های مشابه با نمونه‌های موردنظر از بانک اطلاعات ژنتیکی استخراج گردید و به همراه توالی‌های DNA مورد مطالعه در این تحقیق توسط نرم‌افزار YMEGA تجزیه و تحلیل شدند. جهت رسم درخت‌های فیلوژنی برای هر کدام از نشانگرها اطلاعات مربوطه به نرم‌افزار داده شد بعد از Align کردن DNA نمونه‌های داده شده و پس از هم‌ردیف‌سازی و مقایسه توالی‌ها، درخت‌های فیلوژنی به روش‌های MP (Maximum Parsimony)، ML (Maximum Likelihood)، NJ (Neighbor Joining) ترسیم شدند.

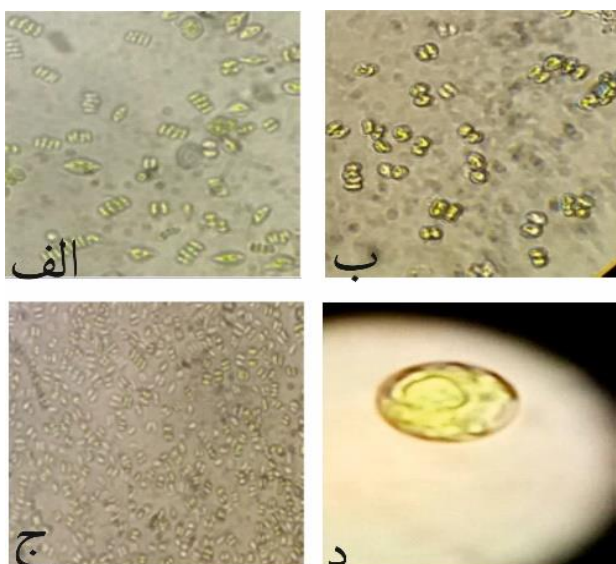
نتایج تحقیق توسط نرم‌افزار MEGA7 تجزیه و تحلیل شدند. جهت رسم درخت‌های فیلوژنی برای هر کدام از نشانگرها اطلاعات مربوطه به نرم‌افزار داده شد بعد از Align کردن DNA نمونه‌های داده شده و پس از هم‌ردیف سازی و مقایسه توالی‌ها، درخت‌های فیلوژنی به روش‌های (MP (Maximum Parsimony)، NJ (Neighbor Joining)، ML (Maximum Likelihood) ترسیم شدند.

جدول ۱: توالی پرایمر های استفاده شده.

نام پرایمر	توالی پرایمر
ITS1(F)	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS2(R)	GCTGCGTTCTTCATCGATGC
18s rRNA(F)	AACCTGGTTGATCCTGCCAGT
18s rRNA(R)	TGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC
tufa(F)	GGNGCNCAAATGGAYGG
tufa(R)	CCTTCNCGAATMGCRAAWCGC
Cv3(F)	ACCTTGTTACGACTTCTCCTTCCTC
Cv3(R)	AGATACCGTCGTAGTCTCAACCATAA

(Tran et al., 2013; Senousy, 2004; Vieira et al., 2016)

در این پژوهش در کنار انجام همه‌ی مراحل مربوط به استخراج DNA، توالی یابی و رسم درخت‌های فیلوژنتیکی، جلبک‌های موردنظر از لحاظ مورفولوژیکی نیز موردبررسی قرار داده شد، بعد از اطمینان از رشد کافی و عدم آلودگی جلبک‌ها در شرایط آزمایشگاهی از طریق میکروسکوپ نوری نمونه‌ها را موردبررسی قرار داده شد (شکل ۱). بعد از بررسی‌های مورفولوژیک جلبک‌های موردنظر برای اینکه یک جمع کلی از صفات مورفولوژیکی نمونه‌ها وجود داشته باشد، کلاس دیگرام نمونه‌ها را بر اساس دارا بودن یا نبودن برخی صفات چون خار، جلبک سبز بودن، کلنی، تازه، دوکی شکل بودن، دارا بودن پیرنویید و غیره موردبررسی قرار داده و به‌صورت برنامه‌ای به SPSS V 16 وارد گردید.

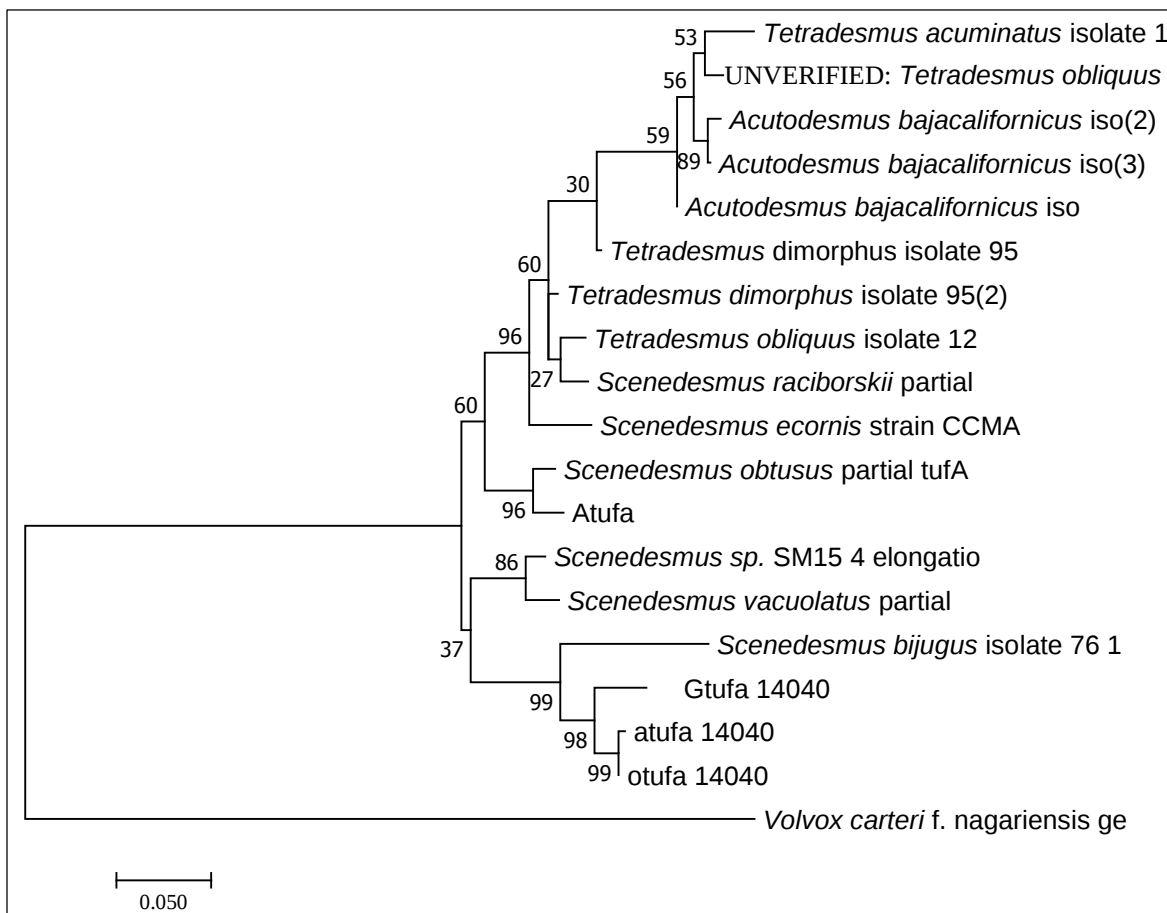


شکل ۱: تصاویر میکروسکوپی مربوط به:

الف (جلبک ایزوله محل پرورش ماهی‌های زینتی ب) *S.accumonatus* (ج جلبک مربوط به رود ارس د) *S.obliquus*

نتایج

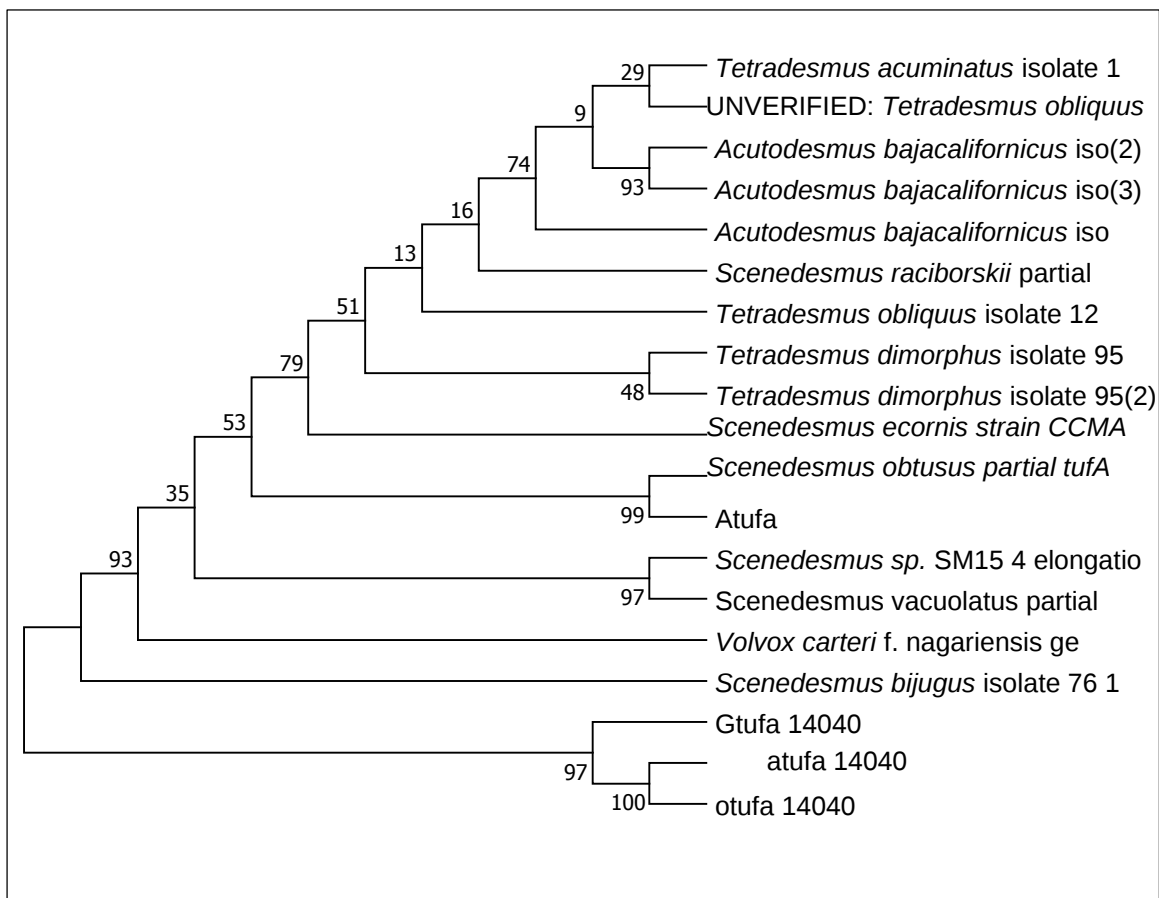
شناسایی گونه‌های مختلف جلبک *Scenedesmus* به علت قابلیت تولید متابولیت‌های ثانویه و دارا بودن میزان بالای محتوای چربی در تولید سوخت‌های زیستی در گونه‌های مختلف این جنس و جذب فلزات سنگین از اهمیت بالایی برخوردار بوده و لذا مطالعات گسترده‌ای در جهت شناسایی و کشت این جلبک انجام گرفته است (مهدی اعلایی و همکاران، ۱۴۰۰). شناسایی جلبک سندسموس با روش‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی نتایج قابل قبولی به دست نمی‌دهد که به دلیل تنوع مورفولوژیکی بالای این جلبک و دشواری شناسایی گونه‌های مختلف آن می‌باشد. امروزه از داده‌های مولکولی برای شناسایی دقیق‌تر موجودات استفاده می‌شود. در این تحقیق دو نمونه جلبکی سندسموس رود ارس (محدوده جلفا به سیه‌رود) و محل پرورش ماهی‌های زینتی در تبریز از نظر صفات مورفولوژیکی مورد بررسی قرار گرفت و پس از استخراج DNA نمونه‌ها، با استفاده از نشانگرهای ITS، 18S rRNA، CV، tufA، توالی یابی انجام شد و سپس با رسم درخت فیلوژنی و ارزیابی درخت‌ها نتایج حاصل از بررسی‌های مورفولوژیکی و آنالیزهای مولکولی باهم مقایسه شدند. بعد از مقایسه نتایج حاصل از ۴ نشانگر ذکر شده نشانگر tufA به علت تمایز خوب گونه‌ها از یکدیگر و تغییرپذیری بالا نسبت به نشانگرهای دیگر و تأییدی بر نزدیک بودن صفات مورفولوژیکی سندسموس رود ارس (غفاری و همکاران، ۱۳۹۸) و محل پرورش ماهی‌های زینتی تبریز به *S. acuminatus* استفاده شده، انتخاب شد. درخت‌های فیلوژنی به روش ML (شکل ۲)، MP (شکل ۳) و NJ (شکل ۴) رسم شد که جلبک *Volvox* به عنوان outgroup انتخاب شده و دو جلبک *S. obliquus* و *S. acuminatus* به عنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفته‌اند. عددهای موجود در قسمت گره‌های مربوطه به درخت نشانگر tufA نشان می‌دهد که سندسموس جمع‌آوری شده از محل پرورش ماهی‌های زینتی با *S. obtusus* بیشترین بوت استرپ (بالای ۹۰ درصد) تأیید شدند و در یک گروه خواهری قرار دارند (هرچه میزان این اعداد به ۱۰۰ نزدیک‌تر باشد شاهد بیشترین شباهت و خویشاوندی خواهیم بود). نمونه جلبکی جلفا به سیه‌رود به دو گونه شاهد شباهت بیشتری از خود نشان می‌دهد و در یک کلاد با بوت استرپ بیش از ۹۰ درصد تأیید شدند (شکل ۲).



شکل ۲: درخت فیلوژنی ترسیم شده توسط نرم افزار Mega7 مربوط به نشانگر tufA با روش

Maximum likelihood

Atufa: سندسموس محل پرورش ماهی‌های زینتی، Gtufa: سندسموس جلبا به سیه‌رود، atufa: *S. acuminatus* ، Otufa: *S. obliquus*

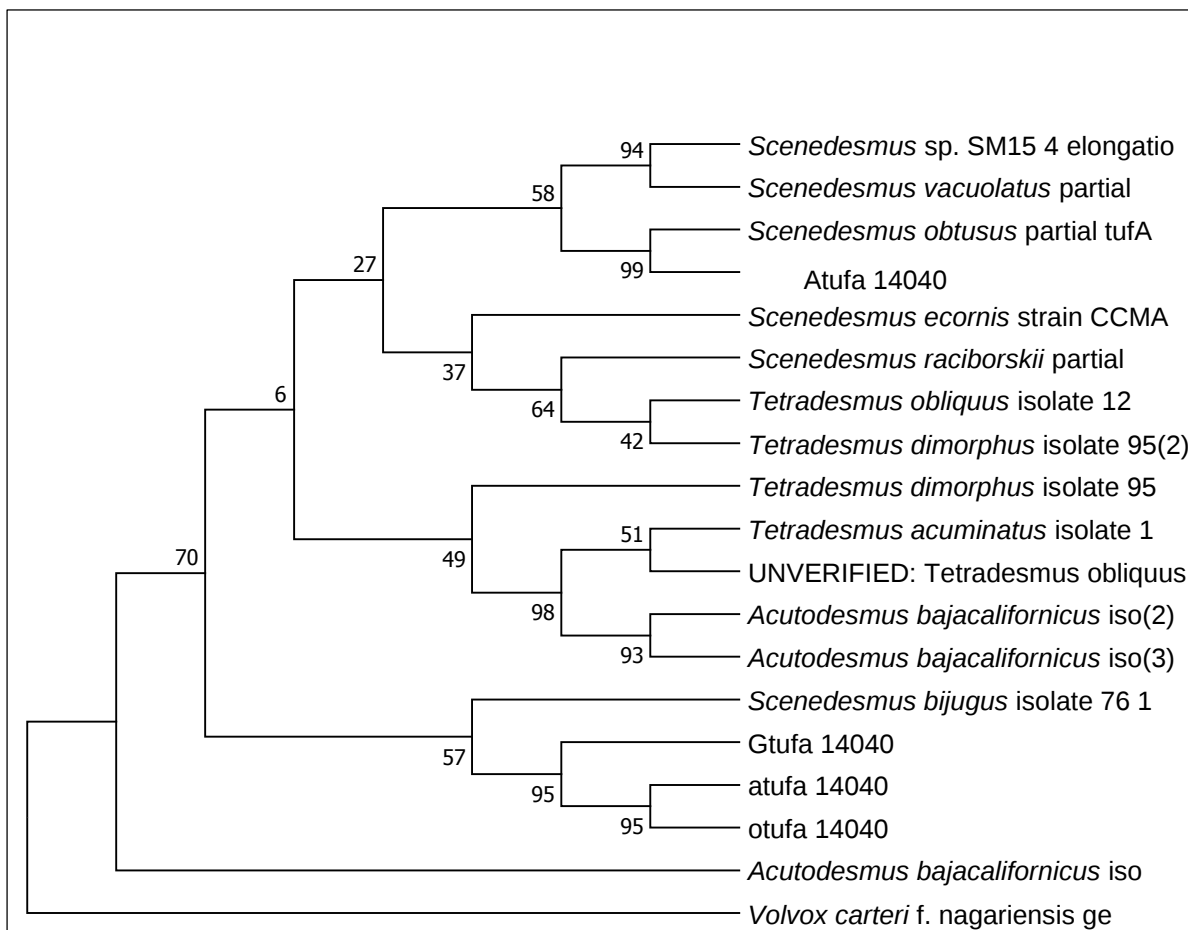


شکل ۳: درخت فیلوژنی ترسیم‌شده توسط نرم‌افزار Mega7 مربوط به نشانگر tufA با روش

Maximum parsimon

Atufa: سندسموس محل پرورش ماهی‌های زیتنی، Gtufa: سندسموس جلفا به سیه‌رود،

S. accuminatus :Otufa S. obliquus atufa



شکل ۴: درخت فیلوژنی ترسیم شده توسط نرم افزار Mega7 مربوط به نشانگر tufA با روش Neighbor-joining.

Atufa: سندسموس محل پرورش ماهی‌های زینتی Gtufa: سندسموس جلبا به سیه‌رود، atufa: *S. acuminatus*, Otufa: *S. obliquus*

به منظور شناسایی نمونه‌های جلبکی سندسموس جلبا به سیه‌رود و سندسموس محل پرورش ماهی‌های زینتی درخت فیلوژنی به سه مدل NJ، MP و ML رسم شد. در این درخت جلبک *Volvox* به عنوان outgroup انتخاب شده و دو جلبک *S. obliquus* و *S. acuminatus* به عنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفته‌اند. مقایسه‌ی درخت‌های ترسیم شده نشانگرهای ITS، 18s rRNA، CV و tufA نشان می‌دهد که عددهای موجود در قسمت گره‌های مربوطه به درخت نشانگر tufA نشان می‌دهد که سندسموس جمع‌آوری شده از محل پرورش ماهی‌های زینتی با *S. obtusus* بیشترین بوت استرپ (بالای ۹۰ درصد) تأیید شدند و در یک گروه خواهری قرار دارند. (هرچه میزان این اعداد به ۱۰۰ نزدیک‌تر باشد شاهد بیشترین شباهت و خویشاوندی خواهیم بود). نمونه جلبکی جلبا به سیه‌رود به دو گونه شاهد شباهت بیشتری از خود نشان می‌دهد و در یک کلاد با بوت استرپ بیش از ۹۰ درصد تأیید شدند.

بحث و نتیجه‌گیری

ریز جلبک‌ها به دلیل ظرفیت سازگاری بالای خود، کاربردهای صنعتی متعددی از جمله در بخش مواد غذایی و تولید سوخت زیستی دارند. با این حال، کمبود مطالعات در مورد تنوع و تاریخچه زندگی از چندین محیط، نیاز به تحقیقات بیشتر در مورد گونه‌ها و زیستگاه‌های جدید را برجسته می‌کند (Suarez- Montes *et al.*, 2022). به‌طوری‌که غالباً شناسایی و مستندسازی مناسب ریز جلبک‌ها در انتشارات فیکولوژی کاربردی، فیزیولوژی جلبک و بیوشیمی وجود ندارد (Fawley and Fawley, 2020) و تغییرات صورت گرفته در رده‌بندی جلبک‌ها زیاد و متنوع می‌باشد (Guiry and Guiry, 2020).

با توجه به مشکلات ناشی از شناسایی مورفولوژیکی جلبک‌ها، تکنیک‌های بارکد DNA جهت شناسایی جلبک‌ها بسیار مهم بوده و بارکد گذاری کارآمدترین راه برای شناسایی گونه‌ها معرفی شده است (Mann *et al.*, 2010) به‌طوری‌که بررسی‌های مولکولی نقش مهمی در شناسایی و طبقه‌بندی جلبک‌های سبز داشته و می‌توان از آنالیز داده‌های مولکولی جهت شناسایی جلبک‌های سبز مانند سندسموس بهره برد (Leliaert *et al.*, 2014; Coleman 2003, 2009).

در پژوهش حاضر از نشانگرهای ژنتیکی ITS، 18s rRNA، CV و tufA به همراه ویژگی‌های مورفولوژیکی جهت شناسایی گونه‌های سندسموس استفاده شد (Pante *et al.*, 2015) و نتایج حاصل از رسم درخت فیلوژنتیکی هرکدام باهم مقایسه گردید. نتایج حاصله، برتری نشانگر tufA نسبت به سایرین را نشان داد که در مقایسه با سه مورد آزمایش شده نشانگر قابل اعتمادتری است که تأیید کننده برخی از مطالعات پیشین در موضوع شناسایی مولکولی ارگانیسم‌ها می‌باشد. ژن tufA یک نامزد خوب برای مطالعات فیلوژنتیک، بالاتر از سطح گونه، به دلیل ماهیت حفظ‌شده آن در طیف گسترده‌ای از ارگانیسم‌ها (پلاسمودیوم، سیانوباکتری‌ها، گیاهان خشکی زی) است (Fama *et al.*, 2002; Delwiche *et al.*, 1995). همچنین در گروه‌هایی از ماکرو جلبک‌ها (Du *et al.*, 2014) و ریز جلبک‌ها از قبیل کریپتوفیت‌ها (Wynne *et al.*, 2009; Lawton *et al.*, 2013; Garcia-cuetos *et al.*, 2010; Christa *et al.*, 2013) به‌عنوان بارکد DNA استفاده شده است.

به‌طوری‌که در سیانوباکتری‌ها از ژن tufA برای شناسایی منشأ سیانوباکتریایی پلاستیدهای جلبک‌های سبز، قرمز، کروموفیت‌ها و سیانوفورا پارادوکس استفاده شده است (Delwiche *et al.*, 1995) و برای فیلوژنی مولکولی جنس کالریا (کلروفیتا) از ژن tufA استفاده شده است (Fama *et al.*, 2002) و در مطالعه‌ای که بر روی رده‌ی Chlorophyceae انجام شده است نشان می‌دهد که نشانگر tufA نسبت به نشانگرهای ITS، rbcL، ucp4 مورد استفاده شده از برتری محسوسی در شناسایی رده‌ی Chlorophyceae برخوردار است (Vieira *et al.*, 2016). در مورد ماکرو جلبک‌های سبز دریایی نیز نتایج به‌دست‌آمده از پرایمرهای اختصاصی ژن tufA به دلیل موفقیت تکثیر بالا و پوشش مناطق اینترنتی موفقیت‌آمیز بوده است (Saunders and Kucera, 2010).

یکی از ویژگی‌های مهم برای نشانگرهای مولکولی کاربرد آن در طیف وسیعی از موجودات می‌باشد. در میان ۴ نشانگر مولکولی آزمایش شده در این پژوهش، به نظر می‌رسد که می‌توان از نشانگر tufA در بررسی و مطالعات مربوط به سایر گونه‌های سندسموس استفاده کرد و یا با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیکی و بیوشیمیایی و ارتباط آن با مارکرهای مولکولی برای به دست آوردن کلید شناسایی و طبقه‌بندی مناسب گونه‌ها استفاده کرد. با توجه به اینکه tufA ویژگی‌های تشخیصی بسیار بیشتری نسبت به ITS، 18s rRNA، CV ارائه می‌دهد بنابراین ناحیه tufA می‌تواند به‌عنوان «بارکد خاص» بالقوه مناسب برای گونه‌های سندسموس باشد که مشابه نتایج انتخاب بارکد خاص برای شناسایی گونه‌های شبه کلرلا می‌باشد (Zou *et al.*, 2016). تکثیر، توالی‌یابی و انطباق آسان توالی‌های ژن tufA، امکان بازسازی واقعی فیلوژنتیکی را علیرغم تنوع بالاتر نسبت به ژن 18s rRNA فراهم می‌کند و ژن tufA را به‌عنوان مارکر مولکولی امیدبخش برای طبقه‌بندی مشخص می‌کند (Vieira *et al.*, 2016).

با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق و مطالعات انجام شده در مورد سایر ریز جلبک‌های سبز می‌توان گفت که بارکد DNA مربوط به ریز جلبک‌های سبز مانند سندسموس همراه با تجزیه و تحلیل مبتنی بر ویژگی‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی می‌تواند به سمت درک بهتر این ریز جلبک‌های پیچیده مورفولوژیکی حرکت کند.

منابع

- اعلایی، م.، محمدی، ا.، مشهدی، ح. و محمود نیا، ف.، ۱۴۰۰. بررسی قابلیت حذف فلز سنگین کادمیوم توسط سه گونه جلبک سندسموس آلبیکوس، سندسموس آکیتوس، سندسموس اینکراس اتیولس از پساب‌های صنعتی. فصلنامه پژوهش‌های علوم کشاورزی پایدار، ۱ (۲): صفحات ۴۸-۶۲.
- امیری، م.، حسینی، س.، خیام باشی، ب. و اسدی، غ.، ۱۳۹۹. بهینه‌سازی شرایط استخراج آنزیمی پروتئین و شناسایی پروتئین‌های ریز جلبک سندسموس آلبیکوس. علوم غذایی و تغذیه، ۱۸ (۲): صفحات ۴۷-۶۰.
- طاهر پور، آ.، ارچنگی، ب.، قائم‌مقامی، ص.، ذوالقرنین، ح. و غانمی، ک.، ۱۳۹۵. شناسایی مورفولوژیک و مولکولی جلبک‌های قهوه‌ای گونه پادینا در سواحل بندرلنگه، خلیج فارس، مجله علوم و فنون دریایی، ۱۵ (۲): صفحات ۸۹-۹۶.
- غفاری، س.، رازقی، ج.، رمضان نژاد قادی، ر.، دباغ محمدی، ع. و مسعودی، م.، ۱۳۹۸. مطالعه ساختار جمعیتی و تنوع زیستی جلبک‌های رودخانه ارس. نشریه اکو بیولوژی تالاب، ۱۱ (۴۲): صفحات ۱۰۵-۱۱۵.

Akash, P., Spandan, C., Bakhtiyar A. S., Bharat, G., Pankaj, P. and Beena, P., 2018. Rbcl Marker Based Approach for Molecular Identification of Arthrospira and Dunaliella Isolates from Non-Axenic Cultures. Journal of Genetics and Genetic Engineering, 2 (2): 24-34.

Christa, G., Wescott, L., Schäberle, T. F., König, G. M. and Wägele, H., 2013. What remains after 2 months of starvation? Analysis of sequestered algae in a photosynthetic slug, Plakobranchus ocellatus (*Sacoglossa, Opisthobranchia*), by barcoding. Planta. 237: 559-572.

Coleman, A. W., 2009. Is there a molecular key to the level of "biological species" in eukaryotes? A DNA guide. Molecular Phylogenetic and Evolution, 50(1): 197-203.

Delwiche, C. F., Kuhsel, M. and Palmer, J. D., 1995. Phylogenetic analysis of tufA sequences indicates a cyanobacterial origin of all plastids. Molecular Phylogenetic. And Evolution, 4: 110 – 128.

Du, G., Wu, F., Mao, Y., Guo, S., Xue, H. and Bi, G., 2014. DNA barcoding assessment of green macroalgae in coastal zone around Qingdao, China. Journal of Ocean University of China, 13:97-103.

Eida, M., Darvesh, O. M. and Matter, I. A., 2018. Cultivation of Oleaginous Microalgae *Scenedesmus obliquus* on Secondary Treated Municipal Wastewater as Growth Medium for Biodiesel Production. Journal of Ecological Engineering, 19(5): 38-51.

Famà, P., Wisor, B., Kooistra, W. H. and Zuccarello, G. C., 2002. Molecular phylogeny of the genus *Caulerpa* (Caulerpaceae, Chlorophyta) inferred from chloroplast tufA gene1. Journal of phycology, 38(5): 1040-1050.

Fawley, M. W. and Fawley, K. P., 2020. Identification of Eukaryotic Microalgal Strains. Journal of Applied Phycology, 32(5): 2699-2709

Fusun, A., Kizil, K., Tuney, I., Riza, A. and Huseyin, E., 2017. Morphological and Molecular Characterization of *Scenedesmus*-Like Species from Ergene River Basin (Thrace, Turkey).

Gani, N., Shahzadi, N., Sana S., Inam U., Ehsan A., Javed I., Tanzila R. and Munazza M., 2020. Isolation of Several Indigenous Microalgae from Kallar Kahar Lake, Chakwal Pakistan. Iranian Journal of Biotechnology. 1, 18(3): e2214.

Garcia-Cuetos, L., Moestrup, Ø., Hansen, P. J. and Daugbjerg, N., 2010. The toxic dinoflagellate *Dinophysis acuminata* harbors permanent chloroplasts of cryptomonad origin, not kleptochloroplasts. Harmful Algae, 9: 25-38.

- Gour, R. S., Chawla, A., Singh, H., Chauhan, R. S. and Kant, A., 2016.** Characterization and screening of native *scenedesmus* sp. isolates suitable for biofuel feedstock. PloS one, 11(5): e0155321.
- Guiry, M. and Guiry, G., 2015.** AlgaeBase. 2009. World-wide electronic publication. National University of Ireland, Galway.
- Lawton, R. J., Mata, L., de Nys, R. and Paul, N. A., 2013.** Algal bioremediation of waste waters from land-based aquaculture using ulva: selecting target species and strains. PLOS ONE, 8: e77344.
- Leliaert, L., Verbruggen, H., Vanormelingen, P., Steen, F., López-Bautista, J. M., Zuccarello, J. C. and De Clerck, O., 2014.** DNA-based species delimitation in algae. Eur J Phycol, 49: 179–196.
- Hegewald, E., 1997.** Taxonomy and phylogeny of Scenedesmus. Algae, 12(4): 235-246.
- Kazi, M. A., Reddy, C. and Jha, B., 2013.** Molecular phylogeny and barcoding of Caulerpa (Bryopsidales) based on the tufA, rbcL, 18S rDNA and ITS rDNA genes. PloS one, 8(12): e82438.
- Kumar, N., Banjee, C. and Jagadevan, S., 2021.** Identification, characterization, and lipid profiling of microalgae *Scenedesmus* sp. NC1, isolated from coal mine effluent with potential for biofuel production. Biotechnology Reports, 30: e00621
- Lürling, M. 1999.** The smell of water: grazer-induced colony formation in *Scenedesmus*: WIMEK, Aquatic Ecology and Water Quality Management.
- Patel, A., Chaudhary, S., Alam Syed, B., Gami, B., Patell, P. and Patell, B., 2018.** rbcL Marker Based Approach for Molecular Identification of *Arthrospira* and *Dunaliella* Isolates from Non-Axenic Cultures. Journal of Genetics and Genetic Engineering, 2 (2): 24-34.
- Sarwa, P. and Verma S. K., 2017.** Identification and Characterization of Green Microalgae, *Scenedesmus* sp. MCC26 and *Acutodesmus obliquus* MCC33 Isolated from Industrial Polluted Site Using Morphological and Molecular Markers. International Journal of Applied Sciences and Biotechnology, 5(4):415.
- Saunders, G. W. and Kucera, H., 2010.** An evaluation of rbcL, tufA, UPA, LSU and ITS as DNA barcode markers for the marine macroalgae. Cryptogam. Algal. 31 487 – 528.
- Senousy, H. H., Beakes, G. W. and Hack, E., 2004.** Phylogenetic placement of *Botryococcus braunii* (Trebouxiophyceae) and *Botryococcus sudeticus* isolate Utex 2629 (Chlorophyceae) 1. Journal of phycology, 40(2): 412-423.
- Mann, D., Sato, S., Trobajo, R., Vanormelingen, P. and Souffreau, C., 2010.** DNA barcoding for species identification and discovery in diatoms. Cryptogam Algal, 31: 557–577
- Ye, S., Gao, L., Zhao, J., An, M., Haiming Wu, H. and Li, M., 2020.** Simultaneous wastewater treatment and lipid production by *Scenedesmus* sp. HXY2 . Bioresour Technology, 302: 122903
- Tran, D., Louime, C., Võ, T., Giordano, M., Portilla, S., Doan, N., Bui, L., 2013.** Identification of *Dunaliella viridis* using its markers. *International Journal of Applied*, 3(4).
- Vieira, H. H., Bagatini, I. L., Guinart, C. M. and Vieira, A. A. H., 2016.** tufA gene as molecular marker for freshwater Chlorophyceae. *Algae*, 31(2): 155-165.
- Wynne, M. J., Verbruggen, H. and Angel, D. L., 2009.** The recognition of *Caulerpa integerrima* (Zanardini) comb. et stat. nov. (*Bryopsidales*, *Chlorophyta*) from the Red Sea. Phycologia, 48: 291–301.
- Zou, S. Fei, C., Song, J., Bao, Y., He, M. and Wang, C., 2016.** Combining and comparing coalescent, distance and character-based approaches for barcoding microalgae: A Test with *Chlorella-like* species (*Chlorophyta*). PloS one, 11(4): e0153833.