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

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: ۱۴۰۰۰۳۰۹۱۵
تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۱۵
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۳۰
این مقاله پژوهشی و برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد است.

چکیده

جلبک تک‌سلولی Scenedesmus یک جلبک سبز باارزش صنعتی و غذایی فراوان است. ازاین‌رو 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، چون‌که این صفات تحت شرایط رشدی مختلف، می‌توانند تغییر کنند و باعث سردرگمی در رده‌بندی این جلبک شود. ازاین‌رو 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، موردبررسی قرار گرفت. در این مطالعه DNA دو نمونه جلبکی سندسموس مربوط به رود ارس و محل پرورش ماهی‌های زینتی در تبریز استخراج‌شده و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی ژن‌های ITS، tufA، 18s rRNA، CV انجام گرفت، در ادامه توالی یابی محصولات PCR انجام‌شده و توالی‌ها مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفتند. درخت فیلوژنی مربوط به نشانگرها توسط نرم‌افزار Mega7 به سه مدل Maximum likelihood, Neighbor-joining, Maximum parsimon رسم گردیده و درخت‌ها باهم مقایسه و بر اساس نتایج حاصل، نشانگر tufA به‌عنوان نشانگر مناسب انتخاب شد. با بررسی درخت فیلوژنتیکی مربوط به نشانگر tufA، نمونه موردمطالعه سندسموس مربوط به رود ارس و محل پرورش ماهی‌های زینتی در تبریز به جلبک *S.accuminatus* که در این تحقیق به‌عنوان شاهد استفاده‌شده بود در یک خوشه قرارگرفته 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.

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 به‌عنوان سوخت زیستی نقش مهمی ایفا کرده است (Gani *et al*., 2020؛ Eida M *et al*., 2018).

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-08-25]

Scenedesmus یک جنس از جلبک‌های سبز در رده‌ی Chlorophyaceae 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*، *Acutodesmus*، *Scenedesmus* 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 پرطرفدارترین گونه‌های جلبک دریایی است و به دلیل تنوع بسیار بالا ازنظر مورفولوژی شناسایی آن بسیار مشکل است (Hegewald, 1997؛ Guiry and Guiry, 2015).

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 (Lürling *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 تائید 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 dimorphus* و *Scenedesmus quadricauda* 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. ازآنجایی‌که کلرلا در حال تبدیل‌شدن به سوخت‌های زیستی نسل دوم است شناسایی این‌گونه نیز از اهمیت زیادی برخوردار است اما به‌راحتی ازلحاظ 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 خلیج‌فارس 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 قرارگرفته و شباهت ژنتیکی بالایی را نسبت به گونه‌های مقایسه شده نشان دادند درحالی‌که بررسی مورفولوژیکی دو گونه نشان می‌دهد که ازنظر رنگ، طول تال، بریدگی حاشیه‌ها کاملاً متفاوت بوده است. به‌طورکلی 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 قرارگرفته 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* قرارگرفته است (Tran *et al*., 2013).

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

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-08-25]

در مطالعه دیگری که از پرایمرهای ITS1-ITS4 برای شناسایی مولکولی و مقایسه با ریخت‌شناسی سندموس های موجود در رودخانه Ergene ترکیه انجام شد، پژوهش‌ها نشان داد که باوجوداینکه 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 قرارگرفته 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 کد کننده‌ی 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 سندسموس 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 ماهی های زینتی جمع‌آوری و ایزوله شده و آب شرب تبریز استفاده‌شده است. همچنین از دو جلبک *Scenedesmus acuminatus* و *Scenedesmus obliquus* به‌عنوان شاهد استفاده‌شده است. جلبک‌ها در محیط کشت ۱۱BG کشت داده شدند. پس از واکشت مکرر، استخراج DNA از نمونه‌ها با استفاده از روش CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) 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 هرکدام از پرایمر های 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 پرایمر های مورداستفاده به‌صورت جداگانه به دستگاه داده‌شده 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 موردمطالعه 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 موردمطالعه در این تحقیق توسط نرم‌افزار ۷MEGA تجزیه‌وتحلیل شدند. جهت رسم درخت‌های فیلوژنی برای هرکدام از نشانگرها اطلاعات مربوطه به نرم‌افزار داده شد بعد از Align کردن DNA نمونه‌های داده‌شده و پس از هم‌ردیف سازی و مقایسه توالی‌ها، درخت‌های فیلوژنی به روش‌های MP (Maximum Parsimony)،NJ(Neighbor Joining)،ML (Maximum Likelihood) ترسیم شدند.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-08-25]

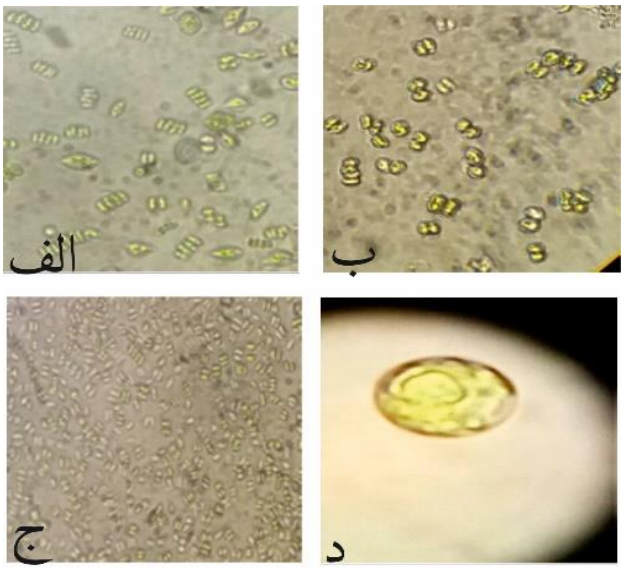
نتایج تحقیق توسط نرم‌افزار MEGA7 تجزیه‌وتحلیل شدند. جهت رسم درخت‌های فیلوژنی برای هرکدام از نشانگرها اطلاعات مربوطه به نرم‌افزار داده شد بعد از Align کردن DNA نمونه‌های داده‌شده و پس از هم‌ردیف سازی و مقایسه توالی‌ها، درخت‌های فیلوژنی به روش‌های MP (Maximum Parsimony)، NJ (Neighbor Joining)، ML (Maximum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

جدول ۱: توالی پرایمر های استفاده‌شده.

نام پرایمر	توالی پرایمر
ITS1(F)	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS2(R)	GCTGCGTTCTTCATCGATGC
18s rRNA(F)	AACCTGGTTGATCCTGCCAGT
18s rRNA(R)	TGATCCTTCTGCAGGTTCACCTAC
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 ازلحاظ 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 دیاگرام نمونه‌ها را بر اساس دارا بودن یا نبودن برخی صفات چون خار، جلبک سبز بودن، کلنی، تاژه، دوکی‌شکل بودن، دارا بودن پیرنوئید و غیره موردبررسی قرار داده و به‌صورت برنامه‌ای به SPSS V 16 وارد گردید.



شکل ۱: تصاویر میکروسکوپی مربوط به:

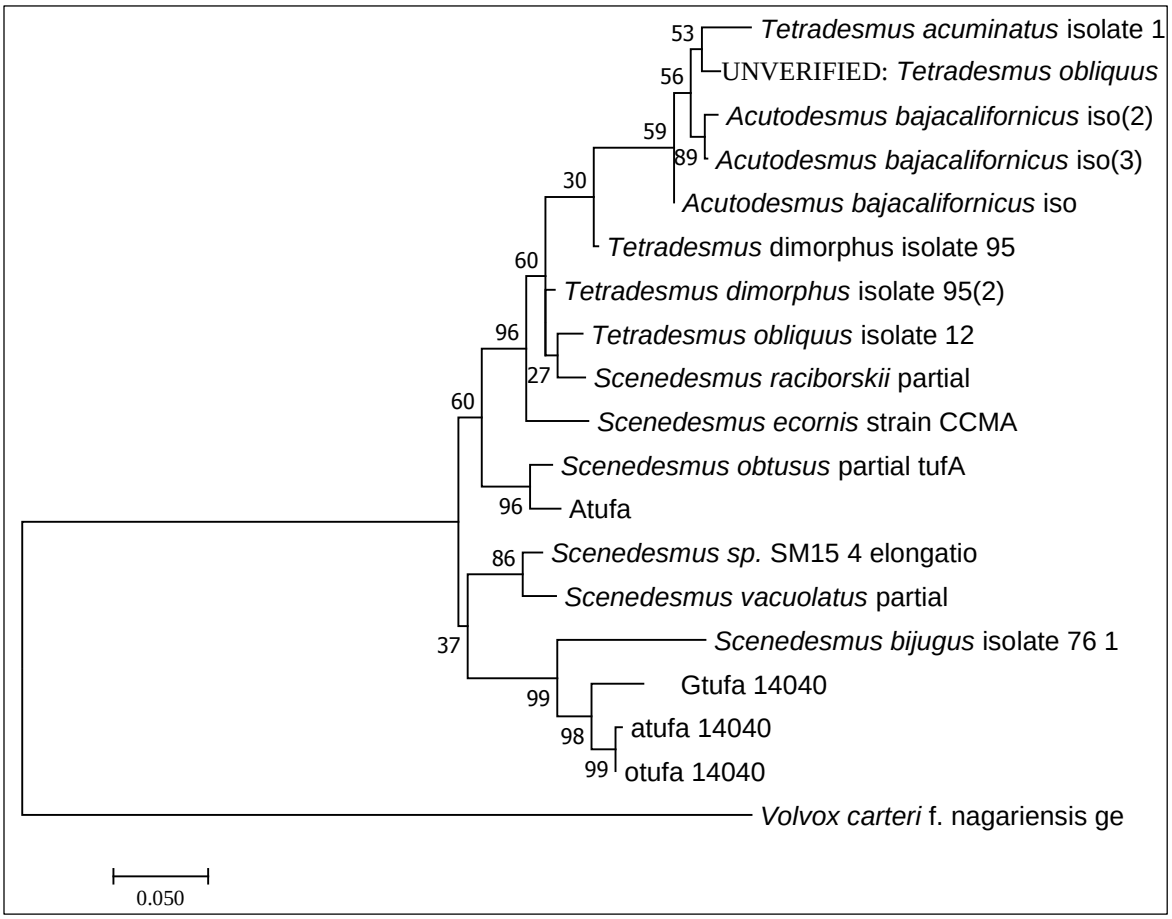
الف (جلبک ایزوله محل پرورش ماهی‌های زینتی ب) *S.accumonatus* ج) جلبک مربوط به رود ارس د) *S.obliquus*

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-08-25]

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 انجام‌گرفته 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 ازنظر صفات مورفولوژیکی موردبررسی 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 ذکرشده 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* استفاده‌شده، انتخاب شد. درخت‌های فیلوژنی به روش، ML (شکل ۲)، MP (شکل ۳) و NJ (شکل ۴) رسم شد که جلبک *Volvox* به‌عنوان outgroup انتخاب‌شده و دو جلبک *S. obliquus* و *S. acuminatus* به‌عنوان شاهد مورداستفاده قرارگرفته‌اند. عددهای موجود در قسمت گره‌های مربوطه به درخت نشانگر tufA نشان می‌دهد که سندسموس جمع‌آوری‌شده از محل پروش ماهی‌های زینتی با *S. obtusus* بیشترین بوت استرپ (بالای ۹۰ درصد) تائید شدند و دریک 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 دریک کلاد با بوت استرپ بیش از ۹۰ درصد تائید شدند (شکل ۲).

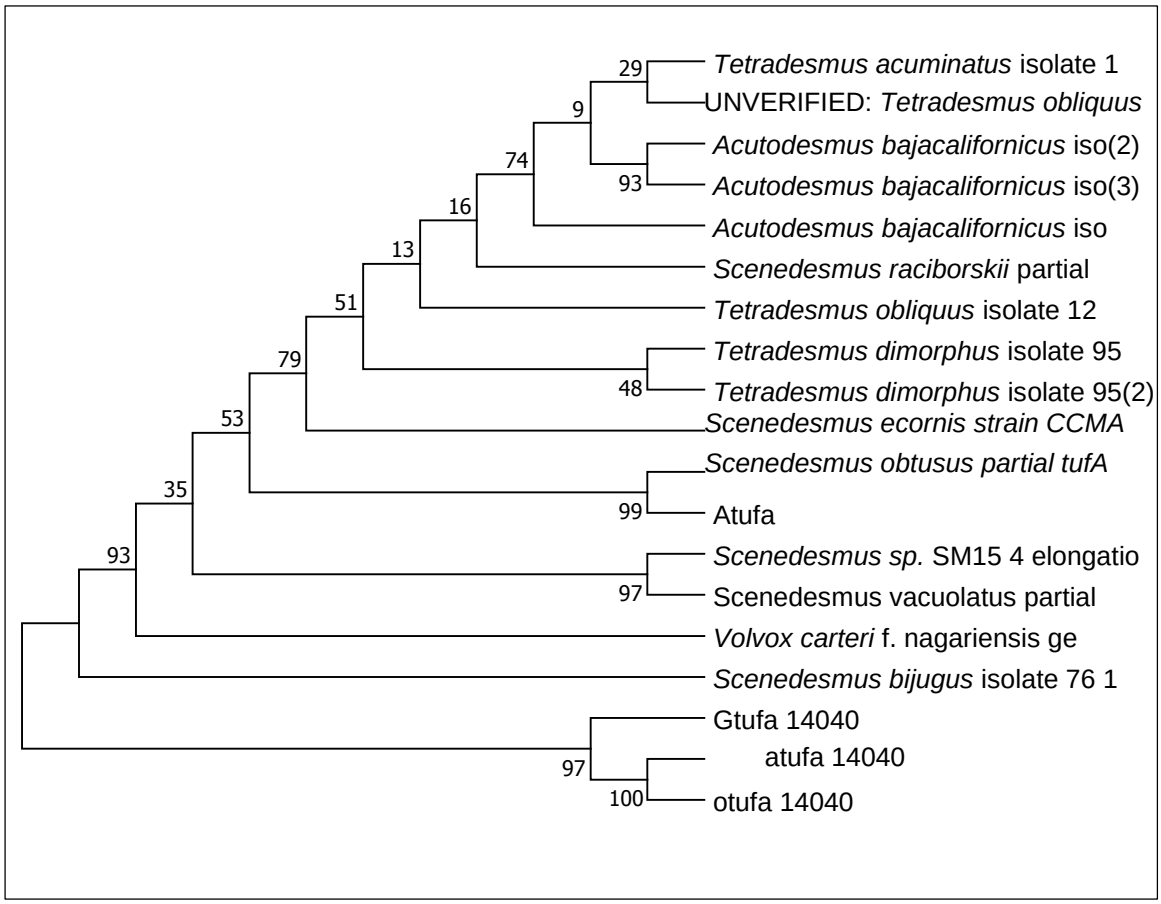
[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-08-25]



شکل ۲: درخت فیلوژنی ترسیم‌شده توسط نرم‌افزار Mega7 مربوط به نشانگر tufA با روش Maximum likelihood.

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

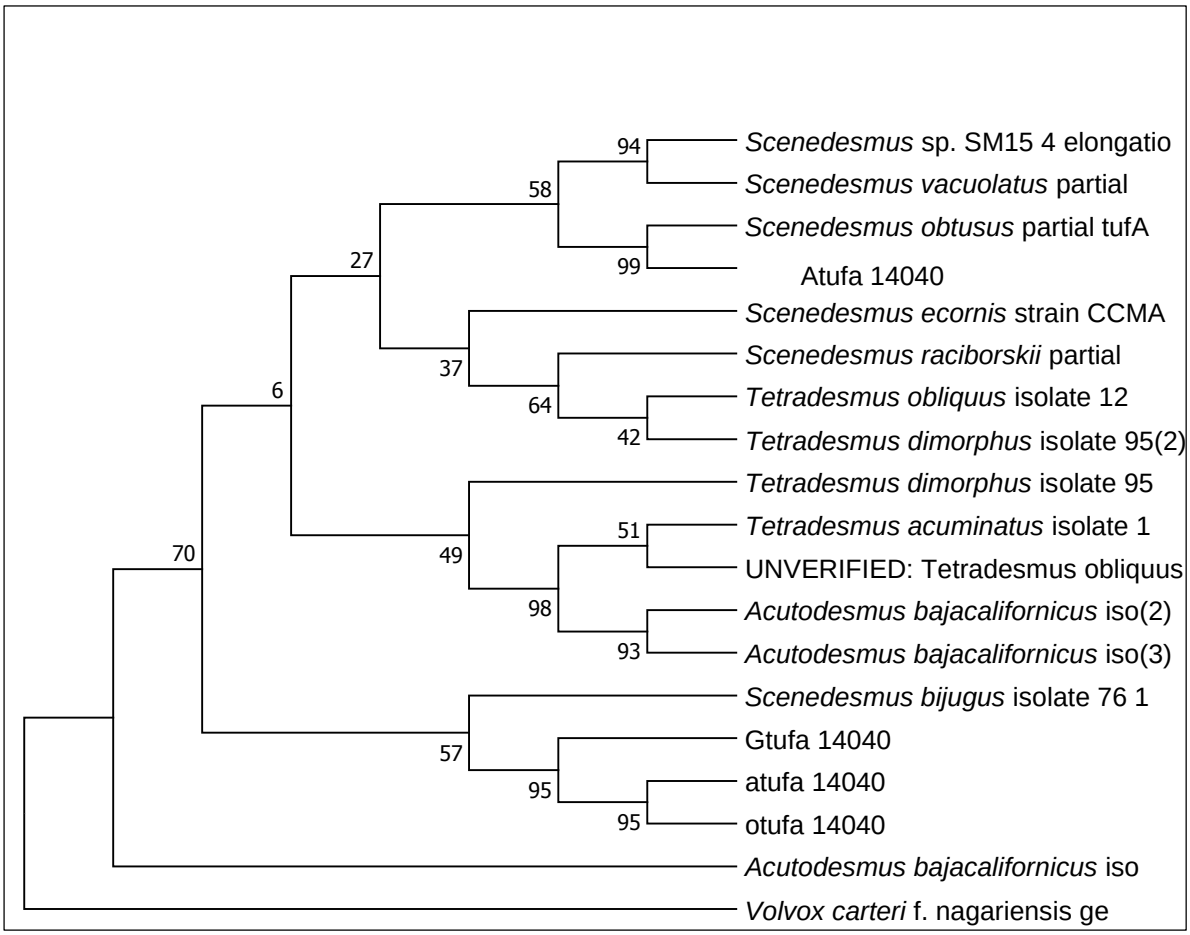
[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-08-25]



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

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

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-08-25]



شکل ۴: درخت فیلوژنی ترسیم‌شده توسط نرم‌افزار Mega7 مربوط به نشانگر tufA با روش Neighbor-joining.

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

به‌منظور شناسایی نمونه‌های جلبکی سندسموس جلفا به سیه‌رود و سندسموس محل پرورش ماهی‌های زینتی درخت فیلوژنی به سه مدل NJ.MP وML رسم شد. در این درخت جلبک *Volvox* به‌عنوان outgroup انتخاب‌شده و دو جلبک *S. obliquus* و *S. acuminatus* به‌عنوان شاهد مورداستفاده قرارگرفته‌اند. مقایسه‌ی درخت‌های ترسیم‌شده نشانگرهای ITS، 18s rRNA، CV و tufA نشان می‌دهد که عددهای موجود در قسمت گره‌های مربوطه به درخت نشانگر tufA نشان می‌دهد که سندسموس جمع‌آوری‌شده از محل پروش ماهی‌های زینتی با *S. obtusus* بیشترین بوت استرپ (بالای ۹۰ درصد) تائید شدند و دریک 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 دریک کلاد با بوت استرپ بیش از ۹۰ درصد تائید شدند.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-08-25]

بحث و نتیجه‌گیری

ریزجلبک‌ها به دلیل ظرفیت سازگاری بالای خود، کاربردهای صنعتی متعددی ازجمله در بخش مواد غذایی و تولید سوخت زیستی دارند. بااین‌حال، 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 معرفی‌شده 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 آزمایش‌شده نشانگر قابل‌اعتمادتری است که تائید 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 استفاده‌شده است.

به‌طوری‌که در سیانوباکتری‌ها از ژن tufA برای شناسایی منشأ سیانوباکتریایی پلاستیدهای جلبک‌های سبز، قرمز، کروموفیت‌ها و سیانوفورا پارادوکسا استفاده‌شده است (Delwiche *et al*., 1995) و برای فیلوژنی مولکولی جنس کالرپا (کلروفیتا) از ژن tufA استفاده‌شده است (Fama *et al*., 2002) و در مطالعه‌ای که بر روی رده‌ی Chlorophyceae انجام‌شده است نشان می‌دهد که نشانگر tufA نسبت به نشانگرهای ucp4، rbcl، ITS مورداستفاده شده از برتری محسوسی در شناسایی رده‌ی Cholorophyceae برخوردار است (Vieira *et al*., 2016). در مورد ماکرو جلبک‌های سبز دریایی نیز نتایج به‌دست‌آمده از پرایمر های اختصاصی ژن tufA به دلیل موفقیت تکثیر بالا و پوشش مناطق اینترونی 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 آزمایش‌شده 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 بهITS، 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، توالی یابی 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).

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-08-25]

با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق و مطالعات انجام‌شده در مورد سایر ریز جلبک‌های سبز می‌توان گفت که بارکد DNA مربوط به ریز جلبک‌های سبز مانند سندسموس همراه با تجزیه‌وتحلیل 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 آبلیکوس، سندسموس آکیتوس، سندسموس اینکراس اتیولس از پساب‌های صنعتی. فصلنامه پژوهش‌های علوم کشاورزی پایدار، ۱ (۲): صفحات ۶۲–۴۸.

امیری، م.، حسینی، س، خیام باشی، ب. و اسدی، غ.، ۱۳۹۹. بهینه‌سازی شرایط استخراج آنزیمی پروتئین و شناسایی پروتئین‌های ریز جلبک سندسموس آبلیکوس. علوم غذایی و تغذیه، ۱۸ (۲): صفحات ۶۰-۴۷.

طاهر پور، آ.، ارچنگی، ب.، قائم‌مقامی، ص.، ذوالقرنین، ح. و غانمی، ک.، ۱۳۹۵. شناسایی مورفولوژیک و مولکولی جلبک‌های قهوه‌ای گونه پادینا در سواحل بندرلنگه، خلیج‌فارس، مجله علوم وفنون دریایی، ۱۵ (۲): صفحات ۹۶–۸۹.

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 ۱۱۵–۱۰۵.

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 Phylogenet 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. Moleular Phylogenet. 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 Univercity 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., Wysor, B., Kooistra, W. H. and Zuccarello, G. C., 2002. Molecular phylogeny of the genus *Caulerpa* (Caulerpales, 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. solation 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.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-08-25]

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., Banjeree, 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. Algol. 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 Algol, 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 microalgaes: A Test with *Chlorella-like* species (Chlorophyta). PloS one, 11(4): e0153833.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-08-25]