



## ORIGINAL RESEARCH PAPER (Marine Science)

## Phylogenetic identification of Microalgae which isolated from the southern coast of the Caspian Sea

Noraddin Hosseinpour azad <sup>1,\*</sup>, Khadijeh Fathalipour <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Plant Science and Medicinal Plant, Meshginshahr Faculty of Agriculture, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabl, Iran.

<sup>2</sup> M.Sc of Plant Biotechnology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

## ARTICLE INFO

Code: A-10-1676-1

## Article History:

Received: 2020/11/13

Revised: 2021/12/19

Accepted: 2021/04/11

## Keywords:

Microalgae

Ribosomes

Molecular classification

16srDNA

\*Corresponding author:

[s.nahavandian@modares.ac.ir](mailto:s.nahavandian@modares.ac.ir)

## ABSTRACT

**Background and Objectives:** Microalgae are rich sources of active metabolites, which today are considered important sources of biofuels in addition to medicinal and food uses. This study used ribosomal markers to determine the phylogenetic position of microalgae species isolated from the Caspian Sea's southern coast.

**Methods:** Microalgae grown in a suspension culture medium were precipitated using iron (III) chloride solution for molecular studies. After extraction of genomic DNA by freeze-thawing method, the gene loci encoding ribosomal subunits (16srDNA) were amplified using 36 pairs oligos by polymerase chain reaction (PCR), the amplified gene loci were inserted into the pTZ57R /T vector by TA cloning technique then transformed in the Dh5 $\alpha$  bacterial and sequenced follow by purification.

**Findings:** Fourteen pairs of primers showed good amplification of the target gene in the microalgae genome. The obtained sequences were edited by Vector NTi ver. 11 software and then blasted at the NCBI. Sequences with more than 90% similarity were selected. The molecular distance of the data was estimated by MEGA 6 software. Phylogenetic analyses were performed by calculating the maximum short molecular trees (Maximum Parsimony, MP) for the sequence of the studied genes. Then, the Bootstrap 1000 index was used for analysis to test the accuracy of the nodes.

**Conclusion:** The phylogenetic tree and similarity matrix with the Maximum Parsimony method for all 14 gene regions showed that the studied species have the lowest genetic distance with the algal strain *Spirulina laxissima*.

 [10.52547/joc.12.47.41](https://doi.org/10.52547/joc.12.47.41)

©2021 JOC. All rights reserved



NUMBER OF TABLES

2



NUMBER OF FIGURES

7



NUMBER OF REFERENCES

26

## شناسایی فیلوژنتیکی ریزجلبک ایزوله شده از سواحل جنوبی دریای خزر

نورالدین حسین پورآزاد<sup>۱\*</sup>، خدیجه فتحعلی پور<sup>۲</sup><sup>۱</sup> گروه علوم گیاهی و گیاهان دارویی، دانشکده کشاورزی مشهدین شهر، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران<sup>۲</sup> کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

اطلاعات مقاله	چکیده
تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۷/۱۲	<p><b>پیشینه و اهداف:</b> ریزجلبکها از جمله منابع غنی از متابولیت‌های فعال بوده، که امروزه علاوه بر مصارف دارویی و غذایی به عنوان منابع مهم سوخت‌های زیستی مطرح هستند. در این تحقیق از نشانگرهای ریبوزومی به جهت تعیین جایگاه فیلوژنتیکی گونه ریزجلبکی برداشت شده از سواحل جنوبی دریای خزر استفاده شد.</p> <p><b>روش‌ها:</b> برای مطالعات مولکولی، ریزجلبک‌های رشد یافته در محیط کشت سوسپانسیونی با بکارگیری محلول کلرید آهن (III) رسوب داده شدند. پس از استخراج DNA ژنومی به روش ذوب و یخ، نواحی ژنی کد کننده زیرواحد‌های ریبوزومی (۱۶srDNA) با استفاده از ۳۶ جفت آغازگر با واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) تکثیر و سپس با تکنیک TA Cloning در ناقل pTZ57R/T نوترکیب شده و پس از تراریختگی در سویه باکتریایی Dh5α با خالص‌سازی پلاسمیدهای بدست آمده از روی ژل، توالی‌یابی شدند.</p> <p><b>یافته‌ها:</b> تعداد ۱۴ جفت آغازگر تکثیر قابل قبولی از نواحی ژنی مورد هدف در ژنوم ریزجلبک نشان دادند. توالی‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار Vector NTi ver. 11 ویرایش و سپس در پایگاه ژنتیکی (NCBI) بلاست گردیدند. توالی‌های با تشابه بالاتر از ۹۰٪ انتخاب و مقایسه فاصله مولکولی داده‌ها با استفاده از نرم افزار MEGA 6 و تحلیل‌های فیلوژنتیک با محاسبه درخت‌های مولکولی میانبرترین (Maximum Parsimony, MP) برای توالی ژن‌های مورد مطالعه انجام، و سپس برای آزمون میزان صحت گره‌ها از شاخص بوت‌استرپ ۱۰۰۰ برای تحلیل‌ها استفاده گردید.</p> <p><b>نتیجه‌گیری:</b> نتایج حاصل از رسم درخت فیلوژنی و ماتریس تشابه با روش Maximum Parsimony برای هر ۱۴ ناحیه ژنی نشان داد که گونه مورد مطالعه کمترین فاصله ژنتیکی را با سویه جلبکی Spirulina laxissima دارد.</p>
تاریخ بازبینی: ۱۴۰۰/۱۱/۱۰	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۴/۱۷	
<b>واژگان کلیدی:</b> سیانوباکتر اسپیرولینا ریبوزوم طبقه بندی مولکولی s DNA ۱۶	
*نویسنده مسئول ✉ gmplant21@gmail.com	

## مقدمه

مورفولوژیکی جهت شناسایی ریزجلبکهای جدا شده از دریاچه مانینجو در سوماترای شرقی بکار گرفته شد [۷]. در تحقیق دیگر به جهت معرفی آغازگرهای مورد اعتماد در شناسایی گونه‌های مختلف ریزجلبک، از آغازگرهای متعدد طراحی شده از نواحی ژنی ریبوزومی 18SrDNA جهت شناسایی ریزجلبکهای کشت داده شده استفاده گردید، از مجموعه آغازگرهای استفاده شده تعداد ۳۴ آغازگر جهت تمایز مولکولی بین گونه‌های مختلف ریز جلبک مناسب تشخیص داده شد [۸]. در موسسه تحقیقات دریای برونو، تعداد ۵ سویه از ریزجلبکها با استفاده از نشانگرهای ریبوزومی طراحی شده از نواحی ژنومی 18SrDNA را مورد ارزیابی قرار دادند، نتایج نشان داد بکارگیری روش‌های تلفیقی مولکولی و روشهای کلاسیک از جمله پارامترهای مورفولوژیکی بعنوان روشی دقیق در شناسایی گونه‌های ریزجلبکی می‌باشد [۹]. شناسایی دقیق ریزجلبکها از مهمترین ضروریات جهت معرفی این میکروارگانیسمها جهت بکارگیری در صنایع می‌باشد، با این دیدگاه در تحقیق حاضر، از نشانگرهای ریبوزومی به عنوان قویترین و دقیقترین ابزار به جهت شناسایی جایگاه فیلوژنتیکی گونه ریزجلبک برداشت شده از سواحل جنوبی دریای خزر استفاده گردید.

## روش پژوهش

## ۱. نمونه‌گیری

نمونه‌های ریزجلبکی ناشناخته از سواحل جنوبی دریای خزر جمع آوری شده و سپس به آزمایشگاه فایکولب جهت کشت و ارزیابی مولکولی انتقال داده شدند.

## ۲. کشت در محیط آگار

طبق پروتکل به میزان ۱۵۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های ریزجلبکی برداشت شده از آبهای دریا بر روی محیط کشت آگار جامد در ظروف کشت بطور یکسان پخش شده و جهت رشد در دمای  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  در اتاقک رشد قرار داده شدند [۱۰].

## ۳. محیط کشت سوسپانسیونی

محیط کشتهای مختلفی برای ریزجلبکها در دسترس است، یکی از عمومی‌ترین آنها محیط کشت گیلارد می‌باشد، در این تحقیق از محیط کشت گیلارد تغییر یافته با افزودن ویتامین ب-کمپلکس در محیط کشت ریزجلبکها استفاده شد [۶].

## ۴. ضد عفونی محیط کشت

از آب دریای خزر با غلظت شوری 12-13 g/l جهت آماده سازی بستر محیط کشت استفاده گردید، بسترهای محیط کشت بایستی قبل از تلقیح شدن با سلولهای ریزجلبک بایستی کاملاً

سیانوباکترها میکروارگانیسم های چند سلولی رشته‌ای بوده که به ظاهر مارپیچ و بدون شاخه، به طول ۳۰۰-۲۰۰ و عرض ۵۰-۱۰ میکرومتر شناخته شده که بطور عموم به سه شکل مختلف مارپیچ، راست و موج دیده می‌شوند [۱]. ثابت شده است که ریزجلبکها از منابع غنی از متابولیت‌های زیستی فعال، تعداد زیادی از لیپوپتیدهای با خاصیت ضد باکتریایی، ضد قارچ و ضد ویروسی هستند [۲]. هم چنین ریزجلبکها، به عنوان منابع سوخته‌های زیستی مطرح بوده که توانایی تولید حجم بالایی از متابولیت های ضروری را در مدت زمان اندک دارند، سازگاری این میکروارگانیسم ها با شرایط مختلف کشت و امکان تولید آنها در شرایط خارج فصل، نرخ بالای رشدی، جذب دی اکسید کربن و بهبود کیفیت هوا، تجدید پذیری، عدم تداخل با منابع غذایی، وجود مقادیر زیاد از لیپیدها و کربوهیدراتها در ساختار سلولی این میکرو ارگانیسم‌ها را بیش از پیش به عنوان مهمترین و شناخته شده ترین منابع سوخته‌های زیستی مطرح نموده است [۳]. ارتواسپیرا پلاتنسیس (*Orthospirae platensis*) اولین ریزجلبک رشته‌ای که ژنوم آن برای اولین بار توالی یابی شد، این ریزجلبک دارای یک کروموزوم دایره‌ای شکل بوده که حاوی ۶/۸ مگابایت با ۴۴/۳٪ G-C می‌باشد. ۶۶۳۰ ژن کدکننده پروتئین در این ریزجلبک کشف شده است که ۴۹ ژن آن مربوط به RNA است و حاوی ۲ مجموعه از ژن rRNA و ۴۰ ژن tRNA می‌باشد. بطور کلی ۲۸٪ ژن‌های موجود در این ریزجلبک با ژن‌هایی با عملکرد نامشخص در دیگر موجودات مشابهت دارند در صورتی که ۲۲٪ ژنوم آن از ژن‌های شناخته شده تشکیل شده است [۴]. یکی از چالش‌های اساسی در مطالعات ژنتیکی ریزجلبکها نحوه دستیابی به مواد ژنتیکی با کیفیت می‌باشد، در تحقیقی روش شوک حرارتی جهت استخراج فیکوبیلی پروتئین‌ها از گونه‌های مختلف *Arthrospira* با ملاحظه انواع فاکتورهای مختلف همچون حلال‌ها، درجه حرارت، دوره‌های زمانی مختلف و سیکل‌های ذوب و یخ بکار گرفته شد، مقدار درجه حرارت بهینه و مدت زمان اعمال آن جهت دستیابی به بالاترین میزان فیکوبیلی پروتئین‌ها با تغییر و تکرار متوالی فرایند ذوب و یخ در شرایط دمایی ۸۰- درجه سانتیگراد به مدت ۲ ساعت و درجه حرارت ۲۵+ درجه سانتیگراد بمدت ۲۴ ساعت حاصل گردید [۵]. در بیشتر موارد، نشانگرهای مولکولی بعنوان ابزاری راحت و قابل اعتماد جهت شناخت گونه‌های گیاهی و جانوری ناشناخته می‌باشند، در تحقیقی جهت شناسایی گونه‌های قارچ *Tramete* جمع آوری شده از کشور نیجر از نشانگرهای ITS طراحی شده از نواحی rDNA استفاده شد [۶]. آغازگرهای مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) طراحی شده از نواحی ریبوزومی 16SrDNA و 18SrDNA با ترکیب خصوصیات

شده و در محیط‌های کشت تلقیح گردند سپس تمامی محیط‌ها به سیستم هوادهی مداوم با پمپ هوا متصل گردیده و در زیر نور با شدت ۱۷۰۰ لوکس قرار داده شدند [۱۱].

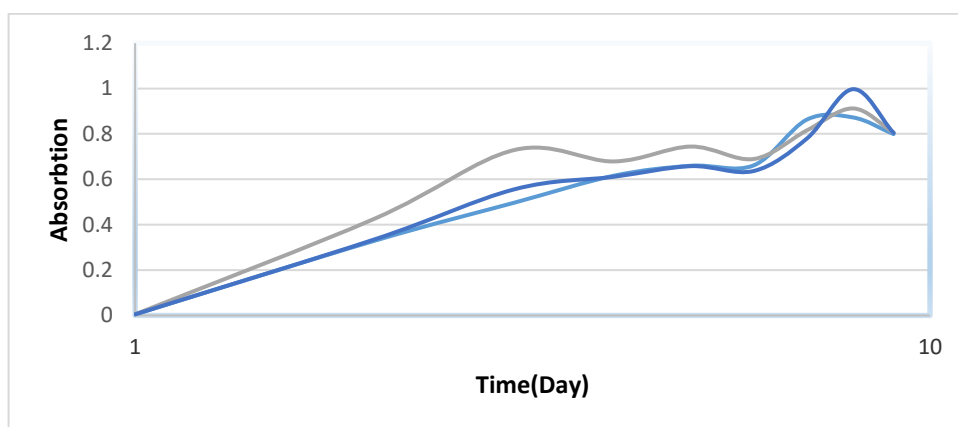
### ۶. شمارش سلولی

ارزیابی باروری محیط‌های کشت پس از تلقیح با ریزجلبکها و روند رشد سلولی با استفاده از روش سنجش تراکم سلولی در واحد حجم از محیط‌های کشت با بکارگیری روش اسپکتروفوتومتری در طول موج ۶۸۴ نانومتر در هر ۲۴ ساعت صورت گرفت. در طول دوره رشدی در فاز تکثیر همبستگی بین چگالی نوری اندازه گیری شده در طول موج ۶۸۴ نانومتر و میزان غلظت سلولی با شمارش سلولها در واحد سطح با لام هماسیتومتر تعیین گردید (شکل ۱) [۱۲، ۱۳].

استریل گردند، در ضد عفونی محیط‌های کشت از روشهای مختلف، همچون اتوکلاو، فیلتراسیون و محلول کلرین به جهت فراهم سازی محیط مناسب رشد عاری از آلودگی با هرگونه آلودگی استفاده می‌شود، از بین این روشها از محلول کلرین ۰.۷٪ به دلیل مقرون به صرفه بودن از نظر مدت زمان ضدعفونی و کارایی بالا در از بین بردن میکروارگانیزم ها استفاده گردید.

### ۵. تلقیح محیط‌های کشت

مقدار ۵ لیتر از آب ضدعفونی شده در ظرفهای پلاستیکی به حجم ۸ لیتر ریخته شده و به هریک از آنها ۰.۲۵ درصد حجمی از محیط کشت گیلارد تغییر یافته به عنوان مواد غذایی مورد نیاز رشد سلولی ریزجلبکها اضافه گردید. برای تلقیح محیط‌های سوسپانسیونی آماده شده با سلولهای ریزجلبک، کلنی‌های رشد یافته در محیط کشت آگار جامد با سوزنهای استریل برداشته



شکل ۱: اندازه گیری غلظت سلولی ریزجلبک در محیط کشت با دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۶۸۰ نانومتر در سه تکرار مختلف  
 Fig. 1: Measurement of microalgae cell concentration by spectrophotometer at ۶۸۰ nm in three replications.

جدول ۱: مشخصات آغازگرهای استفاده شده جهت تکثیر نواحی ژنی در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

Table 1: Specifications of the primers were used in polymerase chain reaction (PCR)

Target fragment length (bp)	Oligos sequences	Oligos cods	Num.
1200	5'-CGA CTG CTA ATA CCC GAT GT- 3'	CYAG1 F	1
	5'-ATG CTG ACC GGC GAT TAC TA- 3'	CYAG1 R	2
950	5'- GCT AGT TGG TGG GGT AAT GG- 3'	CYAG2 F	3
	5'- CCT CCT TAC GGT TGG AGT AA- 3'	CYAG2 R	4
1100	5'- GGG AAG AAC ACA ATG ACG GTA- 3'	CYAG3 F	5
	5'-GTA CGG CTA CCT TGT TAC GAC- 3'	CYAG3 R	6
1000	5'-CGT CTG ATT AGC TTG TTG GTG A- 3'	CYAG4 F	7
	5'-TGT CCG TAG CAT TGT AGT ACG TG- 3'	CYAG4 R	8
700	5'-AGA GTT TGA CTA TGG CTC AG- 3'	27 F	9
	5'-GACTAC TGG GGT ATC TAA TCC CATT-3'	780 R	10
750bp	5'-AGA GTT TGA CTC TGG CTC AG- 3'	27 F	11
	5'-GACTAC TGG GGT ATC TAA TCC CATT-3'	781 R	12
800 bp	5'-AGA GTT TGA CTM TGG CTC AG- 3'	27 F	13
	5'-GACTAC TGG GGT ATC TAA TCC CTT T-3'	782 R	14

جدول ۲: برنامه واکنش پلیمرازی تنظیم شده جهت تکثیر هر یک از آغازگرها

Table 2: Adjusted PCR program for each oligos.

Cycle and Time	Temperature (c°)	PCR stages
1		
Min3	94	Initial denaturing
35		
0:30 S	94	Denaturing
Min1	*	Anealing
Min2	72	Extension
1		
Min5	72	Final Extention

\*Annealing temperatures for all oligos includes: CYAG 1F, CYAG 2R, CYAG 2F, CYAG 2R, CYAG 3F, CYAG 3R, CYAG 4F, CYAG 4R, 27 F, 780 R, 781 R and 782 R were calculated; 45, 51, 50, 48, 55, 52, 44, 53, 48, 46, 52 and 50 respectively.

## ۷. برداشت توده سلولی ریزجلبک‌ها

در این مرحله به جهت تخلیص توده‌های ریزجلبک رشد یافته از محیط کشت سوسپانسیون از محلول کلرید آهن (III) به غلظت ۱ مولار استفاده شده و سپس جهت آگیری کامل، توده‌های جدا شده با قرار گیری در فالكون ۵۰ میلی لیتری به مدت ۲ دقیقه با سرعت ۸۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. ۱۰۰ میلی گرم از توده ریزجلبکی خالص شده در میکروتیوبهای ۱/۵ میلی لیتری ریخته و طبق پروتکل اقدام به استخراج دیان ای ژنومی نمودیم.

## ۸. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) و همسانه سازی

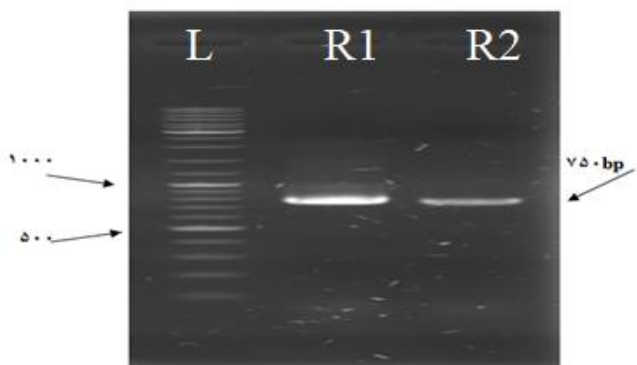
تکثیر نواحی ژنی کد کننده زیرواحدهای ریبوزومی (16srDNA) با استفاده از تعداد ۳۶ جفت آغازگر طراحی شده با نرم افزار اولیگو ۷، بر پایه مکان‌های ژنی حفاظت شده در گونه‌های مختلف ریزجلبکها (جدول ۱)، در طی برنامه واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) (جدول ۲) صورت پذیرفت [۱۴].

در نهایت ۱۰ میکرولیتر از محصولات PCR بر روی ژل آگارز (0.7%) با بکارگیری نشانگر وزنی لامبدا (Lambda DNA/EcoRI + HindIII) در ولتاژ ۸۰ به مدت ۱ ساعت تفیک شده و جهت بکارگیری در فرآیند همسانه سازی ارزیابی شدند. بدین صورت که نواحی ژنی تکثیر یافته با استفاده از تکنیک TA Cloning در ناقل pTZ57R/T الحاق گردیده و پس از تراریختگی در سویه باکتریایی Dh5α تکثیر و با خالص سازی پلاسمیدهای بدست آمده از روی ژل با استفاده از کیت Roche، توالی‌یابی گردیدند. توالی‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار Vector NTi ver. 11 ویرایش و سپس در پایگاه ژنتیکی (NCBI) بلاست گردیدند [۱۵].

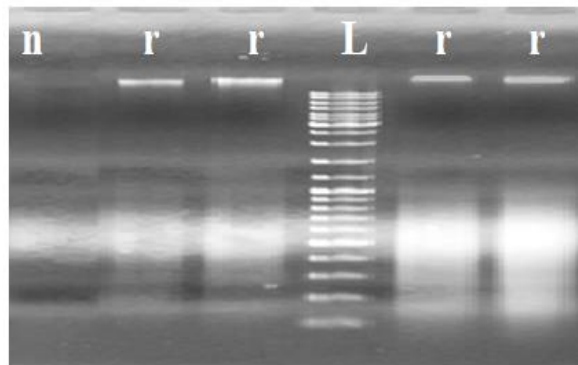
## نتایج و بحث

الگوی الکتروفورزی حاصل از دیان ای ژنومی بر روی آگارز (0.7%) نشان داد که روش استخراج شوک حرارتی به عنوان

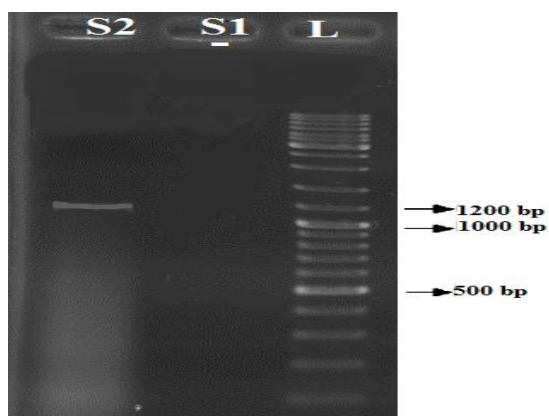
روشی مناسب در استخراج دیان ای ریزجلبک‌ها جهت استفاده در تحقیقات ژنتیک مولکولی می‌باشد. پس از تأیید کیفیت دیان ای استخراجی، تکثیر مکان‌های ژنی با استفاده از آغازگرهای طراحی شده صورت پذیرفت، از بین ۳۶ نوع آغازگر طراحی شده تعداد ۱۴ نوع تکثیر قابل قبولی داشتند که این به عنوان داده‌های پایه جهت آنالیزهای فیلوژنتیکی مورد استفاده قرار گرفتند. تمامی قطعات ژنی تکثیر یافته که الگوی الکتروفورزی تعدادی از آنها در شکل‌های (۲، ۳، ۴، ۵) آورده شده، با استفاده از روش همسانه سازی TA و در حضور آنزیم T4 لیگاز در ناقل هماندسازی R/TΔ۷pTZ الحاق گردیده و سپس ناقل نوترکیبی به روش زوب-یخ جهت تکثیر در باکتری α ۵ E.Coli- DH انتقال داده شده و پس از جداسازی ناقل‌های نوترکیب تکثیر شده در باکتری، ناقل‌های نوترکیب که دارای توالی‌های تکثیر یافته از آغازگرهای انتخابی بودند جهت توالی‌یابی از روی ژل آگارز تخلیص گردیدند (شکل ۷). اندازه باندی ناقل‌های نوترکیب مجموع اندازه توالی‌های ناقل و توالی‌های تکثیر یافته هر یک از آغازگرها می‌باشد (شکل ۶). توالی‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار Vector NTi ver. 11 ویرایش شده و صحت توالی‌های بدست آمده از این تحقیق، از طریق مقایسه با توالی‌های مشابه با سایر گونه‌های ریزجلبک اسپیرولینا با استفاده از نرم‌افزار BLAST در پایگاه داده‌های ژنتیکی (NCBI) صورت گرفت. توالی‌های با برابری بالاتر از ۹۰٪ با توالی‌های ژنی تکثیر یافته در ریزجلبک انتخاب و با استفاده از افزونه Clustal W در نرم‌افزار Bioedit ver 7.09 هم ردیفی چندگانه انجام شده (شکل ۹)، و مقایسه مولکولی داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار MEGA6 و تحلیل‌های فیلوژنتیک، با محاسبه درخت‌های مولکولی میانبرترین (Maximum Parsimony, MP) برای توالی ژن‌های مورد مطالعه انجام، و برای آزمون میزان صحت گره‌ها از شاخص بوت استرپ ۱۰۰۰ برای تحلیل‌ها استفاده شد (شکل ۸).



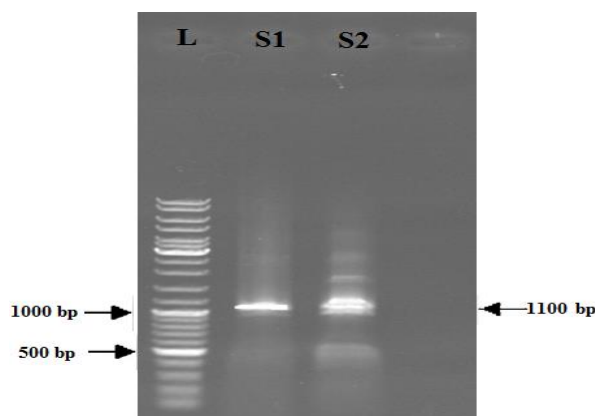
شکل ۳: تکثیر مکان ژنی ITS (75bp) با آغازگر (27 F, 781 R)  
**Fig. 3:** Extension the ITS gene locus (75 bp) by primers (27 F, 781 R)



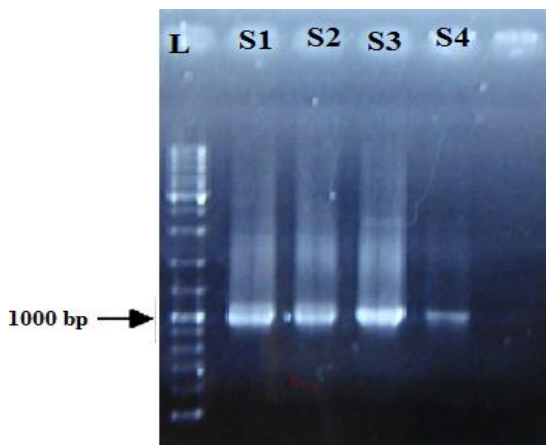
شکل ۲: الگوی الکتروفورزی دیان ای استخراج شده بر روی ژل (0.7%)، (ن: کنترل منفی، ل: نشانگر وزنی 1 kb Plus DNA Ladder، r: تکرار)  
**Fig. 2:** extracted DNA electrophoresis pattern with agarose gel (0.7%), (n: negative control, L: 1 kb Plus DNA Ladder, r: replication)



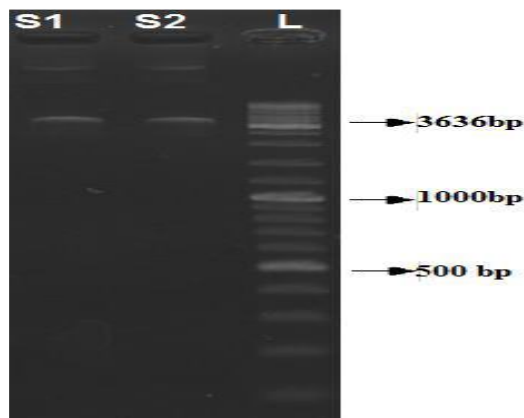
شکل ۵: تکثیر مکان ژنی ITS با آغازگرهای (CYAG1F, CYAG1R) (1200 bp)  
**Fig. 5:** Extension the ITS gene locus by primers (CYAG3F, CYAG3R) (1100 bp)



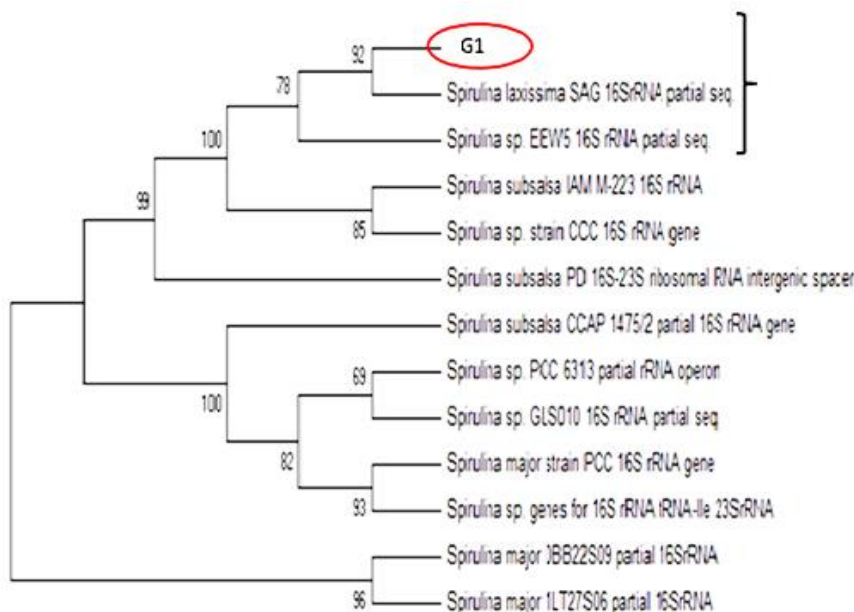
شکل ۴: تکثیر مکان ژنی ITS با آغازگرهای (CYAG3F, CYAG3R) (1100 bp)  
**Fig. 4:** Extension the ITS gene locus by primers (CYAG1F, CYAG1R) (1200 bp)



شکل ۷: تکثیر مکان ژنی ITS با آغازگرهای (CYAG4F, CYAG4R)  
**Fig. 7:** Extension the ITS gene locus (1000 bp) by primers (CYAG4F, CYAG4R)



شکل ۶: الگوی الکتروفورزی سازه نوتر ترکیب DH5α- CYAG4 (1000bp)  
**Fig. 6:** Recombinant DH5α- CYAG4 construct



شکل ۸: درخت فیلوژنی رسم شده بر اساس توالی ناحیه ژنی (تکثیر شده با آغازگر CYAG1 R و CYAG1 F) ثبت شده در سایت NCBI با روش ماکزیم پارسیمونی. Fig. 8: Phylogenetic tree created by Maximum parsimony method based on amplified primer (CYAG1) and some recorded sequences in NCBI.

جدول ۳: ماتریس فاصله تکاملی بر اساس توالی ژنی تکثیر یافته با بکارگیری آغازگر (CYAG1)

Table 3: Evolutionary distance matrix based on amplified gene sequence with primer (CYAG1)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	0.1473											
2	0.1611	0.1183										
4	0.1676	0.0877	0.1095									
5	0.1676	0.0890	0.1108	0.0021								
6	0.1702	0.0865	0.1107	0.1107	0.0021	0.0000						
7	0.1715	0.0901	0.1119	0.0021	0.0042	0.0042	0.0032					
8	0.1731	0.0877	0.1107	0.0085	0.0107	0.0107	0.0075	0.0107				
9	0.1730	0.0853	0.1233	0.0248	0.0270	0.0270	0.0237	0.0270	0.0204			
10	0.1731	0.0877	0.1107	0.0085	0.0107	0.0107	0.0075	0.0107	0.0000	0.0204		
11	0.1734	0.0879	0.1098	0.0735	0.0748	0.0748	0.0747	0.0758	0.0688	0.0710	0.0688	
12	0.1721	0.0794	0.1109	0.0803	0.0816	0.0816	0.0791	0.0826	0.0732	0.0815	0.0732	0.0548

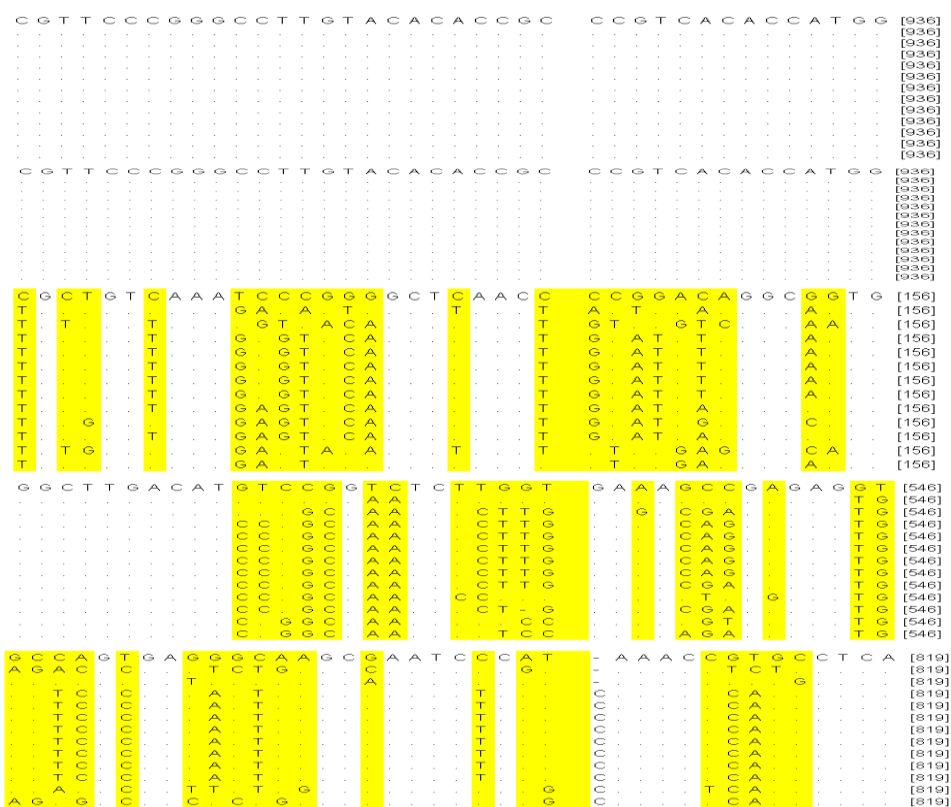
ریز جلبکها می‌باشد. به مانند سلولهای گیاهی، سلولهای ریز جلبک حاوی مقادیر زیادی از مایعات داخل سلولی می‌باشد، در طول انجام فرایند استخراج شوک حرارتی تشکیل کریستالهای یخ بین لایه‌های دیواره سلولی منجر به شکستن دیواره و به بیرون ریخته شدن محتویات سلولی منجر می‌شود [۱۷]. بدلیل اینکه ابزارهای مولکولی از جمله روشهای دقیق در شناسایی جایگاه تاکسونومیک گیاهان است، طی تحقیقی در موسسه دریایی برنثو از نشانگرهای مبتنی بر آغازگرهای طراحی شده از نواحی ژنی 18S rDNA جهت شناسایی تعداد ۵ سویه ریز جلبکی استفاده شد. نتایج حاصل از بلاست توالیهای حاصل شده نشان داد که هر یک از این سویه‌ها دارای تشابه بالا با سویه ریز جلبکی *Thalassiosira Chaetoceros gracilis* (99.77%)، *Nannochloropsis weissflogii* (99.70%)، *Isochrysis sp. oceanica* (100%)، دارند که منجر به تفکیک هر یک از سویه‌های جلبکی از همدیگر شد [۹].

ماتریس فاصله تکاملی با استفاده توالی حاصل از ناحیه ژنی تکثیر یافته در ژنوم ریز جلبک اسپیرولینا با استفاده از آغازگرهای به کار گرفته شده و توالی‌های مورد مقایسه استخراج شده از سایت NCBI با روش Maximum Parsimony محاسبه شد (جدول ۳).

در نهایت توالی‌های ژنی مورد آنالیز در پایگاه ژنتیکی NCBI با کد دسترسی اختصاصی ثبت گردیدند. استخراج دیان ای ژنومی توام با محدودیت‌هایی همراه بوده که با تغییر در محتویات بافر استخراج و pH می‌توان کیفیت و کمیت مواد ژنتیکی استخراج شده را بهبود بخشید [۱۶]. در این پروژه از روش شوک حرارتی برای شکستن دیواره سلولی جهت استخراج مواد ژنتیکی استفاده شد که دارای میانگین نسبت جذب نوری 1.4-1.7 در محدود طول موج ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر که معادل با ۳۲۰-۳۸۰ نانوگرم در هر میکرولیتر بود بدست آمد و نشان داد که روش شوک حرارتی از جمله مناسب‌ترین روش‌ها در استخراج دیان ای ژنومی در

مرجع استفاده شده (نشانگر ژنی CYAG1)، با توالی ناحیه ژنی به دست آمده ۱۶SrRNA با استفاده از نرم‌افزار MEGA6 هم‌ردیف شدند و نواحی نوکلئوتیدی محافظت شده و تغییر یافته نسبت به توالی پرایمری نشان داده شد. در توالی ژنی CYAG1 بیشترین میزان محافظت شدگی بین نوکلئوتیدهای ۵۶۴ تا ۶۳۱ (۴۲ نوکلئوتید)، ۸۹۸ تا ۹۳۶ (۳۸ نوکلئوتید) و ۴۸۲ تا ۵۱۷ (۳۵ نوکلئوتید) قرار داشت. در واقع این فواصل نوکلئوتیدی دوره تکاملی در این توالی ژنی تحت تأثیر عوامل جهش‌زایی ژنتیکی قرار نگرفتند. در این هم‌ردیف سازی بیشترین میزان تفاوت در نوکلئوتیدها در فواصل نوکلئوتیدی ۱۲۸ تا ۱۳۴ (۶ نوکلئوتید)، ۱۴۲ تا ۱۴۹ (۷ نوکلئوتید) و ۴ تا ۹ (۵ نوکلئوتید) مشاهده گردید که تغییر در این نوکلئوتیدها طی تکامل سبب ایجاد خصوصیات جدید و در نتیجه گونه‌های مختلف شد (شکل ۹).

در این تحقیق، از پرایمرهای طراحی شده جهت مکانهای ژنی 16 srRNA در ژنوم ریزجلیک استفاده شد، بر اساس نتایج تطبیقی حاصل از اندازه‌بندی در الگوی الکتروفورزی آغازگرهای تکثیر شده (جدول ۱) و هم چنین نتایج حاصل از هم‌ردیفی در سایت NCBI اثبات شده نواحی ژنومی تکثیر یافته دارای تشابه بالایی با توالی‌های ژنومی 16SrRNA در ژنوم *Spirulina laxissima* دارند (شکل ۷، نتایج دیگر پرایمرها در مقاله آورده نشده است) [۱۸، ۱۹]. همچنین ماتریس تشابه محاسبه شده با استفاده از نرم افزار MEGA6 با به کارگیری الگوریتم ژنتیکی Maximum Parsimony نتایج حاصل از بلاست و درخت فیلوژنی حاصله را تأیید نمود همچنین نتایج حاصل از آزمون بوت استرپ تأیید کننده جایگاه قرار گیری گونه مورد نظر با سویه *Spirulina laxissima* بود (جدول ۳). همچنین توالی



شکل ۹: بخشی از نقاط ژنی حفاظت شده در توالی تکثیر یافته با آغازگر CYAG1 در هم‌ردیفی با توالیهای ثبت شده در سایت NCBI.

Fig. 9: A section with least conserved area on multiple alignment between CYAG1 sequence and the sequences extracted from NCBI.



نیز اثبات کننده این مورد است. نتایج حاصل از درخت تکاملی ترسیم شده برای هر یک از توالی‌های ژنی تکثیر یافته نشان داد که فاصله تکاملی بسیار کمتری بین این توالی‌ها و توالی‌های مربوط به ریزجلبک *Spirulina laxissima* وجود داشته و در درخت فیلوژنتیکی حاصله این توالی‌ها در یک گروه نزدیک به هم دسته بندی شده‌اند، پس بنابراین داده‌های حاصله تأیید کننده این ادعا هستند که ریزجلبک ناشناخته جمع آوری شده در سواحل جنوبی دریای خزر همان سویه ریزجلبکی *Spirulina laxissima* بوده، هرچند که پیشنهاد می‌شود مطالعات ژنتیکی پیشرفته‌تری در این جهت صورت پذیرد تا اثبات کننده قوی جهت این شناسایی باشد [۲۰، ۲۱].

### مشارکت نویسندگان

تمامی بخش‌های مقاله بصورت مشترک توسط هر دو نویسنده انجام شده، مکاتبات و پاسخ به داوری و انجام اصلاحات نهایی توسط نویسنده اول مقاله انجام شده است.

### تعارض منافع

«هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.»

### References

- Rastogi RP, Sinha RP. Biotechnological and industrial significance of cyanobacterial secondary metabolites. *Biotechnol Adv.* 2009;**27**(4):521-539. doi: 10.1016/j.biotechadv.2009.04.009 pmid: 19393308
- Pfister P, Risch M, Brodersen DE, Bottger EC. Role of 16S rRNA Helix 44 in Ribosomal Resistance to Hygromycin B. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;**47**(5):1496-1502. doi: 10.1128/AAC.47.5.1496-1502.2003 pmid: 12709313
- Enamala MK, Enamala S, Chavali M, Donepudi J, Yadavalli R, Kolapalli B, et al. Production of biofuels from microalgae - A review on cultivation, harvesting, lipid extraction, and numerous applications of microalgae. *Renew Sustain Energy Rev.* 2018;**94**(10):49-68. doi: 10.1016/j.rser.2018.05.012
- Nakao M, Okamoto S, Kohara M, Fujishiro T, Fujisawa T, Sato S, et al. CyanoBase: the cyanobacteria genome database update 2010. *Nucleic Acids Res.* 2010;**38**(Database issue):D379-381. doi: 10.1093/nar/gkp915 pmid: 19880388
- Schirrmeister BE, Antonelli A, Bagheri HC. The origin of multicellularity in cyanobacteria. *BMC Evol Biol.* 2011;**11**:45. doi: 10.1186/1471-2148-11-45 pmid: 21320320
- Olusegun VO. Molecular Identification of Trametes Species Collected from Ondo and Oyo States, Nigeria. *Sci World J.* 2012;**5**. doi: 10.12816/0008234
- Chaidir Z, Fadjria N, Armaini A, Zainul R. Isolation and molecular identification of freshwater microalgae in maninjau lake west sumatera. *Der Pharmacia Lettr.* 2016;**8**(20):177-187.
- Khaw YS, Khong NMH, Shaharuddin NA, Yusoff FM. A simple 18S rDNA approach for the identification of cultured eukaryotic microalgae with an emphasis on primers. *J Microbiol Methods.* 2020;**172**:105890. doi: 10.1016/j.mimet.2020.105890 pmid: 32179080
- KADAR NA, SITTI R MS, EMMA SA. Molecular and phylogenetic identification of marine microalgae inferred by 18s rDNA gene. *Malay Appl Biol.* 2018;**47**(6):41-45.
- Tan HT, Khong NMH, Khaw YS, Ahmad SA, Yusoff FM. Optimization of the Freezing-Thawing Method for Extracting Phycobiliproteins from *Arthrospira* sp. *Molecules.* 2020;**25**(17). doi: 10.3390/molecules25173894 pmid: 32859046
- Eriksen NT. The technology of microalgal culturing. *Biotechnol Lett.* 2008;**30**(9):1525-1536. doi: 10.1007/s10529-008-9740-3 pmid: 18478186
- Gong N, Shao K, Feng W, Lin Z, Liang C, Sun Y. Biototoxicity of nickel oxide nanoparticles and bio-remediation by microalgae *Chlorella vulgaris*. *Chemosphere.* 2011;**83**(4):510-516. doi:

جهش در ژن ۱۶srRNA می‌تواند بر حساسیت ارگانسیم نسبت به عوامل محیطی گوناگون تأثیر بگذارد، همچنان که تفاوت در این توالی‌های ژنی ۱۶ srRNA می‌تواند منجر به شناسایی فنوتیپی سویه‌های مقاوم و حساس در برابر عوامل میکروبی را تشخیص دهد [16]. تعداد کل نوکلئوتیدهای تغییر یافته پس از هم‌ردیف سازی ژنی برای توالی‌های ژنی ۱ CYAG2, CYAG1, CYAG3, CYAG4, (27 F, 780 R), (27 F, 781 R) (27 F, 782 R) به ترتیب ۲۲۳، ۲۲۰، ۲۴۸، ۲۰۱، ۲۰۸ و ۲۱۱ نوکلئوتید بود.

### نتیجه‌گیری

با توجه به اینکه هر چه میزان نوکلئوتیدهای تغییر یافته بیشتر باشد نشان دهنده‌ی این بوده که توالی مورد نظر طی دوران تکامل بیشتر تحت تأثیر عوامل محیطی و جهش قرار گرفته و احتمالاً عملکرد ژن مذکور برای سلول و زنده‌مانی آن کاربردی نبوده است در نتیجه تغییر در این نوکلئوتیدها طی تکامل حفظ شده‌اند و می‌توان اظهار داشت با افزایش تعداد نوکلئوتیدهای تغییر یافته احتمالاً توالی‌های ژنی با میزان تشابه کمتری برای ژن مورد نظر به دست می‌آید که نتایج حاصل از درخت فیلوژنی

- 10.1016/j.chemosphere.2010.12.059 **pmid:** 21216429
13. Havlik I, Lindner P, Scheper T, Reardon KF. On-line monitoring of large cultivations of microalgae and cyanobacteria. *Trends Biotechnol.* 2013;**31**(7):406-414. **doi:** 10.1016/j.tibtech.2013.04.005 **pmid:** 23707058
14. Wan M, Rosenberg JN, Faruq J, Betenbaugh MJ, Xia J. An improved colony PCR procedure for genetic screening of *Chlorella* and related microalgae. *Biotechnol Lett.* 2011;**33**(8):1615-1619. **doi:** 10.1007/s10529-011-0596-6 **pmid:** 21431847
15. Li X, Jin H, Wu Z, Rayner S, Yin J, Yu Y, et al. An automated process to extract plasmid DNA by alkaline lysis. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007;**75**(5):1217-1223. **doi:** 10.1007/s00253-007-0925-9 **pmid:** 17387470
16. He X, Dai J, Wu Q. Identification of Sporopollenin as the Outer Layer of Cell Wall in Microalga *Chlorella protothecoides*. *Front Microbiol.* 2016;**7**:1047. **doi:** 10.3389/fmicb.2016.01047
17. Stark JR, Cardon ZG, Peredo EL. Extraction of high-quality, high-molecular-weight DNA depends heavily on cell homogenization methods in green microalgae. *Appl Plant Sci.* 2020;**8**(3):e11333. **doi:** 10.1002/aps3.11333 **pmid:** 32185123
18. Lee HW, Roh SW, Cho K, Kim KN, Cha IT, Yim KJ, et al. Phylogenetic analysis of microalgae based on highly abundant proteins using mass spectrometry. *Talanta.* 2015;**132**:630-634. **doi:** 10.1016/j.talanta.2014.08.078 **pmid:** 25476355
19. Manoylov KM. Taxonomic identification of algae (morphological and molecular): species concepts, methodologies, and their implications for ecological bioassessment. *J Phycol.* 2014;**50**(3):409-424. **doi:** 10.1111/jpy.12183 **pmid:** 26988316
20. Pachiappan P, Balaji P, Perumal S, Dinesh K. Isolation and Culture of Microalgae. In book: Manual on Advances in Aquaculture Technology. 2012.
21. Haoujar I, Cacciola F, Manchado M, Abrini J, Haoujar M, Chebbaki K, et al. Isolation of Microalgae from Mediterranean Seawater and Production of Lipids in the Cultivated Species. *Foods.* 2020;**9**(11). **doi:** 10.3390/foods9111601 **pmid:** 33158015

## AUTHOR(S) BIOSKETCHES

**Hosseinpourazad N**, Department of Plant Science and Medicinal Plant, Meshginshahr Faculty of Agriculture, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabl, Iran.

n.hosseinpour@uma.ac.ir

 0000-0002-6459-1490

**Fatalipour Kh.** M.Sc of Plant Biotechnology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

khadijeh\_f@uma.ac.ir

 0000-0002-8763-4983



## HOW TO CITE THIS ARTICLE

**Citation (Vancouver)** Ajdari A, Nahavandian S, Jackson J. Monthly Variations of the Mixed Layer Properties in the Franklin Bay in the Arctic Ocean, between Fall 2003 and Spring 2004. *J Oceanography*. 2021; 12(47): 26-40.

 <http://doi.org/10.52547/joc.12.47.41>

 <http://joc.inio.ac.ir/article-1-1591-fa.html>

 <https://orcid.org/0000-0002-6459-1490>



## COPYRIGHTS

©2021 The author(s). This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY 4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, as long as the original authors and source are cited. No permission is required from the authors or the publishers.