اقیانوس‌شناسی/ سال دهم/ شماره ۳۷/ بهار ۱۳۹۸/۹/۹-۱
DOI: 10.29252/JOC.2019.10.2073

بررسی سیست و سلول‌های شکوفا شده گونه *Chattonella subsalsa* در منطقه لیپار (دریای مکران) بر اساس ریخت‌شناسی و توالی ژنی ناحیه LSU-rDNA

گیلان عطاران فریمان[۱*]، پروین صادقی[۲]، رقیه شیرزایی[۳]

۱- دانشیار، گروه زیست دریا، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، پست الکترونیکی: g.attaran@cmu.ac.ir
۲- استادیار، گروه زیست دریا، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، پست الکترونیکی: p.sadeghi@cmu.ac.ir
۳- دانشجوی کارشناسی ارشد زیست دریا، گروه زیست دریا، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، پست الکترونیکی: roghayeshirzaii@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۱/۱۰ ** نویسنده مسوول* *تاریخ پذیرش: ۹۷/۸/۱۹*

چکیده

این تحقیق به‌منظور شناسایی سیست‌های فیتوپلانکتون موجود در منطقه لیپار (سواحل جنوب شرق ایران) براساس ریخت‌شناسی و فیلوژنی سلول‌های شکوفا شده از سیست انجام گردید. بدین منظور، در این منطقه نمونه رسوب از سه ایستگاه در سال ۱۳۹۵ به‌وسیله نمونه بردار گرب اکمن با سطح جمع کنندگی ۲۲۵ سانتی‌متر مربع جمع‌آوری گردید. سیست‌های ناشناخته با ریخت‌شناسی متفاوت، در پتری‌دیش حاوی محیط کشت F2 کشت داده شدند و در آزمایشگاه تحت شرایط ۱۲:۱۲ ساعت روشنایی: تاریکی در درجه حرارت ۱ ±۲۵ °C نگهداری شدند. با بررسی اولیه ریخت‌شناسی گونه شکوفاشده، مشخص گردید که بیشترین شباهت را به گونه *Chattonella subsalsa* دارد. جهت تایید شناسایی DNA از ایزوله خالص حاصل از کشت سیست استخراج شد و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) جهت تعیین توالی ناحیه LSU-rDNA انجام گردید. آنالیزهای فیلوژنی نشان داد که سلول شکوفاشده با ۹۸٪ حمایت بوت‌استرپ شبیه به گونه *C. subsalsa* است. بررسی رابطه سیست و فیتوپلانکتون و چرخه زندگی سلول می‌تواند به عنوان ابزاری مهم در شناسایی گونه‌های فیتوپلانکتون در نظر گرفته شود.

کلمات کلیدی: *Raphidophytes، شکوفایی، فیلوژنی، سیست، فیتوپلانکتون، دریای مکران.*

۱. مقدمه

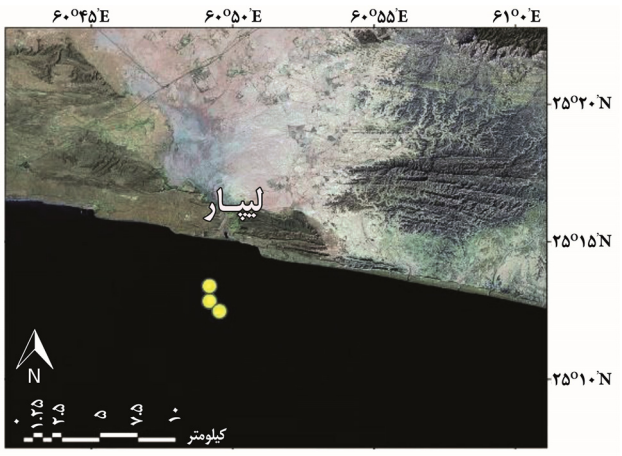
بسیاری از جلبک‌های میکروسکوپی مانند شاخه Raphidophytes در طول چرخه زندگی خود مرحله طولانی، ساکن و مقاومی دارند که به آن مرحله سیست گفته می‌شود. بررسی سیست به عنوان بذر در رسوبات ساحلی به همراه نمونه‌های شکوفاشده می‌تواند اطلاعات مفیدی درباره پتانسیل گونه‌های سمی بدهد (Attaran Fariman, 2007). گونه *Chattonella subsalsa* متعلق به رده Raphidophyceae، خانواده Chattonellaceae، شاخه Ocrophyta و راسته Chattonellales است (Smith, 1950; Klein and Cronquist, 1967; Kim et al., 2007). جنس *Chattonella* شامل پنج گونه *C. minima*، *C. antigua*، *C. marina*، *C. ovata*، *C. subsalsa* می‌باشد. گونه *C. subsalsa* بیشتر در آب‌های مناطق گرمسیری جهان پراکنده

است. این‌گونه در چرخه زندگی خود قادر به تولید سیست هاپلوئید می‌باشد و سیست آن توانایی شکوفاشدن در تاریکی را دارد. بنابراین در رسوبات بستر، شکوفاشده و به ستون آب وارد می‌شود و همواره با ایجاد کشند سرخ باعث مرگ و میر تعداد زیادی از آبزیان می‌گردد (Smayda et al., 1999; Imai and Yamaghchi, 2012). سیست این‌گونه دارای رنگی قهوه‌ای، کروی شکل، با قطر دایره ۲۱–۱۸ میکرومتر است. همچنین درون سیست آن جسم توده‌ای قهوه‌ای رنگ مشاهده می‌شود (Attaran Fariman and Bolch, 2014). سیست آن معمولاً در تابستان شکوفا می‌شود که حاصل آن یک سلول رویشی است. این سلول شکوفا شده نقش مهمی را در ایجاد شکوفایی در تابستان‌های مناطق معتدل ایفا می‌کند. گرچه بخش کوچکی از سیست‌های شکوفاشده این گونه از رسوبات بستر قابلیت ایجاد شکوفایی پلانکتونی را دارند، اما این امر به ستون آب و دیاتومه‌های موجود در آن نیز بستگی دارد؛ زیرا پدیدار شدن دیاتومه نسبت به *C. subsalsa* غالب است (Kim et al., 2007; Bowers et al., 2006). سلول *C. subsalsa* ۴۳–۲۴ میکرومتر طول و ۲۳–۱۷ میکرومتر عرض دارد و تعدادی موکوسیست در سطح سلول مشاهده می‌شود (Attaran Fariman and Bolch, 2014). شرایط مطلوب برای رشد *C. subsalsa*، دمای ۳۰–۲۰ درجه سانتی‌گراد و شوری psu ۳۵ است. در دما ۱۶°C–۱۰ نرخ رشد کم می‌شود، اما در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد هیچ رشدی مشاهده نمی‌شود. البته این گونه‌های مضر در دمای ۳۱–۲۴ درجه و شوری psu ۲۸–۱۸ توانایی ایجاد شکوفایی پلانکتونی را دارند (Zhang et al., 2006). نخستین کشند سرخ وسیع جنس *Chattonella* که باعث مرگ و میر بسیاری از ماهیان گردید از سواحل Malabar در هندوستان گزارش شده است (Subrah, 1954). بررسی‌های اخیر نشان می‌دهند، گونه‌های رده Raphidophyceae از یک گروه تک نیایی تشکیل‌شده است که گونه‌ها و جنس‌های آن در آب‌های آزاد و دریاها پراکنده هستند (Attaran Fariman and Bolch, 2014; Potter et al., 1997; Ben Ali et al., 2001, 2002). در منطقه لیپار و رمین واقع در سواحل جنوب شرقی ایران سیست بسیاری از گونه‌های فیتوپلانکتون با پتانسیل تشکیل شکوفایی توسط Attaran Fariman (2016) گزارش شده است. آنالیزهای قسمتی از ناحیه LSU-rDNA گونه ایرانی و رسم درخت فیلوژنی، این‌گونه را در گروه *C. subsalsa* قرار داده است (Attaran Fariman and Bolch, 2014). همچنین بررسی‌های فیلوژنی انجام گرفته روی مناطق ژنی ITS, LSU, SSU در نمونه‌های جداشده از سواحل دریای مدیترانه مشخص گردید که توالی ژنی در این نواحی تفاوت بسیار کمی دارند، بنابراین گونه‌های جداشده به‌عنوان گونه‌های خواهری یکدیگر معرفی شدند. رسم درخت‌فیلوژنی، این گونه‌ها را در کلاد گونه *C. subsalsa* قرار داد (Wegener, 2013).

در مطالعه حاضر ریخت‌شناسی سیست جدا شده از رسوبات لیپار (سواحل جنوب شرق ایران) و فیلوژنی پلانکتون شکوفاشده حاصل بر اساس توالی قسمتی از ناحیه LSU-rDNA مورد بررسی قرار گرفته است.

۲. مواد و روش‌ها

پس از تعیین منطقه لیپار به‌عنوان ایستگاه نمونه‌برداری (شکل ۱)، نمونه رسوب از این منطقه به‌وسیله گرب‌اکمن با سطح جمع کنندگی ۲۲۵ سانتی‌متر مربع جمع‌آوری گردید. منطقه لیپار در مسیر جاده ساحلی چابهار به گواتر در ساحل دریای عمان با موقعیت جغرافیایی طول (N "۱۵ ′۱۳ °۲۵) و عرض جغرافیایی (E "۴۷ ′۴۹ °۶۰) قرار دارد و منطقه‌ای است که معمولا شکوفایی پلانکتونی اتفاق می‌افتد (Attaran Fariman, 2016)



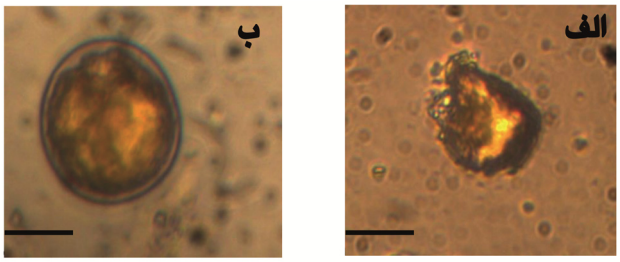
شکل ۱: موقعیت جغرافیایی ایستگاه نمونه‌برداری

نمونه‌های رسوب جمع‌آوری شده به آزمایشگاه انتقال داده شدند. به منظور کشت میکروسکوپی سیست‌های موجود در رسوب، ابتدا حدود ۳–۲ گرم از رسوب با آب فیلترشده دریا مخلوط گردید، سپس دو دقیقه در دستگاه سونیکاتور مدل d Sc۱۹۰۰ هم زده شد و محلول حاصل از الک‌های ۲۰–۱۲۵

میکرومتر عبور داده شد. سپس سیست‌های انفرادی از رسوبات با استفاده از میکروسکوپ اینورت مدل Nikon-TF100 به وسیله میکرو پیپت جدا گردید. سپس در شرایط استریل هر سیست زنده به درون یک پتری‌دیش ۵۰ سی‌سی حاوی محیط کشت F2 کشت داده شدند و در اتاق فایکولب و ژرمیناتور قرار داده شدند. برنامه ژرمیناتور و اتاق فایکولب بر اساس ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، نور ۲۰۰۰ لوکس، درجه حرارت ۲۵±۱°C و رطوبت ۲۵٪ تنظیم گـردید (Attaran Fariman, 2007). بـررسی ریخت‌شنـاسی نمونه‌های سیست شکوفاشده به‌وسیله میکروسکوپ اینورت مجهز به دوربین انجام پذیرفت. DNA ژنومی سلول‌های شکوفا شده با روش CTAB (Attarran Fariman and Bolch, 2014) استخراج گردید. سپس نمونه‌ها الکتروفورز شدند تا کمیت و کیفیت آن‌ها سنجیده شود. از بافر TBE و ژل آگارز ۱/۵ درصد در الکتروفورز نمونه استفاده گردید و از اتیدیوم بروماید برای رنگ‌آمیزی ژل استفاده شد. از آغازگرهای D2C-R و D1R-F برای بسط و توسعه قسمتی از منطقه LSU rDNA ژنوم استفاده گردید. این قسمت در ریبوزوم تمام یوکاریوت‌ها قرار داشته و به‌عنوان یک ترکیب پایه‌ای در سلول‌های یوکاریوتی شناخته شده است (Lodish and Darnell, 1995). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از ۱۵ نانوگرم از DNA استخراجی 10X PCR Buffer, dNTP, Mgcl2 هریک از پرایمرهای رفت و برگشت، Taq DNA Polymeras و آب دیونیزه تا رسیدن به حجم ۵۰µl انجام گردید. محصول DNA به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه قرار داده شد؛ زیرا در این دما مولکول DNA دو رشته‌ای به مولکول تک‌رشته‌ای تبدیل می‌گردد. سپس چرخه ۳۵ دوره‌ای که شامل: یک دقیقه در ۹۴ درجه جهت دناتوره شدن، یک دقیقه در ۴۵ درجه به‌منظور اتصال پرایمر، یک دقیقه در ۷۲ درجه جهت بسط نهایی بود و مرحله آخر توسعه ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه تنظیم گردید (Attaran Fariman, 2007) و چرخه دمایی پایان یافت. محصول PCR به‌وسیله ژل آگار ۱/۵٪ به مدت ۴۵-۳۵ دقیقه الکتروفورز و تعیین کیفیت گردید. در نهایت ژل به دستگاه ژل داک (مدل E-BOX-VX2/20M) منتقل شد. با پراش پرتو UV به ژل توسط دستگاه، باندهای مربوط به PCR مشاهده گردید و بعد از تصفیه[1]، محصول جهت تعیین توالی به کشور کره جنوبی، شرکت Bioneer ارسال گردید. ویرایش توالی‌هـا بـا استفاده از برنامه BioEdit (Hall, 1999) و ClustalX (Jeanmougin et al., 1998) صورت گرفت. توالی نوکلئوتیدی به‌دست‌آمده از گونه مورد نظر در GenBank ثبت شد و با گونه های موجود در بانک جهانی ژن مقایسه گردید. جهت ترسیم درخت فیلوژنی از نرم‌افزار MEGA 5 (Tamura et al., 2011) استفاده شد. رسم درخت فیلوژنی به روش حداکثر احتمال[2] انجام شد و گونه *Olisthodiscus luteus* به‌عنوان برون گروه در نظر گرفته شد.

۳. نتایج و بحث

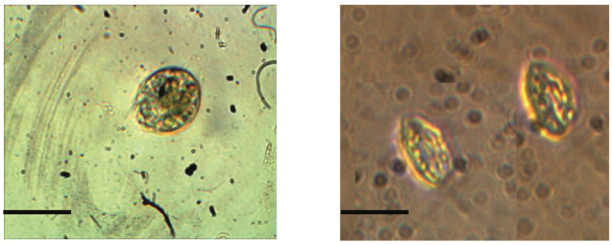
بررسی سلول شکوفاشده نشان داد، گونه جدا شده از سواحل لیپار بیشترین شباهت را با گونه *Chattonella subsalsa* دارد. ایزوله گونه خالص‌شده با نام CHCCs3 نام‌گذاری گردید. سیست این گونه کروی شکل، دارای پوشش بی‌رنگ و شفاف است که محتویات و جسم توده‌ای آن به رنگ قهوه‌ای است (شکل ۲). ویژگی‌های ریخت‌شناسی سلول شکوفاشده شامل موارد زیر است. رنگ قهوه‌ای طلایی، طول آن ۳۴-۱۸ میکرومتر و عرض آن ۲۰ -۱۵ میکرومتر است. قسمت شکمی صاف ولی سطح پشتی برآمده است و دو تاژک بلند در انتهای بدن از شیار تاژکی به سمت بیرون کشیده شده است. تاژک‌ها به‌وضوح دیده می‌شوند. انتهای سلول پهن‌تر می‌باشد و حالتی گرد دارد و جلوی سر باریک شده و دو شیار جانبی در طول سلول کشیده شده است. کلروپلاست‌ها در این‌گونه به وضوح دیده می‌شوند. این‌گونه از لحاظ ریخت‌شناسی بیشترین شباهت را به گونه *Chattonella subsalsa* دارد (شکل ۳).



شکل ۲: الف) نمونه سیست جداشده از رسوبات لیپار (سال ۱۳۹۴)، ب) سیست کشت داده شده پس از شکوفا شدن در محیط کشت (مقیاس ۱۰ میکرومتر)

[1] Clean up

[2] Maximum likelihood



شکل ۳: سلول شکوفاشده گونه *Chattonella subsalsa* در محیط کشت (سال ۱۳۹۴) (مقیاس ۱۰ میکرومتر)

DNA استخراج شده از ایزوله خالص گونه *Chattonella subsalsa* نشان داد که DNA این گونه دارای کیفیت خوب می‌باشد. توالی نوکلئوتیدی به‌دست‌آمده از گونه موردنظر با نام ایزوله CHCCs3 در بانک ژن[1] با شماره MH248132 ثبت گردید. جهت تایید شناسایی و بررسی مولکولی گونه ایرانی به طول ۷۰۰bp با گونه‌های مشابه از بانک ژن در قسمتی از منطقه ژنی LSU-rDNA مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱).

جدول ۱: اسامی گونه‌ها و شماره ثبت آن‌ها در بانک جهانی ژن که در آنالیز مولکولی گونه‌ی *Chattonella subsalsa* استفاده شده‌اند. در مطالعه حاضر شماره بانک ژن گونه ایرانی به صورت پررنگ نشان داده شده است.

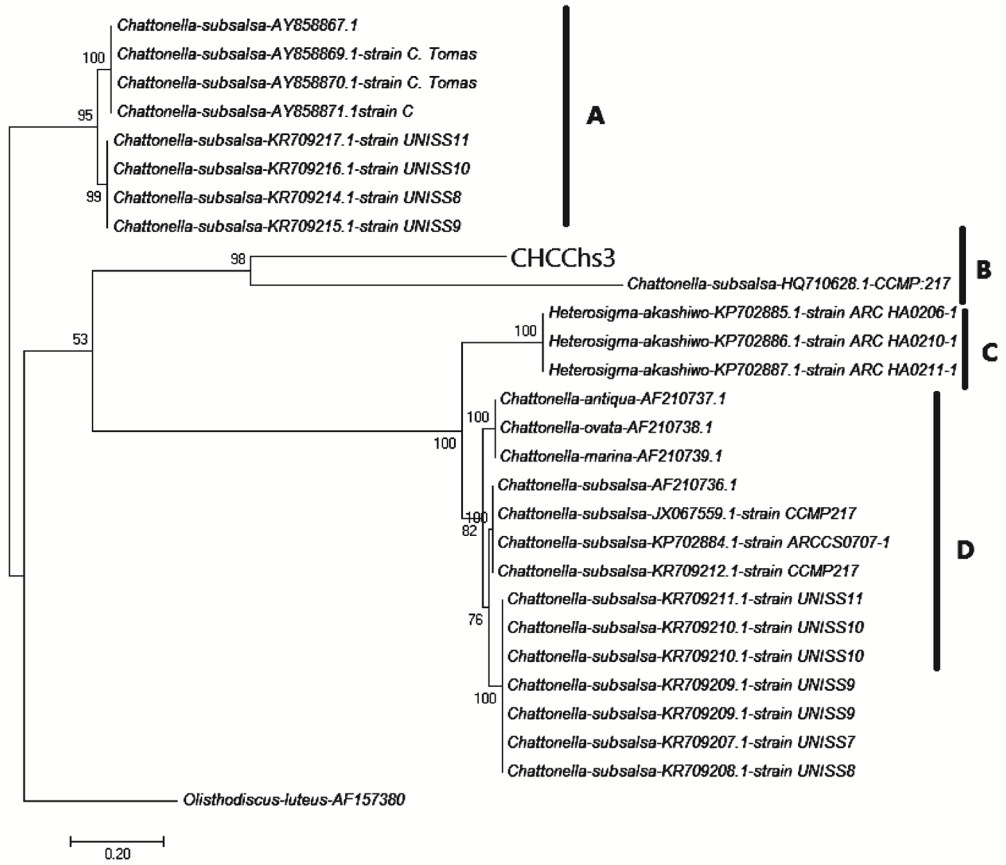
نام گونه	شماره بانک ژن
Chattonella subsalsa	**MH248132**
Chattonella subsalsa	KR70921
Chattonella subsalsa	HQ710628
Chattonella subsalsa	KR709217
Chattonella subsalsa	KR709214
Chattonella subsalsa	KR709212
Chattonella subsalsa	KR709211
Chattonella subsalsa	KR709210
Chattonella subsalsa	KR709209
Chattonella subsalsa	KR709208
Chattonella subsalsa	KP702884
Chattonella subsalsa	JX067559
Chattonella subsalsa	AY858871
Chattonella subsalsa	AY858870
Chattonella marina	AF210739
Chattonella ovata	AF210738
Chattonella antiqua	AF210737.1
Heterosigma akashiwo	KP702887.1
Heterosigma akashiwo	KP702886.1
Heterosigma akashiwo	KP702885.1
Olisthodiscus luteus	AF157380

توالی ژنی گونه مورد بررسی با استفاده از برنامه BioEdit ویرایش گردید. سپس با قرارگیری در برنامه Blast توالی‌های ژنی نزدیک به آن شناسایی شدند. درخت فیلوژنی با روش ML رسم گردید (شکل ۴) و گونه‌ها در ۴ کلاد (A, B, C, D) قرار داده شدند. بررسی مولکولی حاضر نشان داد، گونه ایرانی شباهت زیادی به گونه *Chattonella subsalsa* دارد و در رده Raphidophceae قرار می‌گیرد. کلادها با ۱۰۰٪ بوت‌استرپ حمایت می‌شوند. سلول شکوفاشده با ۹۸٪ حمایت بوت‌استرپ به‌عنوان گونه خواهری *C. subsalsa* گزارش می‌شود و با آن تک‌نیایی می‌باشد. گونه *Heterosigma akashiwo* در کلاد B با ۸۸ درصد و گونه‌های *C. marina*، *C. subsalsa*، *C. ovata*، *C. antigua* موجود در کلاد C با ۱۰۰٪ حمایت بوت‌استرپ حمایت می‌شوند. همچنین تمام *C. subsalsa* موجود در کلاد D با ۱۰۰٪ حمایت بوت‌استرپ به‌صورت گونه‌های خواهری گونه ایرانی هستند.

در مطالعه‌ی حاضر ریخت‌شناسی و فیلوژنی سیست گونه *C. subsalsa* جداشده از رسوبات منطقه لیپار و پلانکتون شکوفاشده حاصل از آن مورد بررسی قرار گرفت. اطلاعات کمی در مورد سیست *C. subsalsa* به ثبت رسیده است. به همین دلیل ریخت‌شناسی آن به‌خوبی توصیف نشده است (Attaran Fariman and Bolch, 2014; Steidinger and Penta, 1999). اگرچه ریخت‌شناسی سیست گونه *C. subsalsa* به‌خوبی شناخته شده نیست، اما با انجام آنالیزهای فیلوژنی روی سیست‌های موجود در رسوبات، وجود سیست برای این‌گونه به اثبات رسیده است (Portune et al., 2009). در مطالعه انجام‌گرفته، سیست کشت داده‌شده دارای شکلی کروی، پوشش بی‌رنگ و شفاف، جسم توده‌ای قهوه‌ای رنگ و قطر دایره ۲۱–۱۸ میکرومتر است. نتایج این مطالعه با سایر پژوهش‌های انجام‌شده توسط Attaran Fariman و Bolch (۲۰۱۴) مطابقت دارد. این محققین در خصوصیات ریخت‌شناسی سیست این گونه به رنگ قهوه‌ای کم‌رنگ، شکل کروی با قطر ۲۱–۱۷ میکرومتر و محتوی جسم توده‌ای قهوه‌ای رنگ اشاره کرده‌اند (Attaran Fariman and Bolch, 2014). سیست تا پایان زمستان در رسوبات بستر ته‌نشین می‌گردد و از این طریق موجب حفظ بقای خود می‌شود. معمولاً دمایی که در زمستان موجب تشکیل سیست می‌شود ۱۰ درجه سانتی‌گراد یا کمتر است. بر اساس مشاهدات و آزمایش‌های انجام‌شده بر سیست‌های موجود در رسوبات، دما به‌عنوان عامل مهم برای نهفتگی، بلوغ و شکوفا شدن گزارش‌شده است (Kim et al., 2007). در حال حاضر جمعیت زیادی از سیست‌های مختلف در رسوبات بستر دریاهای مختلف قرار دارد که ممکن است تا سال بعد یا سال‌های زیادی در رسوبات باقی بمانند، زیرا

[1] GenBank

تنها دما یکی از فاکتورهای مهم است و سیست‌ها برای شکوفاشدن به فاکتورهای دیگری مانند نیترات، فسفات، نور و شوری مناسب نیاز دارند (Vonstosch and Fecher, 1979). در تحقیق حاضر وجود سیست *Chattonella subsalsa* در رسوبات منطقه لیپار به اثبات رسیده است. سیست *Chattonella* برای شکوفا شدن وابستگی کمی به نور نشان می‌دهد، زیرا توانایی شکوفا شدن در تاریکی را دارا است (Kim et al., 2007). Coyne و همکاران (۲۰۰۵) دمای مناسب ۳۲/۷-۱۵/۴ درجه سانتی‌گراد و شوری psu ۴۰-۳۰ را در شرایط مناسب برای شکوفا شدن سیست *Chattonella* بیان کردند. این محققین همچنین اضافه شدن مواد مغذی به محیط را یکی از عوامل مهم در نظر گرفتند. در این تحقیق سیست‌های کشت داده شده در اتاق فایکولب و ژرمیناتور تحت شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، نور ۲۰۰۰ لوکس، درجه حرارت ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد، شوری psu ۳۵ و رطوبت ۲۵ ٪ نگهداری شدند. سلول شکوفا شده *Chattonella subsalsa* توسط Biecheler (1936) گزارش شد و به ثبت رسید (Kim et al., 2007). Coyne و همکاران (۲۰۰۵) شناسایی *C. subsalsa* را با آنالیزهای مولکولی 18S rRNA به انجام رساندند. سلول شکوفاشده در شرایط آزمایشگاهی به رنگ طلایی قهوه‌ای بوده و این سلول ۳۴-۱۸ میکرومتر طول و ۲۰-۱۵ میکرومتر عرض دارد. قسمت شکمی صاف ولی سطح پشتی آن دارای برآمدگی می‌باشد و دو تاژک بلند در انتهای بدن از شیار تاژکی به سمت بیرون کشیده شده است. انتهای سلول پهن‌تر بوده و حالتی گرد دارد، درحالی‌که قسمت جلوی سلول باریک می‌باشد و دو شیار جانبی در طول سلول کشیده شده است. این‌گونه دارای کلروپلاست بوده که از مشخصه‌های اصلی آن است و در زیر میکروسکوپ اینورت و میکروسکوپ الکترونی به‌وضوح قابل مشاهده است.



شکل ۴: درخت فیلوژنی رسم شده بر اساس توالی ژنی قسمتی از ناحیه LSU-rDNA با استفاده از آنالیز ML. اعداد بوت‌استرپ با ۱۰۰ [1] تکرار را نشان می‌دهند. گونه ایرانی با نام ایزوله CHCCs3 مشخص شده است و گونه *Olisthodiscus luteus* به عنوان گروه خارجی انتخاب شده است.

[1] Replication

Attaran Fariman و Bolch (۲۰۱۴) طی تحقیقاتی مشابه ویژگی‌های ریخت‌شناسی سلول *Chattonella subsalsa* را توصیف نمودند. سلول موردنظر ۴۳–۲۴ میکرومتر طول و ۲۳–۱۷ میکرومتر عرض دارد. این‌گونه دارای کلروپلاست‌های سبزرنگ زیادی است که در یک طرف آن قرار دارند که به شکل نوارهای بیضی درآمده‌اند و تعدادی موکوسیست در سطح سلول آن مشاهده می‌شود. در بسیاری از سلول‌ها قسمت خلفی حالت برآمدگی دارد. دو تاژک مساوی از شیار تاژک بیرون آمده و در ناحیه قدامی به‌وضوح دیده می‌شوند. این سلول‌ها در زیر نور زرد طلایی بوده و مشاهده آن‌ها در زیر میکروسکوپ نوری موجب می‌شود تحرک خود را از دست بدهند. این‌گونه فاقد لکه چشمی است. ریخت‌شناسی گونه‌های *C. subsalsa* و *C. marina* بسیار مشابه می‌باشد. Attaran Fariman و Bolch (۲۰۱۴) تفکیک این دو گونه را بر پایه دو فراساختار مورد بررسی قرار دادند که شامل این موارد است. ۱– موکوسیست گونه *C. subsalsa* به شکل مو درآمده و وضوح چندانی ندارد، در حالی‌که موکوسیست گونه *C. marina* به‌وضوح دیده می‌شود. ۲– روابط بین اعضای تیلاکوئید و کلروپلاست پیرونوئید ماتریکس می‌باشد. در گونه *Chattonella subsalsa* تیلاکوئید نمی‌تواند به درون پیرونوئید نفوذ کند در حالی‌که در گونه *Chattonella marina* تیلاکوئید در داخل پیرونوئید قرار دارد. همچنین این محققین در آزمایش‌های خود بیان نمودند از جمله خصوصیات دیگری که موجب تمایز این دو گونه می‌شود می‌توان وجود رنگ سبز قهوه‌ای در گونه *C. subsalsa* و رنگ زرد قهوه‌ای در گونه *C. marina* را نام برد. البته این موضوع را می‌بایست در نظر داشت که رنگ سلول ممکن است تحت شرایط محیط کشت تغییر نماید (Attaran Fariman and Bolch, 2014). Imai و همکاران (۲۰۱۲) مقیاس این‌گونه را ۴۰ میکرومتر طول و ۳۰ میکرومتر عرض اندازه‌گیری نمودند (Imai et al., 2012). گونه کشت داده‌شده در شرایط آزمایشگاهی دارای ۳۴–۱۸ میکرومتر طول و ۲۰–۱۵ میکرومتر عرض می‌باشد. Zhang و همکاران (۲۰۰۶) شرایط مطلوب برای رشد *C. antigua*، *C. marina* و *C. subsalsa* را که روابط خویشاوندی نزدیکی با یکدیگر دارند، دمای ۳۰–۲۰ درجه سانتی‌گراد و شوری ۳۵ psu بیان نمودند (Zhang et al., 2006). Portune و همکاران (۲۰۰۹) در آزمایشی متفاوت ۳۵ سیست را در شرایط آزمایشگاهی کشت دادند. سلول‌های رویشی *C. subsalsa* ابتدا با فراوانی کمی ظاهر شدند. بیشترین فراوانی بعد از ۲۸ روز تحت شرایط دمای آب ۲۰ درجه سانتی‌گراد و شوری ۲۵ psu حاصل شد (Portune et al., 2009).

گونه ایرانی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شوری ۳۵ psu شکوفا گردید. کشند سرخ ایجاد شده توسط *C. subsalsa* به‌وسیله پلانکتون‌های متحرک آن به وجود می‌آید که این پلانکتون‌ها در چرخه زندگی خود در طی تابستان شکوفا می‌شوند. سیست‌ها نقش بزرگی را در ایجاد این کشندها بازی می‌کنند و عوامل زیادی در شکوفا شدن آن‌ها تأثیر دارد که این وضعیت در بیشتر گونه‌های سمی دینوفلاژله‌ها دیده می‌شود (Wall, 1971; Anderson et al., 1983; Dale, 1983). گونه‌های سمی در دمای ۳۱–۲۴ درجه سانتی‌گراد و شوری ۳۸–۱۸ psu توانایی شکوفایی را دارند (Zhang et al., 2006). نخستین شکوفایی عظیم *Chattonella* که باعث مرگ و میر بسیاری از ماهیان گردید از سواحل Malabar در هندوستان گزارش شد (Subrah, 1954). همچنین شکوفایی سم *Chattonella* گونه‌های *C. subsalsa* و *C. marina* توسط Kim و همکاران (۲۰۰۷) از سواحل ژاپن و کره، Tseng و همکاران (۱۹۹۳) از چین، Lewitus و همکاران (۲۰۰۸) از سواحل جنوبی کالیفرنیا، Hallegraeff و همکاران (۱۹۹۸) از جنوب استرالیا گزارش شده است. با توجه به پراکنش جهانی سیست گونه *C. subsalsa*، حضور این گونه در دریای عمان دور از انتظار نیست. آنالیزهای مولکولی از LSU-rDNA که توسط Takano و همکاران (۲۰۰۹) انجام گردید، نشان داد گونه *C. subsalsa* شاخه کوچکی از رده Raphidophyceae و خانواده Chattonellaceae است. در مطالعه حاضر بخشی از ناحیه LSU-rDNA مورد بررسی قرار گرفت. آنالیزهای انجام گرفته و رسم درخت‌فیلوژنی با روش (ML) نشان داد که سلول شکوفاشده با ۹۸٪ حمایت بوت‌استرپ گونه خواهری *C. subsalsa*، متعلق به رده Raphidophyceae، خانواده Chattonellaceae، شاخه Ocrophyta و راسته Chattonellalesاست. نتایج این مطالعه با سایر پژوهش‌های مشابه مورد مقایسه قرار گرفت. Attaran Fariman و Bolch (۲۰۱۴) ناحیه LSU-rDNA گونه ایرانی *Chattonella* sp. را مورد بررسی قرار دادند. درخت‌فیلوژنی رسم شده به دو روش MP و NJ گونه ایرانی را در ۲ گروه تک‌نیایی قرار داد. در این راستا گروه اول شامل *C. antigua*، *C. ovate* و *C. marina* با ۱۰۰٪ حمایت بوت‌استرپ و گروه دوم شامل فقط گونه *C. subsalsa* است. Wegener (2013) به بررسی ریخت‌شناسی و آنالیزهای ژنتیکی

گونه *C. subsalsa* پرداخت. هـدف این محقق از این تحقیق طبقه‌بندی گونه جداشده از سواحل غربی دریای مدیترانه بود که بخش‌هایی از اپرون ریبوزومی شامل زیر واحد کوچک SSU، زیر واحد بزرگ LSU و بخشی از ژن کلروپلاست psaA از سیستم نوری I (psI) و rbcL شامل بخش بزرگ ژن روبیسکو را مورد بررسی قرار داد. گونه‌های جداشده از سواحل غربی دریای مدیترانه ۳ مارکر فیلوژنی (SSU, ITS, rbcL) یکسان بودند و تفاوت کمی را در ۲ مارکر (LSU, psaA) نشان دادند؛ بنابراین گـونه خواهری یکـدیگر معرفی شدند و بـا بررسی توالی‌های ژنی ثبت‌شده در بانک ژن مشخص گردید این گونه‌ها از رده Raphidophyceae و گونه *C. subsalsa* هستند؛ اما مشاهده ریخت‌شناسی گونه‌های جداشده از سواحل غربی مدیترانه به‌وسیله میکروسکوپ الکترونی و نوری با گونه جداشده از دریای مکزیک تفاوت زیادی را در شکل و ترتیب کلروپلاست و دیگر ریز ساخت‌ها از جمله موکوسیست نشان دادند. بنابراین این گونه‌ها به‌صورت گونه جدید به ثبت رسیدند (Wegener, 2013). مقایسه مطالعات گذشته روی رده Raphidophyceae نشان داد گـونه‌های دارای توالـی‌هـای نـوکلئـوتیـدی LSU-rDNA و ITS-rDNA تفاوت کمی دارند و یا اصلا تفاوتی ندارند (Connell, 2000, 2002; Hirashita et al., 2000). گونه ایرانی CHCCs3 در راسته Chattonellales قرار می‌گیرد که از رده Raphidophyceae است. بیشتر بررسی‌های فیلوژنتیک توالی LSU-rDNA نشان می‌دهند گونه ایرانی با گونه *C. subsalsa* که در بانک ژن به ثبت رسیده است، رابطه خواهری دارد که در این تحقیق با ۹۸٪ بوت‌استرپ حمایت می‌شود و به‌عنوان گروه تک-نیایی آن معرفی می‌شود. این‌گونه با گونه‌های موجود در کلاد C و D با ۱۰۰٪ حمایت بوت‌استرپ و با گونه‌های موجود در کلاد B با ۸۸٪ حمایت بوت‌استرپ رابطه خواهری دارد. همچنین می-توان از آنالیزهای مولکولی جهت تاکسونومی گونه‌ها بهره برد و موقعیت فیلوژنتیک آن‌ها را مشخص نمود.

۴. نتیجه‌گیری

به طور کلی نتایج این مطالعه نشان داد که سلول‌های شکوفاشده متعلق به خانواده Chattonellaceae است و از نظر فیلوژنی دارای رابطه خواهری با گونه *C. subsalsa* هستند. اعضای این خانواده دارای کلروپلاست بوده و تک‌سلولی‌های فتوسنتز کننده‌ای می‌باشند که در گروه جلبک‌های با پتانسیل تشکیل شکوفایی مضر قرار می‌گیرند (Attaran Fariman, 2007).

۵. سپاسگزاری

کلیه مراحل آزمایشگاهی این پژوهش در آزمایشگاه دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار و تحت حمایت مالی این دانشگاه انجام‌گرفته است. بدین‌وسیله از زحمات کارشناسان این بخش به‌ویژه جناب آقای عباس حسن‌زاده و سرکار خانم بهروزی سپاس‌گزاری به عمل می‌آید.

منابع

Anderson, D.M.; Chisholm, S.W.; Watras, C.J., 1983. Importance of life cycle events in the population dynamics of *Gonyaulax tamarensis*. Marrine Biology, 75: 179-189.

Attaran Fariman, G., 2007. Dinoflagellate cyst and *Chattonella* resting stages from recent sediments of the southeast coast of Iran. University of Tasmania, Launceston, Australia, 350p.

Attaran Fariman, G., 2016. Dispersion and abundance assessment of different species of phytoplankton cysts in sediment of the Sea of Oman. Final report, devision of the marine environment, Chabahar Maritime University, 126p.

Attaran Fariman, G.; Bolch, CH., 2014. Morphology and genetic affinities of a novel *Chattonella isolate* (Raphidophyceae) isolated from Iran's south coast (Oman Sea). Turkish Journal of Botany, 38: 156-168.

Ben Ali, A.D.; Baere, R.; Auwera, G.D.; Wachter, R.; Van, D.; Peer, Y., 2001. Phylogenetic relationships among algae based on complete large-subunit rRNA sequences. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 51: 737-749.

Ben Ali, A.D.; Baere, R.D.; Wachter, R.; Van, D.; Peer, Y., 2002. Evolutionary relationships among heterokont

Hirashita, T.; Ichimi, K.; Montani, S.; Nomura, M.; Tajima, S., 2000. Molecular analysis of ribosomal RNA gene of red tide algae obtained from the Seto Inland Sea. Marine Biotechnology, 2: 267-273.

Imai, H.; Oomiya, Y.; Kikkawa, S.; Shoji, W.; Hibi, M.; Terashima, T.; Katsuyama, Y., 2012. Dynamic changes in the gene expression of zebere fish reelon receptors during embryoge and hatching priod. Development, Growth and Diferentation, 54(2): 253-263

Imai, I.; Yamaghchi, M., 2012. Life cycle, physiology, ecology and red tide occurrences of the fish killing raphidophyte *Chattonella*. Harmful Algae, 14: 46-70.

Jeanmougin, F.; Thompson, JD.; Gouy, M.; Higgins, DG.; Gibson, TJ., 1998. Multiple sequence alignment with Clustal X. Trends in Biochemical Sciences, 23: 403-500.

Kim, S.; Seo, K.; Lee, CH.; Lee, Y., 2007. Diurnal modification of a red-tide causing organism, *Chattonella antiqua* (Raphidophyceae) from Korea marine ecology research team, Nfrdi, Busan: Korea, 619-902.

Klein, R.M.; Cronquist, A., 1967. A consideration of the evolutionary and taxonomic significance of some biochemical, micromorphological, and physiological characters in the Thallophytes. The Quarterly Review of Biology, 42: 105-296.

Lewitus, A.J.; Brock, L.M.; Burke, M.K.; DeMattio, K.A.; Wilde, S.B., 2008. Lagoonal marine organisms off the Malabar coast, Indian Journal of Fisheries: along the South Carolina coast, Harmful Algae, 8: 60-65.

Lodish, F.; Darnell, E., 1995. Molecular cell biology. Scientific American Books. ISBN0716723808.oclc 30783343, W.H. Freeman, Oxford. 1187pp.

Portune, K.J.; Coyne, K.J.; Hutchins, D.A.; Handy, S.M.; Cary, S.C., 2009. Quantitative real-time PCR for detecting germination of *Heterosigma akashiwo* and algae (the autotrophic stramenopiles) based on combined analyses of small and large subunit ribosomal RNA. Protistology, 153: 123-132.

Bowers, H.A.; Tomase, C.; tengs, T.; Kempton, J.W.; Lewttus, A.J.; Oldach, D.W., 2006. Raphidophyceae [Chadefaud ex Silva] systematics and rapid identification: Sequence analyses and real-time PCR assays. Journal of Phycology, 42: 1333-1348.

Connell, L.B., 2000. Nuclear ITS region of the alga *Heterosigma akashiwo* (Chromophyta: Raphidophyceae) is identical in isolates from Atlantic and Pacific basins. Marine Biology, 136: 953-960.

Connell, L.B., 2002. Rapid identification of marine algae Raphidophyceae using three-primer PCR amplification of nuclear internal transcribed spacer (ITS) regions from fresh and archived material. Phycologia, 41: 15-21.

Coyne, K.J.; Handy, S.M.; Demir, E.; Whereat, E.B., 2005. Improved quantitative real-time PCR assays for enumeration of harmful algal species in field samples using an exogenous DNA reference standard. Limnol Oceanogr Methods, 3: 381-391.

Dale, B., 1983. Dinoflagellate resting cysts: "benthic plankton". In: survival strategies of the algae (Ed. by Fryxell G.A.). Cambridge University Press, Cambridge, 69-136pp.

Hall, TA., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Res Sympo Series, 41: 95-98.

Hallegraeff, G.M.; Munday, B.L.; Baden, D.G.; Whitney, P.L., 1998. *Chattonella marina* Raphidophyte bloom associated with mortality of cultured bluefin tuna (*Thunnus maccoyii*) in South Australia. In: Reguera B. Blanco J. Fernandez M.I. and Wyatt T. (Eds), Harmful Algae Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, 93-96pp.

Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M.; Kumar, S., 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysisusing maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony method. Molecular Biology and Evolution, 28: 2731-2739.

Tseng, C.K.; Zhou, M.J.; Zou, J.Z., 1993. Toxic phytoplankton studies in China. In smayda, T.J. and Shimizu, Y. (Eds), toxin phytoplankton bloom in the sea. Elsevier, Newport, RI, 347-352pp.

VonStosch, H.A.; Fecher, K., 1979. "Internal thecae'' of *Eunotia soleirolii* (Bacillariophyceae): development, structure and function as resting spores. Journal of Phycology, 15: 233-243.

Wall, D., 1971. Biological problem concerning fossilizable dinoflagellates, Geoscience and Man, 3: 1-15.

Wegener, A., 2013. Phylogeny and morphology of a *Chattonella* (Raphidophyceae) species from the Mediterranean Sea: what is *C. subsalsa*? European Journal of Phycology, 48(1): 79-92.

Zhang, Y.; Fu, F.X.; Whereat, E.; Coyne, K.J.; Hutchins, D.A., 2006. Bottom-up controls on a mixed species HAB assemblage: a comparison of sympatric *Chattonella subsalasa* and *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) isolates from the Delaware Inland bays, USA. Harmful Algae, 5: 310-320.

Chattonella subsalsa cysts from Delaware's Inland Bays, USA. Aquatic Microbial Ecology, 55: 229-239.

Potter, D.; Saunders, G.W.; Andersen, R.A., 1997. Phylogenetic relationships of the Raphidophyceae and Xanthophyceae as inferred from nucleotide sequences of the 18S ribosomal RNA gene. American Journal of Botany, 84: 966-972.

Smayda, T.J.; Shimizu, Y. (Eds.); Escobedo-Urias, D., 1999. Ciencia y Mar, Toxic phytoplankton blooms in the sea. Elsevier, New York, 347-352pp.

Smith, G.M., 1950. The fresh-water algae of the United States, 2nd Ed, McGraw-Hill, New York, 719 pp.

Steidinger, K.A.; Penta, H.L., 1999. Harmful microalgae and associated public health risks in the Gulf of Mexico. U.S. environmental protection agency: Gulf of Mexico program. Florida Marine Research Institute, St. Petersburg, Florida.

Subrah, M.R., 1954. On the life history and ecology of *Hornellia marina* gen. et sp. nov., (Chloromonadinae), causing green discoloration of the sea and mortality among marine organisms off the Malabar Coast. Indian Journal of Fisheries, 1: 182-203.

Takano, K.; Nidom, C.A.; Kisom, M.; Muramoto, Y.; Yamada, S.; Tagawa, Y.; Macken, C.; Kawaoka, Y., 2009. Phylogenetic characterization of H5N1 avian influenza viruses isolated in Indonesia from 2003-2007. virology, 390(1): 13-21.