

بررسی ریخت‌شناسی و شناسایی مولکولی گونه‌های *Sargassum vulgare* و *Sargassum fallax* (Fucales, Sargassaceae) از سواحل نیروگاه اتمی بوشهر، خلیج فارس

سودابه ایرانی‌نسب^۱، بیتا ارچنگی^{۲*}، فائده امینی^۳، نسرین سخایی^۴

۱- کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خوزستان، پست الکترونیکی: sudabeh.iraninasab@gmail.com

۲- استادیار، گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، پست الکترونیکی: bita.archangi@gmail.com

۳- استادیار، گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، پست الکترونیکی: faedeh_amin@yahoo.com

۴- دانشیار، گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، پست الکترونیکی: nsakhaee@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۹۶/۹/۴

* نویسنده مسوول

تاریخ دریافت: ۹۶/۳/۱۶

چکیده

در این تحقیق، بررسی ریخت‌شناسی و شناسایی مولکولی گونه‌های غالب جلبک‌های قهوه‌ای ساحل نیروگاه اتمی بوشهر مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌برداری جلبک‌ها در پاییز و زمستان ۹۳ از نواحی بین جزر و مدی انجام شد. ویژگی‌های ریخت‌شناسی جلبک‌ها با استفاده از کلیدهای شناسایی معتبر و میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفت. به منظور شناسایی مولکولی، ابتدا ژنوم جلبک‌ها با روش تغییر یافته CTAB استخراج و سپس تکثیر قطعات ژنومی توسط بخش DNA هسته‌ای ریبوزومی ITS-2 انجام شد. نتایج حاصل از Blast در بانک ژن و آنالیز نرم افزارهای ژنتیکی، دو گونه جلبک قهوه‌ای *Sargassum vulgare* و *Sargassum fallax* را تایید نمود. در نتیجه علی‌رغم وجود ابهامات در طبقه‌بندی جلبک‌های گونه سارگاسوم، تلفیق نتایج مشاهدات ریخت‌شناسی و استفاده از قطعه ژنومی ITS-2 گونه‌های مورد بررسی را با اطمینان صد در صد مورد شناسایی قرار داد.

کلمات کلیدی: جلبک قهوه‌ای، *Sargassum vulgare*، *Sargassum fallax*، ITS-2، نیروگاه اتمی بوشهر، خلیج فارس.

۱. مقدمه

جنس سارگاسوم شناسایی شده‌اند (Guiry and Guiry, 2017). در مناطق پایین جزرو مدی و نواحی کم عمق زیر جزر و مدی گونه‌های سارگاسوم به عنوان بسترهای مناسب نوزادگاهی و تغذیه‌ای بسیاری از ریزموجودات نقش مهمی را ایفا می‌کنند (Tsukidate, 1984). سیستم طبقه‌بندی اولیه که توسط Agardh ارائه گردید شامل ۵ زیر جنس می‌باشند که خود به بخش‌های کوچکتری نیز

جلبک قهوه‌ای سارگاسوم (*Sargassum fallax*) به عنوان گونه با پراکنش جغرافیایی گسترده در نواحی گرمسیری و معتدله، دارای پیچیده‌ترین طبقه‌بندی و غنی‌ترین گونه‌ها در بین جلبک‌های قهوه‌ای است. تاکنون ۳۳۶ گونه از

موجود باشند. در حقیقت، مطالعات ریخت‌شناسی، روش جامعی جهت شناسایی گونه‌های جدید نبوده و در اغلب موارد، شناسایی گونه‌های دریایی صرفاً از طریق بررسی ریخت‌شناسی، با خطای زیادی همراه است (Shams et al., 2015). امروزه با استفاده از نشانگرهای مولکولی و با با گردآوری اطلاعات تکمیلی و شناسایی گونه‌های مختلف سارگاسوم از نقاط مختلف دنیا، طبقه‌بندی سنتی دستخوش بازنگری گسترده‌ای شده است. هرچند که گونه‌های سارگاسوم بسیار متنوع بوده و از لحاظ ویژگی‌های ریخت‌شناسی بسیار به یکدیگر شباهت دارند. بنابراین، با در نظر گرفتن تنوع گسترده در خصوصیات ریخت‌شناسی در بین گونه‌های مختلف به خصوص در پاسخ به شرایط محیطی و مراحل رشد گونه‌های جلبک، استفاده از نشانگرهای مولکولی جهت ارزیابی جایگاه جنس سارگاسوم از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Mattoo and Payri, 2011). علی‌رغم انجام تحقیقات ریخت‌شناسی متعدد بر جنس سارگاسوم، بررسی‌های مولکولی در دنیا محدود هستند که اغلب محدود به ناحیه اندوپاسیفیک مرکزی می‌شوند. به عنوان مثال، تنوع جنس سارگاسوم که با استفاده از روش‌های مولکولی در اقیانوس اطلس انجام شده است، بیانگر این است که از ۲۱ گونه سارگاسوم بومی منطقه غرب اقیانوس اطلس، ۸ گونه مربوط به خلیج مکزیکو است (Phillips and Fredericq, 2000). در آب‌های جنوبی ایران نیز بررسی‌های ریخت‌شناسی و مولکولی توسط برخی محققین انجام شده است که از جمله می‌توان به تحقیقات شمس و همکاران اشاره نمود (Shams et al., 2013). تاکنون، تحقیقات متعدد مولکولی جهت شناسایی دقیق گونه‌های سارگاسوم و رفع ابهامات در طبقه‌بندی گونه‌ها و همچنین ارزیابی ارتباطات تکاملی و فیلوژنتیکی با استفاده از قطعات ژنومی شامل rbcLS (Bitner et al., 2008; Cho et al., 2006) و ITS-2 (Jegou et al., 2010) انجام شده است. بسیاری از مطالعات اخیر در مورد طبقه‌بندی مولکولی و فیلوژنی جلبک‌های قهوه‌ای از مارکرهای مولکولی متعدد استفاده شده است که از جمله رایج‌ترین آنها می‌توان *psaA*، *mtDNA*، *mt23S*، *SSU*، *LSU*، *ITS-2* و *rbcL* (Coyer et al., 2006; Draisma et al., 2010) را نام برد. با توجه به اهمیت بوم‌شناختی جلبک‌های جنس سارگاسوم و پیچیدگی‌ها و ابهامات متعدد تاکسونومیک و همچنین محدودیت اطلاعات آنها در سواحل خلیج فارس و دریای عمان، انجام تحقیقات گسترده‌تر در مورد این جنس ضروری است. هدف از تحقیق حاضر، ارزیابی ویژگی‌های ریخت‌شناسی (با

تقسیم شده است (Hurtado and Ragaza, 1999). طبقه‌بندی سنتی مذکور بر اساس تنوع در ویژگی‌های ریخت‌شناسی جلبک‌های جنس سارگاسوم بوده است که با اندکی تغییرات، از زمان‌های دور تاکنون مورد پذیرش جلبک‌شناسان قرار گرفته است. تنوع بسیار گسترده در خصوصیات ریخت‌شناسی مانند شکل برگ‌ها، وزیکول‌ها و رسپتاکل‌ها، جنس سارگاسوم را به ۵ زیر جنس تقسیم بندی نموده است (Hurtado and Ragaza, 1999) که شامل *Bactrophyucus* J.G. Agardh و *Arthrophyucus* J. Agardh *Sargassum* J. Agardh و *Phyllotrica* (Areschong) J. Agardh و *Schizophycus* J. Agardh هستند (Mattoo and Payri, 2011). علی‌رغم مطالعات گسترده، هنوز این جنس به بررسی‌های تکمیلی و بازنگری تاکسونومیک نیاز دارد (Mattoo and Payri, 2011). در حال حاضر، بیش از ۳۴۰ گونه، به عنوان گونه اخیر در بانک اطلاعاتی جلبک‌ها نامگذاری شده‌اند (Guiry and Guiry, 2017). از تحقیقاتی که تاکنون در منطقه سواحل خلیج فارس و دریای عمان در مورد شناسایی جلبک‌های قهوه‌ای سارگاسوم انجام شده است شامل مطالعه (Borgesens (1939 است که تعداد ۲۶ گونه از جلبک‌های قهوه‌ای را تا سطح جنس شناسایی نمود. تعداد ۶ گونه سارگاسوم نیز توسط (Rabii و Sohrabipour (۱۹۹۹) از سواحل استان هرمزگان گزارش گردید. همچنین دادالهی و همکاران (۱۳۹۱)، چندین گونه از جلبک‌های قهوه‌ای خلیج فارس را مورد شناسایی قرار دادند. اخیراً نیز تعداد ۱۹ گونه از جلبک‌های سارگاسوم توسط شمس و همکاران (۲۰۱۳) از سواحل جنوبی ایران گزارش شده است. در طبقه‌بندی سنتی به منظور شناسایی ماکروجلبک‌ها از ویژگی‌های ریخت‌شناسی مانند قلاب، پایه‌نگه-دارنده، محور ساقه، شکل برگ و نوع کیسه هوا استفاده می‌شود (Camacho et al., 2015). دیگر ویژگی‌های مورد استفاده برای شناسایی، اغلب شامل تعداد لایه‌های سلولی بدنه جلبک مانند ساقه یا ریشه، وجود یا عدم وجود بدنه آهکی و هاگدان، رنگ و اشکال کلروپلاست هستند (Richmond et al., 2008). بسیاری از گونه‌های ناشناخته جلبک‌های دریایی روابط فیلوژنی پیش‌بینی نشده‌ای را نشان می‌دهند که شناسایی این موجودات را با مشکلاتی مواجه می‌سازد. ضمن اینکه گونه‌های زیادی نیز فاقد ویژگی‌های ساختاری آشکار هستند. جلبک‌ها از نظر ریخت‌شناسی دارای تکامل همگرا بوده که این موضوع شناسایی گونه‌ای را تقریباً ناممکن می‌سازد. نتایج تحقیقات متعدد حاکی از این است که مطالعات ریخت‌شناسی به تنهایی نمی‌توانند پاسخگوی ابهامات

مورد نظر، قطعه ژنومی ITS-2، 5.8S-BF: CGATGAAGAAGGCAGCGAAATGCGA و 25BR-2: TCCTCCGCTTAGTATATGCTTAA به عنوان آغازگر مورد استفاده قرار گرفت (Yoshida et al., 2000). ژنوم نمونه‌های جلبکی در دستگاه ترموسایکلر با چرخه‌های حرارتی شامل واسرشته سازی اولیه با درجه حرارت ۹۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه و واسرشته سازی با درجه حرارت ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، الحاق با درجه حرارت ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، بسط با درجه حرارت ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و سه مرحله اخیر با تعداد ۳۰ چرخه تکرار و بسط نهایی با درجه حرارت ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. از نمونه‌های جلبکی مورد بررسی، محصولات PCR با باند مطلوب، جهت تعیین توالی به شرکت بایونیرکره ارسال شدند. کروماتوگرام توالی‌های بدست آمده ابتدا توسط نرم افزار کروماتس ویرایش شده و به منظور مقایسه توالی نمونه‌های مورد بررسی با توالی‌های مشابه در پایگاه اطلاعات ژنتیکی NCBI از برنامه BLAST به عنوان ابزار هم‌ردیفی توالی‌های DNA استفاده گردید و میزان تشابه و هم‌پوشانی و نیز شناسایی اولیه بر اساس داده‌های مولکولی مشخص شد. جهت بررسی جایگاه گونه‌های مورد مطالعه روی درخت فیلوژنی، توالی‌های ژنومی توسط نرم افزار MEGA، نسخه ۷ (Kumar and Tamura, 2015) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

۳. نتایج و بحث

در تحقیق حاضر، ۲ نمونه متمایز جلبک قهوه‌ای جنس *Sargassum* با استفاده از کلیدهای شناسایی (Baldock, 2009; Shams et al., 2015; Camacho et al., 2015; Andrade-Sorcía, 2014; Abbas et al., 2009, 2014) مورد بررسی قرار گرفته و شناسایی شدند. ویژگی‌های مورد نظر در شناسایی و مطابقت با کلیدهای معتبر شامل رنگ، شکل برگ و نوع کیسه هوایی بودند. پس از دریافت توالی‌ها جهت انجام بررسی‌های مولکولی گونه‌های سارگاسوم، توالی‌های به دست آمده با توالی‌های موجود در بانک ژن نتایج حاصل از BLAST، شباهت ۱۰۰ درصدی را برای نمونه‌های ساحل نیروگاه اتمی بوشهر به ترتیب با توالی‌های مربوط به *Sargassum fallax*، *Sargassum vulgare* نشان دادند.

استفاده از کلیدهای شناسایی معتبر) و بررسی مولکولی (با استفاده از ژن هسته‌ای ITS-2) گونه‌های غالب جلبک جنس سارگاسوم در ساحل نیروگاه اتمی بوشهر است. بدین منظور، از تلفیق داده‌های ریخت شناسی و مولکولی جهت تشخیص جایگاه گونه‌های شناسایی شده بر درخت فیلوژنی استفاده شده است.

۲. مواد و روش‌ها

منطقه مورد بررسی در تحقیق حاضر، نوار ساحلی استان بوشهر انتخاب گردید که در مجاورت نیروگاه اتمی از محل ورودی شهر تا روستای هلیله قرار داشت. انتخاب مکان نمونه‌برداری بر اساس میزان پراکنش و حضور جلبک‌های قهوه‌ای و با توجه به اهمیت ساحل نیروگاه اتمی بوشهر صورت پذیرفت. نمونه‌برداری از جلبک‌های قهوه‌ای غالب در فصول پاییز (مهر تا آذر ۹۳) و زمستان (دی تا اسفند ۹۳) در زیستگاه‌های محل رویش جلبک‌ها در مناطق صخره‌ای سنگیاز منطقه‌ی بین جزر و مدی در زمان جزر کامل انجام شد. ابتدا نمونه‌های جلبک، از محل رویش با دست جمع آوری شدند. سپس با آب دریا شستشو داده شده و به صورت جداگانه در کیسه‌های پلاستیکی در کنار یخ قرار گرفتند و به آزمایشگاه انتقال یافتند. نمونه‌های جلبکی در آزمایشگاه با آب دریا و سپس آب مقطر شست و شو داده شدند و جهت نگهداری به فریزر ۲۰- منتقل شدند. جهت شناسایی هر یک از نمونه‌های جلبکی در آزمایشگاه، خصوصیات ریخت‌شناسی آنها (شامل رنگ، شکل برگ، کیسه‌های هوایی، محور ساقه، قلاب پایه نگه دارنده) به دقت بررسی شدند و همچنین از نمونه‌ها عکس‌هایی جهت مقایسه با کلیدهای شناسایی معتبر، تهیه شد. سپس مشخصات مذکور با کلیدهای شناسایی، تطبیق داده شده و در نهایت، شناسایی نمونه‌های جلبکی صورت گرفت (Baldock et al., 2009; Shams et al., 2015; Bast et al., 2014). جهت بررسی میکروسکوپی بافت پوششی برگ و کیسه‌های هوایی جلبک‌های غالب قهوه‌ای، ابتدا برش عرضی از برگ‌ها و کیسه هوا تهیه شد. سپس نمونه‌های جلبکی به کمک میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی شیئی ۱۰ و ۴۰ و بزرگنمایی چشمی ۱۰ از نظر بافت شناسی با هم مقایسه شدند (Abbas et al., 2009). جهت استخراج ژنوم، از روش تغییر یافته CTAB، استفاده شد (Phillips and Fredericq, 2000). برای انجام PCR و تکثیر ژن

۱-۳ ویژگی‌های ریخت‌شناسی جلبک قهوه‌ای گونه *Sargassum vulgare*

در تحقیق حاضر، رنگ این ماکروجلبک با شاخه‌های زیاد و نامنظم، قهوه‌ای روشن متمایل به زیتونی مشاهده شد. در قسمت تاج، شاخه‌هایی صاف به قطر یک میلی‌متر وجود دارد. شاخه‌های جانبی صاف و باریک بوده و برگ‌هایی که در قسمت تاج دیده می‌شود بلند و باریک هستند. برگ‌ها پهنایی حدود ۱۳ تا ۱۴ میلی‌متر داشته با کناره‌هایی دندان‌دار یا خاردار و همچنین دارای شیار وسط می‌باشند. کیسه‌ی هوای بیضی شکل به قطر دو تا سه میلی‌متر نیز دیده شد. از کنار هر برگ یک کیسه هوا بیرون آمده که در بعضی قسمت‌ها به صورت دوتایی مشاهده گردید. هر کیسه‌ی هوایی یک پایه اضافه و یک برگچه اضافه داشت. کیسه‌های هوایی متعددی به رنگ سبز رسیده و به صورت متقابل مشاهده شد. قلاب پایه نگهدارنده ضخیم و فشرده بود. پایه نگهدارنده نیز به صورت ضخیم و دارای برجستگی دیده شد.

در بررسی میکروسکوپی برگ، بافت اپیدرم به صورت یک یا دو لایه از سلول‌های چند وجهی که بیشتر سلول‌های آن دارای اندازه و شکل متفاوتی بودند مشاهده گردید. همچنین بافت مزوفیل متشکل از چند ردیف منظم، سلول چند وجهی با اندازه‌های متفاوت بود. بافت آوندی کاذب بین بافت مزوفیل دیده می‌شد. چند ردیف سلول چند وجهی با اندازه‌های نسبتاً کوچک‌تر بافت آوندی کاذب را ساخته بودند. در بررسی میکروسکوپی کیسه هوا کوتیکول به صورت یک لایه ضخیم و منظم از سلول‌های چند وجهی با شکل‌های متفاوت قابل مشاهده بود. بافت مزوفیل به صورت چند ردیف از سلول‌های چند وجهی و فاقد فضای بین سلولی دیده شد. اپیدرم خارجی از یک لایه منظم از سلول‌های چند وجهی تشکیل شده بود. بافت اپیدرم داخلی به صورت چند ردیف سلول استوانه‌ای که به طور منظم به صورت افقی کنار هم قرار داشتند، مشاهده گردید.

۲-۳ ویژگی‌های ریخت‌شناسی جلبک قهوه‌ای گونه *Sargassum fallax*

نمونه‌های این ماکروجلبک، قهوه‌ای تیره بوده و شاخه‌های کم و منظمی داشتند. در قسمت تاج شاخه‌های صاف و پهن داشتند و

شاخه‌های جانبی نیز صاف و پهن بودند. محور ساقه صاف و نسبتاً پهن به قطر دو تا سه میلی‌متر بود. برگ‌ها با پهنای ۸ تا ۹ میلی‌متر پهن، کشیده با حاشیه دندان‌های، دارای شیار وسط و فاقد لبه دیده شدند. کیسه‌های هوای تخم مرغی شکل به قطر ۳ تا ۴ میلی‌متر به صورت منظم و در تعداد نسبتاً کم روی شاخه‌های جانبی دیده می‌شدند. قلاب پایه نگه دارنده، ضخیم و محکم بوده و چندپایه نگه‌دارنده از آن منشعب شده بود. پایه نگه‌دارنده نیز محکم، ضخیم و صاف بود.

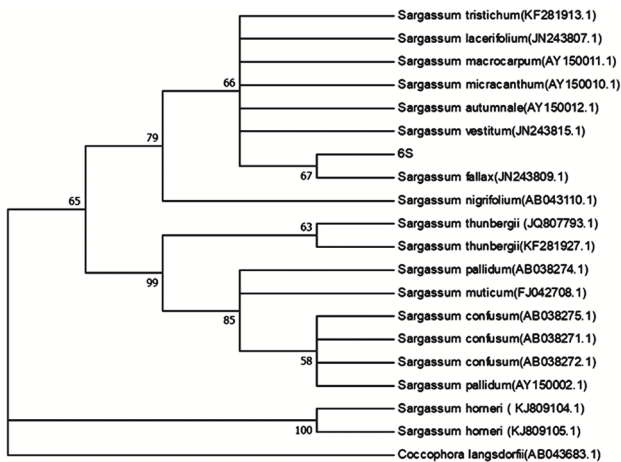
در بررسی میکروسکوپی برگ، بافت اپیدرم به صورت یک لایه از سلول‌های چند وجهی بود که از نظر اندازه و شکل تقریباً یکسان بودند. بافت مزوفیل از چند ردیف منظم از سلول‌های چند وجهی با اندازه‌های متفاوت و فاقد فضای بین سلولی تشکیل شده بود. بافت آوندی کاذب دارای چند ردیف سلول چند وجهی، با اندازه‌های کوچک در بین بافت مزوفیل بودند.

در بررسی میکروسکوپی کیسه هوا، کوتیکول به صورت چند لایه منظم و ضخیم از سلول‌های چند وجهی مشاهده گردید. بافت مزوفیل به صورت چند ردیف از سلول‌های چند وجهی و اپیدرم خارجی به صورت چند لایه منظم از سلول‌های چند وجهی دیده شدند. بافت اپیدرم داخلی از چند لایه منظم سلول‌های استوانه‌ای تشکیل شده بود.

۳-۳ بررسی مولکولی گونه *Sargassum vulgare*

نتایج حاصل از بلاست توالی‌ها، شباهت ۱۰۰ درصدی گونه مورد بررسی در این تحقیق (3S) را با گونه *Sargassum vulgare* نشان داد. به منظور رسم درخت فیلوژنی، ۱۸ توالی مربوط به ژن ITS-2 با بیشترین شباهت به گونه *Sargassum vulgare* مورد مقایسه قرار گرفتند. بدین ترتیب درخت تبارزایی به روش Fast Minimum Evolution (ME) با بوتسترپ ۱۰۰۰ ترسیم شد (شکل ۱). الگوی مونوفیلیتیک بدست آمده و موقعیت گونه *Sargassum vulgare* نشان داد که این گونه با سارگاسوم موجود در سواحل جزایر قناری اسپانیا (gb|HQ416069.1) و گونه *Sargassum polyphyllum* (gb|EU833424.1) در سواحل نیوکالدونیا و همچنین گونه *Sargassum vulgare* (gb|KJ572480.1) متعلق به سواحل ایتالیا در یک کلاد مشترک قرار دارند (3S) در درخت فیلوژنی شکل ۱).

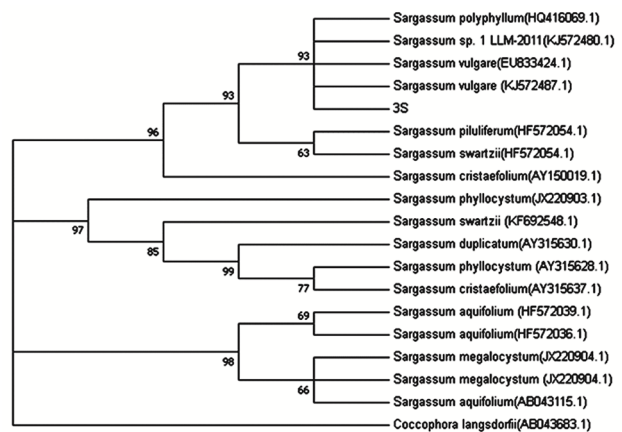
Andrade-Sorcía et al., 2010). در مطالعه‌ای که توسط (Draisma et al., 2010) و همکاران (۲۰۱۴) برای شناسایی جنس سارگاسوم در آب‌های خلیج کالیفرنیا انجام شد با استفاده از نشانگرهای مولکولی ITS-2، COI، COIII و خصوصیات ریخت‌شناسی مانند اختلاف در شکل قلاب، کیسه‌هوا و حاشیه برگ، ۶ گونه شناسایی شدند. نتایج مطالعه این محققین نشان داد که قوی‌ترین بخش تشخیصی در شناسایی گونه‌ها، قلاب است. هر چند ممکن است برای هر گونه ویژگی ریخت‌شناسی خاصی در مطالعات سیستماتیک همان گونه حائز اهمیت باشد.



شکل ۲: موقعیت گونه *Sargassum fallax* (6S) روی درخت فیلوژنی مدل ME

بررسی‌های مولکولی انجام شده بیانگر این است که مارکرهای مورد استفاده بخش ITS-2 ژنوم هسته‌ای، قطعات ژنومی مناسبی جهت تشخیص و تعیین گونه‌های جلبک قهوه‌ای در منطقه ساحل نیروگاه اتمی بوشهر محسوب می‌شوند. نتایج تحقیق حاضر و مقایسه آن با بررسی‌های مشابه (Kurihara et al., 2012; Yoshida, 2000) بیانگر نشانه‌هایی از هم‌گونه بودن^۱ گونه‌های شناسایی شده است. به عبارتی می‌توان گفت نتایج بدست آمده از تحقیقات شناسایی ریخت‌شناسی و مولکولی جلبک‌های جنس سارگاسوم، انشعابات تکاملی اخیر در گونه‌های این جنس را منعکس می‌سازند. در تحقیق حاضر، به نظر می‌رسد شباهت‌های بسیار نزدیک بین گونه‌های مختلف در جنس سارگاسوم گویای همین مطلب باشد.

در نمونه‌های مربوط به گونه *Sargassum vulgare* ویژگی‌های ریخت‌شناسی و مولکولی، کاملاً منطبق با ویژگی‌های این



شکل ۱: موقعیت گونه *Sargassum vulgare* (3S) روی درخت فیلوژنی مدل ME

۴-۳ بررسی مولکولی گونه *Sargassum fallax*

نتایج حاصل از بلاست، شباهت ۱۰۰ درصدی را برای نمونه مورد مطالعه در این تحقیق (6S) با توالی‌های مربوط به *Sargassum fallax* (gb|JN243809.1) متعلق به سواحل استرالیا نشان داد. بر اساس نتایج شناسایی مولکولی، گونه مورد مطالعه، گونه *Sargassum fallax* تشخیص داده شد. به منظور رسم درخت فیلوژنی، ۲۲ توالی مربوط به ژن ITS-2 با بیشترین شباهت به نمونه *Sargassum fallax* از بانک ژن انتخاب شدند. بدین ترتیب درخت تبارزایی با مدل ME با بوتسترپ ۱۰۰۰ ترسیم شد (شکل ۲). نتایج نشان داد که گونه‌های، *Sargassum fallax* (gb|JN243809.1)، *Sargassum vestitum* (gb|JN243815.1)، *Sargassum lacerifolium* (gb|JN243807.1)، متعلق به سواحل استرالیا و گونه *Sargassum sinclairii* (gb|FJ170458.1) از آب‌های ساحلی نیوزیلند با نمونه مورد بررسی در شاخه‌ی مشترک قرار می‌گیرند (6S) در درخت فیلوژنی (شکل ۲).

در تحقیق حاضر، با توجه به شواهد ریخت‌شناسی و آنالیزهای مولکولی ۲ گونه جلبک قهوه‌ای جنس *Sargassum* از سواحل نیروگاه اتمی بوشهر شناسایی شدند. جلبک‌های قهوه‌ای و به‌ویژه جنس سارگاسوم از جمله فراوان‌ترین جلبک‌های سواحل صخره‌ای استان بوشهر محسوب می‌شوند. این جلبک‌ها در تمام سواحل دنیا دارای اهمیت بوم‌شناختی هستند. این گروه از جلبک‌های قهوه‌ای در نواحی جزر و مدی سواحل صخره‌ای نقش مهمی را در تهیه غذا، زیستگاه و پناهگاه مناسب و همچنین به وجود آوردن مکان تخم‌گذاری بعهده دارند (Garretta, 2000;)

^۱ Conspecificity

گونه طبق کلید شناسایی و توالی‌های ژنومی موجود در بانک ژن است. این گونه دارای شاخه‌های صاف، برگ‌های حاشیه‌ای دنداندار با شیار وسط بوده و دارای کیسه‌های تخم‌مرغی شکل یا کروی می‌باشد. همچنین گونه مذکور از نظر خصوصیات ریخت‌شناسی مشابه با گونه‌ای است که در سواحل عربستان توسط Cho و همکاران (۲۰۱۲) گزارش شده است. بررسی مولکولی به منظور شناسایی این گونه بر اساس نشانگر ITS-2 هسته‌ای و مقایسه نتایج Blast نشان داد که این نمونه کاملاً با توالی *Sargassum vulgare* منطبق است (شکل ۱). بنابراین به طور قطع به عنوان گونه *Sargassum vulgare* معرفی گردید. Cho و همکاران (۲۰۱۲) نیز وجود این گونه را از خلیج نپال بر اساس نشانگر مولکولی psbA و 28SrRNA گزارش داده‌اند.

در تحقیق حاضر، با توجه به شواهد ریخت‌شناسی و آنالیزهای مولکولی نمونه‌های *Sargassum fallax* با احتمال ۱۰۰ درصد شناسایی شدند (شکل ۲). کلیه خصوصیات ریخت‌شناسی نمونه‌های مورد بررسی در این تحقیق با گونه *S. fallax* مطابقت نشان داد. تحقیقات نشان داده است که جنس سارگاسوم بطور کلی دارای پلی‌مورفیسم درون گونه‌ای ضعیفی می‌باشد (Dixon et al., 2012). بنابراین، بازبینی در مورد طبقه‌بندی جنس سارگاسوم امری ضروری است که این امر با استفاده از ترکیب داده‌های ریخت‌شناسی سنتی، داده‌های بوم-شناختی و اطلاعات توالی DNA میسر خواهد شد (Phillips and Fredericq, 2000; Stiger et al., 2003). در مطالعه‌ای که شمس و همکاران (۲۰۱۵) در ارتباط با شناسایی جلبک‌های قهوه‌ای سارگاسوم انجام دادند، دریافتند که تغییرات محیطی در ریخت‌شناسی جلبک‌ها بسیار تأثیرگذار است. این محققین بیان داشتند با اینکه دو گونه *S. binderi* و *S. oligocystum* از نظر ریخت‌شناسی بسیار مشابه هستند، با این حال شکل کیسه‌های هوا در دو گونه متفاوت است. همین‌طور بیان داشتند که در بررسی طبقه‌بندی گونه‌های جلبک سارگاسوم، مطالعه اندام کیسه‌های هوا و اندام‌های تولید مثلی برای تمایز شناسایی گونه‌ها بسیار مهم هستند. به طور کلی از مهم‌ترین خصوصیات که برای شناسایی ریخت‌شناسی جنس سارگاسوم استفاده می‌شوند شامل قلاب، شکل برگ، کیسه‌های هوا و به خصوص نهج (که به عنوان اندام تولید مثلی مطرح است) هستند (Matio and Payri, 2011). در پژوهشی دیگر، جلبک‌های قهوه‌ای سارگاسوم در سواحل جزیره پلینزی فرانسه از نظر مولکولی و ریخت‌شناسی مورد بررسی

قرار گرفته است (Matio et al., 2011). در این تحقیق از مارکرهای مولکولی ITS-2 هسته‌ای، rbcLS کلروپلاستی و COIII میتوکندری استفاده گردید. نتایج این محققین نشان داد که بین دو گونه *S. pacificum* و *S. obtusifolium* از نظر مولکولی پلی‌مورفیسم وجود دارد. بنابراین، شناسایی این دو گونه، با استفاده از مارکر ITS-2 هسته‌ای نشان داد، با وجود اینکه دو گونه از نظر ریخت‌شناسی برگ بسیار متفاوت و مجزا هستند گونه *S. obtusifolium* از هاوایی به عنوان گونه مشابه با *S. pacificum-obtusifolium* معرفی شد. در تحقیق حاضر، در مورد نمونه‌های جنس *Sargassum fallax*، پیچیدگی‌های ریخت‌شناسی و شباهت‌های ظاهری برخی گونه‌ها به یکدیگر نیز مشاهده شد. بدین ترتیب که در نمونه‌های *Sargassum fallax* با وجود شباهت زیاد، تفاوت‌هایی در شکل برگ دیده شد. این گونه دارای رنگ قهوه‌ای تیره و دارای شاخه‌های استوانه‌ای صاف و کیسه‌های تخم‌مرغی شکل هستند. با این حال در نمونه‌های *Sargassum fallax* تحقیق حاضر، برگ‌ها صاف و فاقد لبه هستند و شکل برگ‌ها در گونه‌های مختلف سارگاسوم به میزان زیادی متنوع می‌باشند. برگ‌ها می‌توانند ساده، دوشاخه، یا چندین بار تقسیم شوند. همچنین حاشیه برگ‌ها ممکن است ساده، دوتایی و یا در قسمت راسی صاف و یا موج باشد (Matio and Payri, 2011).

۴. نتیجه‌گیری

بررسی‌های به عمل آمده در این تحقیق و تلفیق آن با نتایج تحقیقات مشابه، بیانگر این است که پدیده انعطاف پذیری فنوتیپی به میزان زیادی حتی در بین جلبک‌هایی که متعلق به یک گونه هستند نیز رخ می‌دهد. به همین دلیل، شناسایی گونه‌های سارگاسوم بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و بافت‌شناسی به تنهایی در تشخیص و شناسایی دقیق گونه‌ها کافی نبوده و تلفیق داده‌های حاصل از مطالعات ریخت‌شناسی و بررسی‌های مولکولی به منظور تایید شناسایی گونه‌ها، در شناسایی دقیق گونه‌های جنس سارگاسوم در ساحل نیروگاه اتمی بوشهر ضروری هستند. این تحقیق نشان داد، قطعه ژنومی ITS-2 می‌تواند به عنوان نشانگری دقیق و کارآمد برای شناسایی مولکولی نمونه‌های جلبک قهوه‌ای جنس سارگاسوم تا سطح گونه با موفقیت مورد استفاده قرار گیرد.

- Phylogenetic relationships within the Fucales (Phaeophyceae) assessed by the photosystem I coding *psaA* sequences. *Phycologia*, 45: 512-519.
- Coyer, A.; Hoarau, G.; Oudot-Le Secq, M.; StamW.T.; Olsen, J.L., 2006. A mtDNA – based phylogeny of the brown algal genus *Fucus* (Heterokontophyta; Phaeophyta). *Molecular Phylogenetics and Evolution Journal*, 39: 209-222.
- Cho, S.M.; Lee, S.M.; KO, Y.D.; Mattio, L.; Boo, S.M., 2012. Molecular systematic reassessment of *Sargassum* (Fucales, Phaeophyceae) in Korea using four gene regions. *Botanica Marina*, 55: 473-484.
- Camacho, O.; Mattio, L.; Draisma, S.; Fredericq, S.; Diaz-Pulido, G., 2015. Morphological and molecular assessment of *Sargassum* (Fucales, Phaeophyceae) from Caribbean Colombia, including the proposal of *Sargassum giganteum* sp. nov., *Sargassum schnetteri* comb. Nov and *Sargassum* section *Cladophyllum* sect. nov. *Systematics and Biodiversity*, 13: 105-130.
- Draisma, S.G.A.; Baliesteros, E.; Rousseau, F.; Thibaut, T., 2010. DNA sequence data demonstrate the polyphyly of the genus *Cystoseira* and other Sargassaceae genera (Phaeophyceae). *Journal of Phycology*, 46: 1329-1345.
- Dixon, R.R.M.; Huisman, J.M.; Buchanan, J.; Gurgel, C.F.D.; Spencer, P., 2012. A morphological and molecular study of austral *Sargassum* (Fucales, phaeophyceae) supports the recognition of phyllotricha at genus level, with further additions to the genus *Sargassopsais*. *Journal of Phycology*, 48: 1119-1129.
- Garretta, A., 2000. *Cystoseira* C. Agardh. In: A. Gomez Garreta (Editor). *Flora phycologica Iberica*, Vol.1 Fucales. University of Murcia, Publications Services, Barcelona, 99-101P.
- Guiry, M.D.; Guiry, G.M., 2017. *Algae Base*. Galway: World-wide electronic publication, National University of Ireland. <http://www.algaebase.org>, accessed 30
- دادالهی، س، گراوند کریمی، م، عماد آبادی، ا، ۱۳۹۱. بررسی تغییرات فصلی پراکنش و میزان زی‌توده جلبکهای غالب سواحل جزر و مدی استان بوشهر (ساحل شمالی خلیج فارس). نشریه اقیانوس‌شناسی. شماره ۹، صفحات ۲۶-۱۷.
- Abbas, A.; Shameel, M., 2009. Anatomical studies on *Colpomena sinuosa* (Phaeophycota) From Karachi coast of Pakistan. *Pakistan Journal of Botany*, 41: 1921-1926.
- Abbas, A.; Shameel, M., 2014. Morpho-Anatomy of *Styopodium zonale* (Phaeophyta) from the coast of Karachi. *Pakistan Journal of Botany*, 46: 1495-1499.
- Andrade-Sorcía, G.; Riosmena-Rodríguez, R.; Muñoz-Salazar, R.; López-Vivas, J.M.; Boo, G.H.; Lee, K.M.; Boo, S.M., 2014. Morphological reassessment and molecular assessment of *Sargassum* (Fucales: Phaeophyceae) species from the Gulf of California, México. *Phytotaxa*, 183: 201-223.
- Borgesen, F., 1939. Marine algae from the Persian Gulf especially from the innermost part near Bushire and the Island Kharg. In: Jessen K, Spärck R (eds) *Danish Scientific Investigations in Iran, Part I*. Copenhagen, 47–141PP.
- Bitner, L.; Payri, C.E.; Couloux, A.; Cruaud, C.; De Reviers B.; Rousseau, F., 2008. Molecular phylogeny of the Dictyotales and their position within the Phaeophyceae based on nuclear, plastid and mitochondrial DNA sequence data. *Molecular Phylogenetic and Evolution Journal*, 49: 211-226.
- Baldock, R.N., 2009. Pictured key to the southern Australian species of *Sargassum* Algae Revealed. Australian State Herbarium, Australia, 140P.
- Bast, F., 2014. Sequence similarity search, multiple sequence alignment, model selection, distance matrix and phylogeny reconstruction. *Nature Protocol Exchange*, 1: 1-5.
- Cho, G.Y.; Rousseau, F.; De Reviers, B.; Boo, S.M., 2006.

- 131-162.
- Stiger, V.; Horiguchi, T.; Yoshida, T.; Coleman, A.W.; Masuda, M., 2003. Phylogenetic relationships inferred from ITS-2 nDNA comparisons within the genus *Sargassum* (Fucales, Phaeophyceae) from the Pacific basin, with an emphasis on the taxonomic subdivision of the genus. *Phycological Research*, 51: 1-10.
- Shams, M.; Afsharzadeh, S.; Balali, Gh.; De Clerck, O., 2013. Revision *Sargassum* species (Fucals, Phaeophyceae) from Persian Gulf and Oman Sea (Iran) based on morphological and phylogenetical analyses. *Proceeding of 18th National Symposium on Applied Biological Sciences*. February. 27-30, 2013. Ghent University, Ghent, Belgium, 253P.
- Shams, M.; Afsharzadeh, S.; Balali, Gh., 2015. Taxonomic Study of Six *Sargassum* Species (Sargassaceae, Fucales) with Compressed Primary Branches in the Persian Gulf and Oman Sea Including *S. binderi* Sonder a New Record Species for Algal Flora, Iran. *Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran*, 26: 7-16.
- Kumar, S.; Tamura, K., 2015. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0. *Molecular Biology and Evolution*. www.kumarlab.net/publications.
- Tsukidate, J., 1984. Studies on the regenerative ability of the brown algae, *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt and *Sargassum tortile* C. Agardh. *Hydrobiologia*, 116 (117): 393-397.
- Yoshida, T.; Stiger, V.; Horiguchi, T., 2000. *Sargassum boreale* sp. nov. (Fucales, Phaeophyceae) from Hokkaido, Japan. *Phycology Research Journal*, 48: 125-131.
- September 2014.
- Hurtado, A.Q.; Ragaza, A.R., 1999. *Sargassum* studies in Currimao, Ilocos Norte, Northern Philippines I. Seasonal variations in the biomass of *Sargassum carpophyllum* J. Agardh, *Sargassum ilicifolium* (Turner) C. Agardh and *Sargassum siliquosum* J. Agardh (Phaeophyta, Sargassaceae). *Botanica Marina*, 42(4), 321-325.
- Jegou, C.; Culoili, G.; Kervarek, N.; Simon, G.; Stiger-Pouvreau, V., 2010. LC/ESI-MS and 1H HR-MAS NMR analytical methods as useful taxonomical tools within the genus *Cystoseira* C. Agardh (Fucales; Phaeophyceae). *Talanta*, 83: 613-622.
- Kurihara, A.; West, J.A.; Conklin, K.Y.; Sherwood, A.R., 2012. A second species of *Rhodochlyta* from Hawaii, with a description of *R. hawaiiiana* cryptogamie, *Algology*, 33: 21-33.
- Mattio, L.; Payri, C.E., 2011. 190 years of *Sargassum* Taxonomy, Facing the Advent of DNA Phylogenies. *The Botanical Review*, 77: 31-70.
- Phillips, N.; Fredericq, S., 2000. Biogeographic and phylogenetic investigations of the pantropical genus *Sargassum* (Fucales, Phaeophyceae) with respect to Gulf of Mexico Species. *Gulf of Mexico Science*, 2: 77-87.
- Richmond, R.H.P.; Houk, M.; Trianni, E.; Wolanski, G.; Davis, V.; Paul, V.J., 2008. Aspects of biology and ecology functioning of coral reefs in Guam and the Commonwealth of the Northern Mariana Island: Riegl, B.M., Dodge, R.E. (eds.), *coral reefs of the world*. Springer, 719-739P.
- Sohrabipour, J.; Rabii, R., 1999. A list of marine algae of seashores of Persian Gulf and Oman Sea in the Hormozgan Province. *Iranian Journal of Botany*, 8: