

فیلوژنی داینوفلاژله *Gyrodinium instriatum* به‌عنوان گونه جانبی در هنگام کشند سرخ گونه *Gonyaulax polygramma* جداشده از آب‌های ساحلی رمین (دریای مکران)

گیلان عطاران فریمان^{۱*}، فائزه دولت‌آبادی^۲، مهران لقمانی^۳

۱- دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، دانشکده علوم دریایی، گروه زیست دریا، چابهار، ایران، پست الکترونیکی:

Gilan.attaran@gmail.com

۲- دانشجو، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، پست الکترونیکی: f.a.dolatabadi71@gmail.com

۳- اسنادیار، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، پست الکترونیکی: loghmani_Mehran@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۹۹/۳/۱۷

* نویسنده مسوول

تاریخ دریافت: ۹۸/۴/۸

چکیده

به‌منظور شناسایی و بررسی فیلوژنی گونه‌های داینوفلاژله عامل ایجاد کشند سرخ که در آبان ماه سال ۱۳۹۶ در منطقه بین تالاب لیپار و دریابزرگ واقع در سواحل جنوب شرقی ایران اتفاق افتاد، نمونه‌برداری از آب توسط بطری ساده انجام شد. در این کشند گونه *Gyrodinium instriatum* با تراکم بسیار پایین‌تر به‌عنوان گونه جانبی نسبت به گونه‌های عامل کشند مشاهده گردید. مراحل خالص‌سازی گونه‌ها به روش رقیق‌سازی و همین‌طور با استفاده از روش تک‌سلولی در شرایط آزمایشگاهی انجام شد و ایزوله خالص این گونه در اتاق کشت در محیطی کاملاً استریل تحت شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در درجه حرارت $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ در محیط کشت f2 کشت داده شد. جهت بررسی توالی ژنی، DNA ایزوله خالص استخراج و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR) انجام شد و توالی ژنی در منطقه ژنی ITS تعیین شده و سپس با توالی ژنی گونه‌های مشابه در بانک ژن (GenBank) توسط نرم‌افزار MEGA7 مقایسه گردید. بررسی مولکولی و فیلوژنی این گونه نشان داد توالی نوکلئوتیدی گونه موردنظر با ۹۹٪ بوت استرپ بیشترین شباهت را با گونه *G. instriatum* دارد و گروه خواهر *Levanderina fissa* است. گونه *G. instriatum* پراکنش وسیع داشته و در سراسر آب‌های جهان وجود دارد و می‌تواند ایجاد کشند سرخ کند لذا شناسایی دقیق آن امری ضروری و کاربردی می‌باشد.

کلمات کلیدی: داینوفلاژله، *Gyrodinium instriatum*، توالی ژنی، کشند سرخ، ITS، دریای مکران.

۱. مقدمه

(Xu et al., 2014). هر تغییری در محیط منجر به تغییر تنوع و فراوانی آن‌ها می‌شود (Alverca et al., 2002).

شکوفایی مضر جلبکی HABS^۱ که به‌عنوان کشند سرخ شناخته می‌شود ازدیاد گونه‌های جلبکی است که یا سم تولید می‌کنند یا

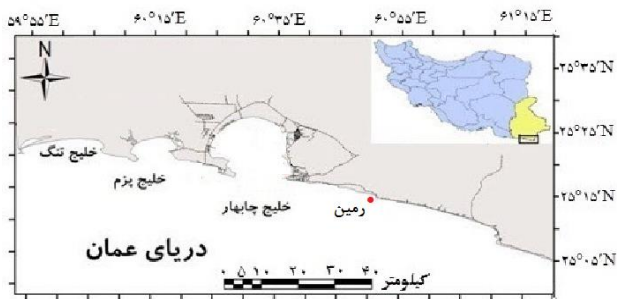
داینوفلاژله‌ها از گروه‌های مهم فیتوپلانکتون‌ها در اکوسیستم‌های ساحلی هستند که در بسیاری از مناطق عامل کشند سرخ می‌باشند و همین‌طور به‌عنوان شاخص زیست محیطی در اکوسیستم‌های آبی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Moestrup et al.,

¹ Harmful Algae Blooms

instriatum بومی دریای عمان تنها یک گزارش ثبت ژن در قسمتی از منطقه ژنی 28s LSU و ITS در بانک ژن وجود دارد (Zadabbas Shahabbadi et al., 2011) ولی هیچ گونه اطلاعاتی جهت مقایسه و بررسی فیلوژنی گونه ثبت نشده است. در آبهای دیگر نقاط ساحلی هم مطالعات اندکی در مورد فیلوژنی این گونه وجود دارد. Kim و Kim در سال ۲۰۰۷ روابط فیلوژنتیکی را در بین گونه های مختلف داینوفلاژله ها بررسی کردند داده های مولکولی نشان داد که گونه های *Gyrodinium* با ۸۵ درصد بوت استرپ یک گروه تک نیایی را تشکیل می دهند که از بین آنها *G. fissum* در پایه ای ترین موقعیت در درخت فیلوژنی قرار داشت (Saldarriaga et al., 2004). شناسایی و شناخت دقیق داینوفلاژله ها بر اساس ویژگیهای مورفولوژی و توالی ژنی به عنوان مهم ترین گروه عامل ایجاد کشند سرخ در آب های ساحلی از نظر زیست محیطی بسیار حائز اهمیت و کاربردی می باشد. در این مطالعه به جداسازی و خالص سازی و شناسایی گونه *G. instriatum* به عنوان گونه جانبی در هنگام کشند سرخ گونه *G. polygramma* بر اساس شاخص مولکولی پرداخته شده است.

۲. مواد و روش ها

نمونه برداری از آب دریای عمان در هنگام بلوم *G. polygramma* در آبان سال ۱۳۹۶ از سواحل رمین واقع در جنوب شرق ایران انجام شد (شکل ۱ جهت تهیه نقشه از نرم افزار ArcGIS استفاده شد). بدین منظور حدود ۱/۵ لیتر از آب ایستگاه مورد نظر از سطح که دارای تراکم بالایی از برخی جلبک های تک سلولی بود توسط بطری ساده برداشت شد.



شکل ۱: موقعیت جغرافیایی منطقه نمونه برداری (رمین)

میزان درجه حرارت با ترمومتر و شوری آب توسط شوری سنج چشمی مدل MT-110 (کره) در محل نمونه برداری تعیین

فقط با تراکم زیاد به صورت مستقیم و غیرمستقیم به موجودات آبی آسیب می رسانند.

گونه های جنس *Gyrodinium* یک داینوفلاژله یوکاریوت و دارای زندگی آزاد هستند که به وسیله دوتاژک حرکت می کند و برخی گونه های آن تشکیل سیست می دهند. این جنس متعلق به شاخه *Dinophyta* رده *Dinophyceae* راسته *Gymnodinales* خانواده *Gymnodiniaceae* است که دارای ۱۰۵ گونه می باشد (Guiry & Guiry, 2020). *G. instriatum* یک داینوفلاژله برهنه و فاقد صفحات (unarmored) می باشد. سلول ها به وسیله شیار *girdle* یا *cingulum* به دو قسمت *epicone* و *hypocone* تقسیم می شوند و به آسانی کشت داده می شوند و سلول ها هم به صورت جنسی و هم غیرجنسی تکثیر می شوند (Nagasoe et al., 2006). گونه *G. instriatum* پراکنش وسیع داشته و در سراسر آب های جهان وجود دارد و در آب های ژاپن (Kojima & Kobayashi, 1992; Wang et al., 2001; Uchida et al., 1995; Matsuka, 1999; 1992), چین (Wang et al., 2001), تایوان (Su & Chiang, 1991), اکوادور (Jimenez, 1993), پرتغال (Silva, 1982) و همچنین در سواحل اقیانوس اطلس از جمله نیویورک، Maryland، Delaware، کارولینا شمالی و فلوریدا (Tomas et al., 2004) مشاهده شده است. برخی از محققان *G. instriatum* را به عنوان یک گونه مضر در نظر می گیرند (Matsuoka, 1999; Nagasoe et al., 2006; Uchida et al., 1995) اما برخی علیرغم فعالیت متوسط همولیتیک آن را بی ضرر می دانند (Biegala et al., 2002; Eschbach et al., 2001). این گونه در آب های ژاپن در خلیج Senzaki، منطقه جنوبی Harima Neda (Matsuoka, 1985)، دریاچه Hamana (Kojima & Kobayashi, 1992) و دریای Ariake و خلیج Hakata (Shikata et al., 2007) به عنوان یک گونه مضر گزارش شده است. تراکم آن در محیط های ساحلی مناطق معتدل مانند شمال کارولینا (North Carolina) می تواند به ۱۰۶ سلول در هر لیتر از آب برسد (Tomas et al., 2004). دریای عمان در جنوب شرق ایران قرار دارد و دارای شرایط آب و هوایی گرمسیری است و در معرض ورزش بادهای مانسون قرارداد و هر ساله بلوم های فیتوپلانکتونی از آن گزارش می شود (Attaran-Fariman, 2007). اگر چه در مورد فیلوژنی داینوفلاژله ها در دریای عمان و خلیج فارس تحقیقات اندکی وجود دارد (Attaran Fariman et al. 2007; Attaran Fariman & Jaid; Attaran Fariman & Bolch, 2012)، اما در خصوص گونه *G.*

دقیقه بود. محصول PCR به وسیله ژل آگارز ۱ درصد در الکتروفورز تعیین کیفیت و در دستگاه ژل داگ Viber Loumat مدل VX2 مشاهده گردید. بعد از خالص سازی به شرکت پیشگام جهت تعیین توالی ارسال گردید. ویرایش توالی به وسیله برنامه BioEdit انجام شد (Hall, 1999). شباهت توالی نوکلئوتیدی گونه مورد نظر در منطقه ژنی ITS با توالی 39 گونه از راسته Gymnodiniales در بانک اطلاعات ژن مقایسه شد و گونه *Alexandrium catenella* به عنوان گروه خارجی در درخت فیلوژنی جهت ریشه دار کردن استفاده شد. از نرم افزارهای BioEdit، Mega7 و Clustalw برای انجام آنالیز مولکولی و رسم درخت فیلوژنی استفاده گردید. برای بررسی فیلوژنی گونه از آنالیزهای Neighbor Joining (NJ) و Maximum Parsimony (MP) استفاده گردید (Felsenstic, 1985).

۳. نتایج و بحث

در آنالیز این نمونه آب که از سطح دریا با دمای ۲۹-۳۰ درجه سانتی‌گراد تهیه شده بود، شوری 35 psu ثبت شد. Gárate-Lizárraga و همکاران در سال ۲۰۱۳ اولین کشندسرخ *G. instriatum* را در Bahía De Acapulco, Guerrero گزارش دادند، تراکم سلول‌ها به $10^3 \times 2120 - 796$ رسید و متوسط دما ۲۴/۴ درجه سانتی‌گراد و شوری 33/13 psu بود. نرخ رشد بهینه برای این گونه در دماهای ۲۰-۳۰ درجه سانتی‌گراد و شوری ۳۵-۱۰ مشاهده شد (Nagaso et al., 2006). بررسی ویژگی‌های مورفولوژی، ایزوله خالص را در جنس *Gyrodinium* قرارداد. سلول‌ها به رنگ قهوه‌ای روشن است و طول ایزوله مورد نظر بین ۳۵-۵۵ و عرض آن بین ۲۵-۴۸ میکرومتر می‌باشد.

سلول‌ها معمولاً بیضی شکل هستند در وسط، نزدیک *cingulum* پهن‌تر (گسترده‌تر) است (شکل ۲B). گونه از لحاظ مورفولوژی بیشترین شباهت را به *G. instriatum* و همین‌طور تا حدود زیادی به گونه *Akashiwo sanguinea* دارد. لذا آنالیزهای مولکولی گونه خالص شده در چنین مواقعی در کنار مورفولوژی می‌تواند بسیار حائز اهمیت باشد.

در *G. instriatum*، ۲ نوع شیار طولی و عرضی وجود دارد و شیار عرضی سلول را به دو قسمت پایینی *hypotheca* و بالایی *epitheca* تقسیم کرده است. *epitheca* در apex دارای انتهای مسطح متصل است و معمولاً از رنگ‌دانه جدا نمی‌شود در حالی که

شد. نمونه آب بلافاصله به آزمایشگاه دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار انتقال داده شد. گونه مورد نظر به عنوان یک گونه جانبی از آب‌های منطقه بلوم کرده با فراوانی خیلی کم جدا شده است. مراحل خالص سازی گونه‌ها در شرایط آزمایشگاهی توسط روش رقیق سازی و همین‌طور تک سلولی بر اساس روش ارائه شده توسط Attaran-Fariman در سال ۲۰۰۷ انجام شد. ایزوله خالص حاصل در اتاق کشت در محیطی کاملاً استریل تحت شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، درجه حرارت $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ، نور ۲۰۰۰ لوکس در محیط کشت عمومی F_2 کشت داده شد. میزان شدت نور توسط دستگاه نورسنج مدل MS6612 (هنگ‌کنگ) تعیین گردید. بررسی‌های مورفولوژیکی توسط میکروسکوپ اینورت مدل Nikon-TF100 مجهز به دوربین صورت گرفت و اندازه سلول‌ها توسط لنز مجهز به میکرومتر اندازه گیری شد و نمونه‌های پلانکتونی با استفاده از ویژگی‌های مورفولوژیکی شامل اندازه سلول، شکل سلول و شکل کلروپلاست و منابع اینترنتی و کتاب‌های شناسایی در دسترس و مقالات مختلف شناسایی گردیدند (Attaran-Fariman, 2007; Dale, 1983; Husain, 2003). در نهایت برای شناسایی دقیق گونه از روش‌های مولکولی استفاده شد.

۱-۲ بررسی مولکولی

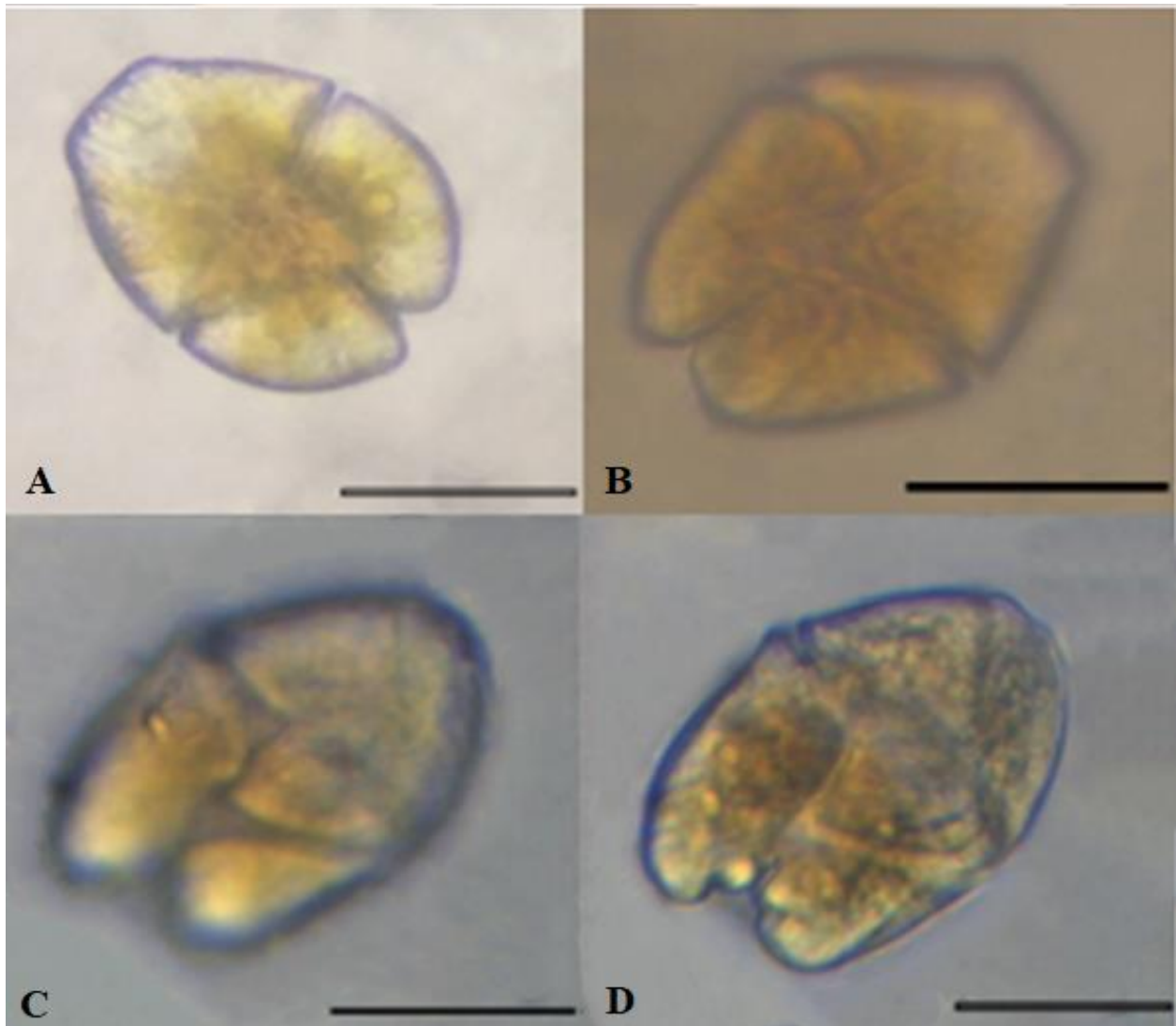
استخراج DNA نمونه با استفاده از روش CTAB انجام شد. بررسی کیفیت DNA استخراج شده بر روی ژل آگارز ۱٪ با استفاده از دستگاه الکتروفورز مدل PNP-1000d (ایران) و کمیت آن با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل RS232C (انگلیس) سنجیده شد. شناسایی مولکولی نمونه مورد نظر با استفاده از ژن ITS (قسمتی از ژن 1, 2 internal transcribe spacer و ژن کامل ITS۱، ۲) صورت گرفت. تکثیر ژن با استفاده از آغازگرهای ITSA و ITSB انجام شد. در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۵۰ میکرو لیتر، علاوه بر ۵ نانوگرم DNA استخراج شده، از PCR 10X بافر dNTP، Tag، Mgcl2، و از آغازگرهای ITSA (رفت) و ITSB (برگشت) استفاده شد. برنامه PCR استفاده شده شامل دمای تفکیک‌کننده اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، ۳۵ چرخه، دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه، دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و دمای گسترش نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴

حاضر، ۳۹ گونه متعلق به رده Gymnodinales که از لحاظ توالی نوکلئوتیدی بیشترین شباهت را به گونه مورد نظر داشت، انتخاب گردید. دو آنالیز فیلوژنی MP و NJ در شکل ۳ نشان داده شده است.

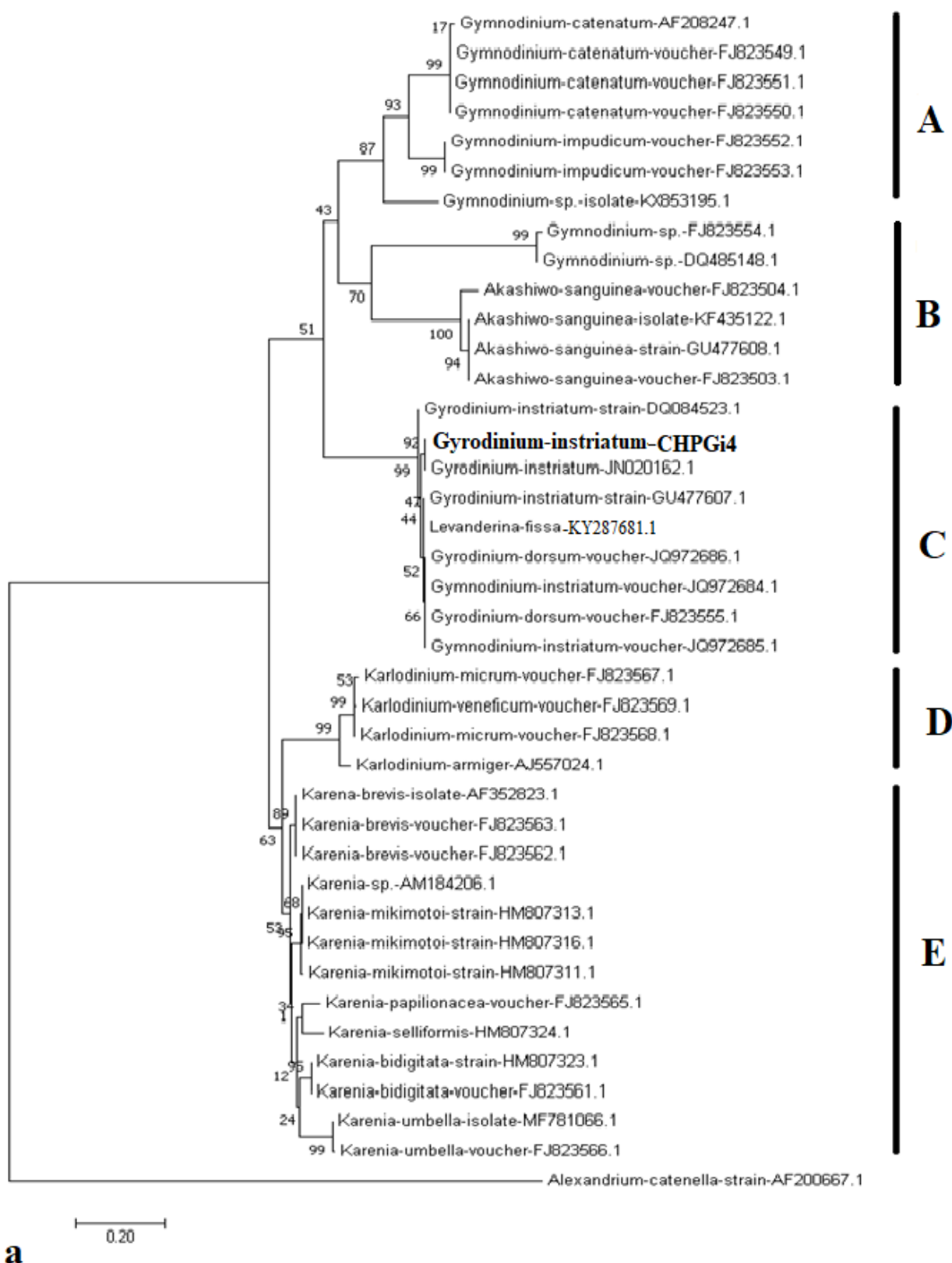
آنالیزهای مولکولی و درخت فیلوژنی گونه‌های موجود در راسته Gymnodinales نشان داد که گونه مورد نظر از ایران در کلاد C در درخت NJ قرار می‌گیرد و شامل *G. inusitatum*، *Gyrodinium dorsum*، *Gymnodinium instriatum* *Levanderina fissa* می‌باشد که این کلاد با ۹۳ درصد بوت استرپ حمایت می‌شود. درخت فیلوژنی حاضر دارای ۵ کلاد می‌باشد که کلادها در شکل ۳ مشخص شده‌اند.

hypotheca در antapex است و به وسیله شیار طولی به ۲ لوب تقسیم شده است (شکل ۲A). فلاژلا افقی در وسط سلول و در cingulum قرار دارد (شکل ۲B) و نیرویی که ایجاد می‌کند باعث چرخش یا حرکت مارپیچی می‌شود. فلاژلا عمودیدر شیار sulcus قرار می‌گیرد، شیار اپیکال با انتهای دیستال به محل اتصال شیار سینگلوم و سولکوس می‌رسد (شکل ۲C) و باعث هدایت سلول می‌شود و جهت را کنترل می‌کند (Coast & Park, 2002). این نوع داینوفلاژله دارای کلروپلاست های قهوه‌ای مایل به زرد و هسته بیضی شکل است.

G. instriatum در مطالعه حاضر به نام استرین CHPGi4 نام‌گذاری شده است. به منظور انجام آنالیز فیلوژنی در تحقیق



شکل ۲: گونه *Gyrodinium inusitatum*، جدا شده از دریای عمان، سواحل رمین، آبان سال ۱۳۹۶. (بزرگنمایی $\times 100$) نوار مقیاس = ۲۰ میکرومتر



شکل ۳: درخت فیلوژنی ۳۹ گونه از راسته Gymnodiniales همراه با گونه *Gyrodinium inusitatum* ایزوله CHPGi4 جداشده از دریای عمان بر اساس توالی ژنی Replication 1000 و Neighbor Joining با روش ITS

و *hypotheca* به دو قسمت نامتقارن تقسیم می‌شود. شیار عرضی یک سوم طول بدن را تشکیل می‌دهد و شیار طولی، نصف شیار عرضی می‌باشد. دارای هسته بیضی شکل و کلروپلاست های قهوه‌ای مایل به زرد است. ترکیبی از ویژگی‌های مورفولوژیکی و آنالیز فیلوژنی رده *Dinophyceae*، (Moestrup et al., 2014; Orlova et al., 2003) بامطالعه حاضر مطابقت دارد. *G. instriatum* می‌تواند در تنش‌های محیطی مختلف از جمله کمبود مواد غذایی زنده بماند چون می‌تواند به خوبی در طیف گسترده‌ای از درجه حرارت و شوری رشد کند (Nagaso et al., 2006). یکی از معیارهای مهم برای تشخیص جنس *Gyrodinium*، جابجایی *cingulum* می‌باشد که حدوداً بیشتر از $1/5$ طول سلول است *cingulum* در گونه *G. instriatum* حدود $1/3$ طول بدن در یک مارپیچ نزولی جابه‌جا شده است (Coast & Park, 2002). همچنین Coast و Park (2002) یکی دیگر از ویژگی‌ها برای شناسایی جنس *Gyrodinium* شیار نعل اسبی *apical* و مسطح بودن آن *apical* اشاره کردند که این شیار در بین گونه‌ها متفاوت است. شیار در ایزوله مطالعه حاضر مشخص نمی‌باشد لذا گونه اپیکال مسطح دارد. *G. instriatum* هم به صورت جنسی و هم غیرجنسی تولیدمثل می‌کند که باعث افزایش شانس موفقیت آن‌ها در محیط طبیعی و محیط کشت می‌شود.

Uchida و همکاران (1996) چرخه زندگی *G. instriatum* را مورد بررسی قرار دادند، این ارگانسیم *homothallic* است و پلانوزیگوت بعد از یک دوره ۶ روزه به دو سلول تقسیم می‌شود. در بررسی حاضر گونه در محیط کشت تکثیر نسبتاً آهسته‌ای در روزهای اول کشت داشت. مورفولوژی گونه مورد مطالعه در تحقیق حاضر از نظر شکل کلی سلول، داشتن دو لب در *hypotheca* محتویات کلروپلاست داخل سلول بسیار شبیه به گونه *Akashiwo sanguinea* می‌باشد اما در شیار اپیکال و تقریباً مسطح بودن اپیکس (*apex*) تفاوت دارند، همینطور جابجایی سینگرلوم که در گونه *A. sanguinea* کمتر می‌باشد. تنها براساس ویژگی‌های مورفولوژیکی تفکیک دو گونه مشکل است و ممکن است اشتباه تشخیص داده شوند، با آنالیز مولکولی تحقیق حاضر مشخص شد گونه‌ای که در آب‌های جنوب ایران حضور دارد گونه *G. instriatum* می‌باشد و گونه اولی در درخت فیلوژنی در کلاسه جداگانه‌ای (کلاسه C) قرار می‌گیرد (شکل ۳). از آنجایی که شناسایی گونه‌ها با استفاده از ویژگی‌های مورفولوژیکی کار بسیار

کلاسه A شامل *Gymnodinium spp* می‌باشد و با ۷۰ درصد بوت استرپ حمایت می‌شود. این کلاسه با کلاسه B رابطه مونوفایلی و با کلاسه C رابطه پلی فایلی دارد. کلاسه B شامل استرین‌های مختلف گونه *Akashiwo sanguinea* می‌باشد که با ۱۰۰ درصد بوت استرپ حمایت می‌شود. این کلاسه با کلاسه C رابطه پارافایلی دارد. کلاسه D شامل *Karlodinium spp* می‌باشد که دارای پشتیبانی ۱۰۰ درصد بوت استرپ است. این کلاسه با کلاسه C و E رابطه پلی فایلی دارد. کلاسه E شامل *Karenia spp* می‌باشد که با ۸۹ درصد بوت استرپ حمایت می‌شود. گونه مطالعه حاضر در کلاسه C قرار دارد و نزدیک‌ترین بستگان *G. instriatum* و گروه خواهر *Levanderina fissa* است. گونه *L. fissa* ابتدا توسط Levander در سال ۱۸۹۴ از آب‌های ساحلی جنوب فنلاند شناسایی شد و *Gymnodinium fissum* Levander نام گرفت. در سال ۱۹۲۱ به دلیل جابجایی *cingulum* بیش از یک پنجم طول سلول، توسط Kofoid & Swezy جنس *Gyrodinium* منتقل شد و Freudenthal & Lee در سال ۱۹۶۳ بر شباهت شدید آن به *G. instriatum* تاکید کردند اما ساختار شیار اپیکال، پوشش هسته و آنالیزهای مولکولی سبب شد تا Moestrup و همکاران در سال ۲۰۱۴ گونه جدیدی به نام *L. fissa* را گزارش دهند.

طبق مطالعه Huang و Dong در سال ۲۰۰۰، برخی از گونه‌های *Gymnodiniaceae* به خصوص *Gymnodinium* عامل شکوفایی‌های مضر در سراسر جهان هستند و برخی از مطالعات نشان دادند که داینوفلاژله *G. instriatum* عامل شکوفایی مضر ساحل اقیانوس اطلس در ژاپن و ساحل اکوادور است (Toriumi, 1990; Jimenez, 1993). *G. instriatum* یک داینوفلاژله فتوتروف، بدون صفحه^۱ با دو فلاژله جانبی است که ابتدا توسط Freudenthal و Lee در سال ۱۹۶۳ معرفی شد. سلول‌ها به شکل کروی یا تخم‌مرغی و به رنگ قهوه‌ای کم‌رنگ است. طول سلول‌ها بین ۶۶-۲۹ میکرومتر و عرض آن‌ها بین ۴۶-۲۶ میکرومتر گزارش شده است (Freudenthal & Lee, 1963; Handy et al., 2008). در حالی که در مطالعه حاضر طول ایزوله مورد نظر بین ۵۵-۳۵ و عرض آن بین ۴۸-۲۵ میکرومتر می‌باشد. Orlova و همکاران در سال ۲۰۰۳ بیان کردند که طول سلول‌های بیضی شکل *G. instriatum* بین ۲۴-۵۶ میکرومتر است

¹ unarmored

- resting stages from recent sediment of south East coast of Iran, PhD thesis, University of Tasmania, Australia, 350 pp.
- Attaran-Fariman G, Javid P., 2013. The phylogeny of *Heterocapsa* sp.(Dinophyceae) isolated from the south coast of Iran during a *Cochlodinium polykrikoides* bloom Turk J Bot 37:778. <https://doi.org/10.3906/bot-1206-40>.
- Attaran-Fariman G, Bolch CJ., 2012. Morphology and Phylogeny of *Scrippsiella trochoidea* (Dinophyceae) A Potentially Harmful Bloom Forming Species Isolated From The Sediments of Iran's South Coast Iranian Journal of Fisheries Sciences 11:252-270
- Biegala, I.C., Kennaway, G., Alverca, E., Lennon, J., Vault, D. & Simon, N., 2002, Identification of bacteria associated with dinoflagellates (Dinophyceae) *Alexandrium* spp. using tyramide signal amplification-fluorescent in situ hybridization and confocal microscopy, Journal of Phycology 38:404-411. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2002.01045.x>
- Chikwililwa, C.; McCarron, P.; Waniek, J.J.; Schulz-Bull, D.E., 2019. Phylogenetic analysis and yessotoxin profiles of *Gonyaulax spinifera* cultures from the Benguela Current upwelling system. Harmful algae.85: 101626. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.101626>
- Coats, D.W. & Park, M.G., 2002, Parasitism of photosynthetic dinoflagellates by three strains of *Amoebophrya* (Dinophyta): parasite survival, infectivity, generation time, and host specificity, Journal of Phycology 38:520-528.1
- Dale, B., 1983, Dinoflagellate resting cyst: benthic plankton in (G.A. Gryxell, ed.) Survival strategies of the algae University press, Cambridge.
- Eschbach, E., Scharsack, J.P., John, U. & Medlin, L.K., 2001, Improved erythrocyte lysis assay in microtitre plates for sensitive detection and efficient measurement of haemolytic compounds from ichthyotoxic algae, دشواری است بنابراین جهت یافتن روابط بین تاکسون‌ها در داینوفلاژله‌ها، از تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک بر اساس توالی ژنی استفاده می‌شود (Attaran-Fariman, 2007).
- #### ۴. نتیجه‌گیری
- در این مطالعه گونه جانبی در هنگام بلوم پلانکتونی سرخ *G. polygramma* جدا سازی و خالص شد و توالی ژنی آن در منطقه ژنی ITS با توالی ۳۹ گونه متعلق به راسته *Gymnodiniales* مورد بررسی قرار گرفت. بررسی فیلوژنتیکی گونه جدا شده از آبهای ایران نشان داد ایزوله ایرانی از نزدیک‌ترین بستگان *G. instriatum* و با 9۹ درصد بوت استرپ حمایت می‌شود و گروه خواهری *Levanderina fissa* است و در بانک ژن (GenBank) با شماره MT160342 ثبت شد. از نظر ویژگی‌های مورفولوژیکی هم گونه بیشترین شباهت را به گونه *G. instriatum* داشت به طوریکه سلول‌ها به رنگ قهوه‌ای روشن بیضی‌شکل، سلول‌ها در وسط، نزدیک *cingulum* پهن‌تر (گسترده‌تر) است. مشخصه بارز این گونه اینکه شیار اپیکال با انتهای دیستال به محل اتصال شیار سینگلوم و سولکوس می‌رسد. این گونه جزء گونه‌های مضر می‌باشد. در نهایت نتایج آنالیز مولکولی به شناسایی و طبقه‌بندی داینوفلاژله‌ها کمک خواهد کرد و ما را در پیشبرد اهداف زیست‌محیطی یاری می‌نماید.
- #### ۵. سپاسگزاری
- از کارشناسان آزمایشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار که در زمان انجام کار کمک نمودند کمال تشکر و قدردانی را دارم.
- #### منابع
- Alverca, E.; Biegala, I.C.; Kennaway, G.M.; Lewis, J. & Franca, S., 2002. In situ identification and localization of bacteria associated with *Gyrodinium instriatum* (Gymnodiniales, Dinophyceae) by electron and confocal microscopy. European Journal of Phycology, 37: 523-530. <https://doi.org/10.1017/S0967026202003955>
- Attaran-Fariman, G., 2007. Dinoflagellater and *Chatonella*

- Kim, K.Y.; Kim, C.H., 2007. Phylogenetic relationships among diverse dinoflagellate species occurring in coastal waters off Korea inferred from large subunit ribosomal DNA sequence data. *Algae*.22(2): 57-67. <https://doi.org/10.4490/ALGAE.2007.22.2.057>
- Kojima, N. and Kobayashi, S., 1992, Motile cell-like cyst of *Gyrodinium instriatum* Freudenthal et Lee (Dinophyceae). *Rev. Palaeobot. Palynol.*, 74, 239–247. [https://doi.org/10.1016/0034-6667\(92\)90009-6](https://doi.org/10.1016/0034-6667(92)90009-6)
- Matsuoka, K., 1999, Eutrophication Process Recorded in Dinoflagellate Cyst Assemblages—A Case of Yokohama Port, Tokyo Bay, Japan, *Sci, Total Environ.*, 23, 17–35. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(99\)00087-X](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00087-X)
- Matsuoka, K., 1985, Archeopyle structure in modern gymnodinialean dinoflagellate cysts, *Review of Palaeobotany and Palynology* 44: 217-231. [https://doi.org/10.1016/0034-6667\(85\)90017-X](https://doi.org/10.1016/0034-6667(85)90017-X)
- Moestrup, Q, Hakanen, P, Hansen. G, Daugbjerg, N, and Ellegaard, M., 2014, *OnLevanderina fissa* gen.&comb. nov. (Dinophyceae) (*syn. Gymnodinium fissum, Gyrodinium instriatum, Gyr. uncatenum*), a dinoflagellate with a very unusual sulcus, *Phycologia* Volume 53 (3), 265–292. <https://doi.org/10.2216/13-254.1>
- Nagasoe, S., Kim, D.I., Shimasaki, Y., Oshima, Y., Yamaguchi, M. & Honjo, T., 2006, Effects of temperature, salinity and irradiance on the growth of the red tide dinoflagellates *Gyrodinium instriatum* Freudenthal et Lee, *Harmful Algae*, 5: 20–25. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2005.06.001>
- Shao, P. Chen, Y.Q. Zhou, H. Yuan, J. Qu, L.H. Zhao, D. Lin, Y.SH., 2004, Genetic variability in Gymnodiniaceae ITS regions: implications for species identification and phylogenetic analysis, *Marine Biology*, 144: 215–224. <https://doi.org/10.1007/s00227-003-1157-x>
- Journal of Applied Toxicology 21:513-519. <https://doi.org/10.1002/jat.797>
- Freudenthal, H.D. and Lee, J.J., 1963, *Glenodinium Halli* n. sp. and *Gyrodinium instriatum* n. sp., Dinoflagellates from New York Waters, *J. Protozool.*, 10(2), 182–189. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1963.tb01659.x>
- Gárate-Lizárraga, I.; Sevilla-Torres, G.; Álvarez-Añorve, M.; Aguirre-Bahena, F.; Violante-González, J.; Rojas-Herrera, A., 2013. First Record of a red tide caused by *Gyrodinium instriatum* (Dinophyceae: Gymnodiniales) in Bahía de Acapulco, Guerrero. *Cicimar Oceanides*.28(1): 43-47
- Guiry, M.D.; Guiry, G.M., 2020. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 07 June 2020
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Research, Symposium Series*,41: 95–98
- Handy, S.M., Demir, E., Hutchins, D.A., Portune, K.J., Whereat, E.B., Hare, C.E., Rose, J.M., Warner, M., Farestad, M., Cary, S.C. & Coyne, K.J., 2008, Using quantitative realtime PCR to study competition and community dynamics among Delaware Inland Bays harmful algae in field and laboratory studies, *Harmful Algae* 7:599-613. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2007.12.018>
- Husain, M., 2003, The ecology and taxonomy of marine phytoplankton of Kuwait with particular emphasis on harmful algae species, PhD thesis University of West Minster. London.
- Jimenez, R., 1993, Ecological factors related to *Gyrodinium instriatum* bloom in the inner estuary of the Gulf of Guayaquil, 257–262, In: Smayda, T.J. & Y. Shimizu (Eds.) *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*. Elsevier, New York.

- 00088-X
- Wang, Z., Qi, Y., Yin, Y., Jiang, T., & Xie, L., 2001, Studies on the cause and the occurrence reasons of a *Gyrodinium instriatum* red tide in Shenzhen Bay in spring of 1998. *Marine Science*, 25(5):47–50.
- Wang, Y., Yu, Z., Song, X., Zhang, Sh., 2006, Interaction between the bloom-forming dinoflagellates *Prorocentrum donghaiense* and *Alexandrium Tamarense* in laboratory cultures, *Journal of sea Research* 56 (1), 17-26. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2006.04.002>
- Xu, F.L., Yang, B., Yang, C., Shuang, H.Q., Kong, X.Z., Wang, Q.M., Ouyang, H.L., Qin, N., Liu, W.X., He, W., Jiang, Y.J., 2014, The seasonal and spatial variations of phytoplankton community and their correlation with environmental factors in a large eutrophic Chinese lake (Lake Chaohu), *Ecological Indicators*. 40: 58–67. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2014.01.006>
- Zadabbas Shahabadi, Z. Attaran Fariman G. Farahmand, H., 2011, *Gyrodinium instriatum* internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JN020162>.
- Yamasaki, Y., Nagasoe, S., Matsubara, T., Shikata, T., Shimasaki, Y., Oshima, Y., Honjo, T., 2007, Growth inhibition and formation of morphologically abnormal cells of *Akashiwo sanguinea* (Hirasaka) 32. G. Hansen et Moestrup by cell contact with *Cochlodinium polykrikoides* Margalef, *Marine Biology* 152 (1), 157-163. <https://doi.org/10.1007/s00227-007-0671-7>
- Shikata, T., Nagasoe, S., Matsubara, T., Yamasaki, Y., Shimasaki, Y., Oshima, Y., and Honjo, T., 2007, Effects of temperature and light on cyst germination and germinated cell survival of the noxious raphidophyte *Heterosigma akashiwo*, *Harmful Algae*, 6, 700–706. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2007.02.008>
- Silva, E.S. & Franca, S., 1985, The association dinoflagellate-bacteria: their ultrastructural relationship in two species of dinoflagellates, *Protistologica* 21:429-446.
- Silva, E.S., 1982, Relationship between dinoflagellates and intracellular bacteria. In: Hoppe HA, Levring T (eds) *Marine Algae in Pharmaceutical Science*. 2. Walter de Gruyter, Berlin, pp 269–288. <https://doi.org/10.1515/9783110837506-015>
- Su, H.M. & Chiang, Y.M., 1991, Dinoflagellates collected from aquaculture ponds in Southern Taiwan, *Japanese Journal of Phycology* 39:227-238.
- Tomas, C.R., Zimmermann, L.A & Smith, M.D., 2004, *Gyrodinium instriatum*. North Carolina Sea Grant, Marine Phytoplankton Identification Series. UNC-SG-00-0X.
- Uchida, T., Matsuyama, Y., Yamaguchi, M and Honjo, T., 1996, The life cycle of *Gyrodinium instriatum* (Dinophyceae) in culture, *Phycol. Res.*, 44, 119–123. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1835.1996.tb00040.x>
- Uchida, T., Toda, S., Matsuyama, Y., Yamaguchi, Y., Honjo, T., 1999, Interactions between the red tide dinoflagellates *Heterocapsa circularisquama* and *Gymnodinium mikimotoi* in laboratory culture, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 241, 285–299. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(99](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(99)