وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

عنوان :

بررسی تنوع جنسیتی جمعیت های مختلف جلبک قرمز *Gracilaria corticata* در نسل های ایزومورفیک در آبهای خلیج فارس و دریای عمان

مجری :
سید عباس طالب زاده

شماره ثبت
۴۶۵۳۹

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

عنوان پروژه : بررسی تنوع جنسیتی جمعیت های مختلف جلبک قرمز *Gracilaria corticata* در نسل های ایزومورفیک درآبهای خلیج فارس و دریای عمان
شماره مصوب پروژه : ۹۲۱۰۳-۱۲-۱۲-۲
نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : سید عباس طالب زاده
نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) : -
نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : سید عباس طالب زاده
نام و نام خانوادگی همکار(ان) : سید محسن حسام زاده حجازی، یزدان مرادی، احمد غرقی ، تورج ولی نسب ، سهراب رضوانی، حسین رامشی،بیژن آژنگ،ایرج رجبی،کیومرث روحانی، عیسی کمالی،یوسف آفتاب سوار، سوسن شاهرخی،فرزین شیخ حسنی
نام و نام خانوادگی مشاور(ان) : -
نام و نام خانوادگی ناظر(ان) : -
محل اجرا : استان تهران
تاریخ شروع : ۹۲/۱/۱
مدت اجرا :۱ سال و ۶ ماه
ناشر : موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور
تاریخ انتشار : سال۱۳۹۵
حق چاپ برای مؤلف محفوظ است . نقل مطالب ، تصاویر ، جداول ، منحنی ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است .

«سوابق طرح یا پروژه و مجری مسئول / مجری»

پروژه : بررسی تنوع جنسیتی جمعیت های مختلف جلبک قرمز *Gracilaria corticata* در نسل های ایزومورفیک درآبهای خلیج فارس و دریای عمان

کد مصوب : ۹۲۱۰۳-۱۲-۱۲-۲

شماره ثبت (فروست) : ۴۶۵۳۹ تاریخ : ۹۳/۱۱/۱۱

با مسئولیت اجرایی جناب آقای سید عباس طالب زاده دارای مدرک تحصیلی کارشناسی ارشد در رشته مهندسی کشاورزی (بیوتکنولوژی کشاورزی) می‌باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش زیست فنآوری و فرآوری آبزیان در تاریخ ۹۳/۱۰/۲۰ مورد ارزیابی و رتبه عالی تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد ■ پژوهشکده □ مرکز □ ایستگاه □

با سمت کارشناس در موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور مشغول بوده است.

عنوان	« فهرست مندرجات »	صفحه

چکیده ۱
۱- مقدمه ۳
۱-۱- مروری بر منابع با تاکید بر نتایج آنها ۵
۱-۲- بیولوژی گراسیلاریا ۸
۱-۳- اثر فاکتورهای محیطی بر رشد گیاه گراسیلاریا ۱۳
۱-۴- عوامل موثر در تمایز مراحل جنسی ۱۵
۱-۵- اپی‌فیت ۱۵
۱-۶- بررسی های مولکولی ۱۵
۲- مواد و روشها ۲۵
۲-۱- منطقه مورد بررسی ۲۵
۲-۲- روش نمونه‌برداری ۲۷
۲-۳- روش آماری ۲۷
۲-۴- روش تحقیق آزمایشگاهی ۲۸
۲-۵- کنترل کمی و کیفی DNA ۳۴
۲-۶- رقیق سازی و همسان سازی غلظت DNA ۳۶
۲-۷-واکنش زنجیره ای پلیمراز ۳۶
۲-۸-کنترل کیفی محصول واکنش زنجیره پلی مراز ۴۰
۲-۹-امتیازدهی نوارها ۴۱
۲-۱۰-روش های آماری برای تجزیه و تحلیل داده ها ۴۱
۲-۱۱-روش های محاسبه شباهت یا فاصله در مارکرهای مولکولی ۴۲
۲-۱۲-تجزیه واریانس مولکولی ۴۳
۲-۱۳-تجزیه خوشه ای ۴۴
۲-۱۴-تجزیه به مولفه های اصلی ۴۵
۲-۱۵-معیار های محتوای اطلاعات نشانگرها ۴۵

عنوان	« فهرست مندرجات »	صفحه

۲-۱۶-خلاصه محاسبات آماری انجام شده در این پروژه ۴۷
۲-۱۷-نرم افزارهای مورد استفاده برای تجزیه و تحلیل داده ها ۴۷
۳- نتایج ۴۸
۳-۱- بررسی نتایج ریخت شناسی و آناتومی ۴۸
۳-۲- نتایج حاصل از استخراج و جدا سازی DNA ۵۱
۳-۳- نتایج محصولات PCR تحت آغازگر های ISSR ۵۵
۳-۴- تخمین سطح تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR ۶۴
۳-۵- تجزیه واریانس مولکولی ۶۸
۳-۶- برآورد تنوع ژنتیکی بین جمعیت های جلبک مورد مطالعه ۶۹
۳-۷- برآورد فاصله و شباهت ژنتیکی بین جمعیت های جلبک قرمز *G. corticata* ۷۰
۳-۸- تجزیه خوشه ای حاصل از داده های ISSR به روش وارد ۷۰
۳-۹- تحلیل داده ها بر اساس تجزیه به مولفه های اصلی ۷۲
۴- بحث و نتیجه گیری ۷۴
۴-۱- تفسیر داده های ریخت شناسی و آناتومی ۷۴
۴-۲- تفسیر داده های استخراج و جدا سازی DNA ۷۶
۴-۳- تفسیر داده های مولکولی ISSR ۷۸
پیشنهادها ۸۶
منابع ۸۸
پیوست ۹۳
چکیده انگلیسی ۱۲۳

چکیده

جلبک قرمز از نظر غذایی ، دارویی و صنعتی حائز اهمیت می باشد وتولید آگار مهمترین ویژگی آنها محسوب می شود. کیفیت آگار استحصالی به گونه ، زمان و تناوب نسل ایزومورفیک آنها بستگی دارد . به منظور بررسی تمایز جنسیتی جلبک قرمز *G. corticata* ، ۴۱ نمونه از این گونه مورد مطالعه مولکولی واقع گردید. نمونه های جلبک از سواحل صخره ای بستانه (E ´ ۳۸ °۵۴ ´N، ۳۰ °۲۶) و لیپار (E ´ ۴۹ °۶۰ ´N،۱۵ °۲۵) جمع آوری شد. نمونه ها به منظور مشاهده مراحل مختلف زندگی در محیط کشت PES پرورش یافت. ساختار آناتومی و تشریحی ریسه های رویشی و زایشی گیاه مورد بررسی قرار گرفت. تترا اسپوروفیت دیپلوئید ، اسپرماتانژها در ریسه های گامتوفیت گیاه نر و کارپوسپوروفیت و سیستوکارپ گامتوفیت گیاه ماده مشخص گردید. جهت استخراج DNA ، انگل و اپی فیت ها از سطح ریسه ها پاک ، و بافت های مطلوب و بخش های در حال رشد با استفاده از نیتروژن مایع خرد و سائیده شد. پس از استخراج DNA با استفاده از ۲۰ پرایمر مختلف بر اساس نشانگر مولکولی ISSR تنوع جنسیتی و ژنتیکی این جمعیت ها بررسی گردید و با توجه به قابلیت پرایمرها در نشان دادن پلی مورفیسمی در نهایت از چهار پرایمر استفاده شد. نتایج حاصل بر اساس نرم افزارهای GenAlex و PopGen مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت . در کل تعداد ۷۵ نوار تکثیر شد که تمام نوارها پلی مورفیسم بودند. بنابر این درصد چند شکلی توسط تمام آغازگرها ۱۰۰ ٪ بود. بر اساس شاخص PIC درصد تفکیک پلی مورفیسم پرایمر C (۰/۳۳) نسبت به سایر پرایمر ها بیشتر بود که نشان دهنده بالاتر بودن قدرت تفکیک بیشتر این پرایمر نسبت به سایر پرایمرها می باشد. شاخص نشانگری بین ۴/۴۸ تا ۶/۵۱ و میانگین شاخص شانون نیز ۰/۴۶ برآورد گردید. نتایج بررسی ها نشان می دهد که شباهت ژنتیکی جمعیت این جلبک در مناطق بستانه و لیپار ، ۹۶ ٪ بود . تنوع ژنتیکی بین و درون جمعیت ها اختلاف معنی داری داشت بطوری که ۸۳ ٪ از تنوع کل ، مربوط به تنوع درون جمعیت ها و ۱۷ ٪ مربوط به تنوع بین جمعیت ها می باشد که درصد بالایی از تنوع کل ، مربوط به تنوع درون جمعیت ها است . بیشترین فاصله ژنتیکی مربوط به نمونه های ۵ و۳۵ به ترتیب متعلق به مناطق بستانه و لیپار می باشند و این امر بیانگر وجود تنوع بین جمعیتی علاوه بر تنوع بالای درون جمعیتی می باشد. بنابر این می توان این جمعیت ها را در صورت منطبق بودن صفات مورد اصلاح به عنوان والد در برنامه های دو رگ گیری برای اصلاح گونه ها و بدست آوردن حداکثر هتروزیس در جهت سازگاری با شرایط محیطی استفاده نمود.در تجزیه خوشه ای ward ، با برش دندروگرام در فاصله متریک ۱۲/۱۸ فازهای ایزومورفیک در ۵ دسته از یکدیگر تفکیک شدند. آنالیز PCA به عنوان روش مکمل نتایج حاصل از تجزیه خوشه ای را تایید نمود. در این بررسی آغازگرهای ISSR توانستند گامتوفیت های نر و ماده و تتراسپوروفیت های دیپلوییید را ازهم تشخیص دهند بطوریکه پرایمر A دو باند ۱۲۰۰ و bp ۱۷۰۰ ویژه تتراسپوروفیت دیپلوئید و باند bp ۳۰۰ ویژه نر ایجادکرد. پرایمر C دو باند ۸۲۰ و bp ۹۰۰ ویژه تتراسپوروفیت ها ی دیپلوئید و باند bp ۵۰۰ نیز ویژه گامتوفیت ماده ایجاد کرد. پرایمر AB باند bp ۹۹۰ ویژه نر و قطعه bp ۵۲۰ ویژه ماده و باندهای ۱۶۰۰ و bp ۱۹۰۰ ویژه تتراسپوروفیت

ایجاد کرد . پرایمر ABC قطعه bp ۱۱۰۰ ویژه نر و قطعه bp ۵۰۰ ویژه ماده و تتراسپوروفیت ها ی دیپلوئید دو باند ۱۲۰۰ و bp ۱۵۰۰تولید کرد .

واژه‌های کلیدی:

تنوع جنسیتی ، ISSR، جلبک قرمز ، *Gracilaria corticata* ، خلیج فارس ، دریای عمان

۱- مقدمه

جلبک ها توسط انسان در طی صد ها سال به عنوان غذا ،غذای دام ، دارو و کود استفاده می شود. اسناد گذشته نشان می دهد که ماکرو جلبک ها توسط بشر از ۵۰۰ سال قبل از میلاد در چین و هزار سال بعد در اروپا جمع آوری می شده است. مهاجرت انسانها از کشورهایی مانند چین ، ژاپن و کره و همچنین اندونزی و مالزی که جلبک ها توسط آنها به عنوان غذا مصرف می شد به سایر نقاط، مصرف آن را ترویج نموده بطوریکه امروزه در اغلب کشورهای سراسر دنیا حتی در اروپا مصرف می گردد. در شرق و غرب سواحل ایالات متحده و کانادا ،اطراف ماین[1]، نیو برانس ویک[2]، نوا اسکوشیا[3] و بریتیش کلومبیا[4]، شرکت هایی کشت و پرورش ساحلی ماکروجلبک ها را بویژه برای مصرف انسانی در مخازن آغاز کردند و بازار آنها هم با مصرف داخلی در کشورهای فوق و هم با صادرات محصول به کشورهای ژاپن رونق یافت . (Barsanti *et al.,* 2006). ایرلند و ایرلند شمالی مصرف ماکروجلبک ها که در گذشته بطور سنتی در برنامه غذایی آنها بود را تجدید کردند.علاوه بر مصرف غذایی ، استخراج آگار و کاراژین از ماکروجلبک های قرمز و آلژینات از ماکرو جلبک های قهوه ای مورد توجه قرار گرفت.بهره برداری جهانی از ماکرو جلبک ها رو به افزایش است و با توجه به برداشت سالیانه توده زنده از آن ، ماکرو جلبک ها از جمله مهمترین موجودات دریایی پرورشی محسوب می شوند.(Barsanti *et al.,* 2006). اگر چه سابقه مطالعه در زمینه شناسایی جلبکهای دریایی در سواحل جنوبی ایران به سال ۱۸۴۵ میلادی بر می گردد ولی تا کنون در این فعالیت ها کمتر به جنبه های تنوع ژنتیکی توجه شده است. طی تحقیقات انجام شده بیش از ۲۵۰ گونه جلبکی در سواحل جنوب کشور شناسایی شده، که بسیاری از گونه ها دارای خواص کاربردی بوده و در سطح جهانی از آنها استفاده می شود (سهرابی پور و ربیعی، ۱۳۸۴).

در کشور ما در سال های اخیر، کشت انبوه جلبکهای دریایی مورد توجه قرار گرفته است. با توجه به تحقیقات انجام شده در زمینه شناسایی و کاربرد جلبک های سواحل جنوبی کشور و با توجه به اثرات متعددی که استفاده از جلبکها دارند، لزوم توجه هر چه بیشتر به شناخت این ذخایر و قابلیت های کاربردی آنها مشخص شده و لازم است در مورد اثرات گونه های جلبکی سواحل جنوب کشور تحقیقات لازم صورت گرفته تا بر اساس آن بتوان به نحو مطلوب بهره برداری بهینه را از این منابع طبیعی ملی انجام داد(سهرابی پور و ربیعی، ۱۳۸۴)

طی مطالعاتی در مجموع ۱۵۰ گونه جلبکی در آبهای خلیج فارس و دریای عمان شنا سایی گردید که شامل ۳۹ گونه جلبک سبز(۳ راسته،۷ خانواده و ۱۳ جنس)،۴۰ گونه جلبک قهوه ای (شامل ۴ راسته ، ۶ خانواده و ۱۶ جنس) و ۷۱ گونه جلبک قرمز (شامل ۸ راسته ،۱۹ خانواده و ۳۱ جنس) می باشد که جنس *Gracilaria* از راسته Gracilariales و خانواده Gracilariaceae شامل *G. arcuata*، *G. corticata*، *G. folifera*، *G. gracilis*، *G. millardeti* ،

[1] . Maine
[2] . New Brunswick
[3] . Nova Scotia
[4] . British Columbia

G. pygmaea،*G. spinulosa* ، *G. textorii* در آبهای خلیج فارس و دریای عمان شناسایی شده اند(قرنجیک و روحانی، ۱۳۸۹) .

جلبک های قرمز از نظر غذایی ، دارویی و صنعتی حائز اهمیت می باشند (Barsanti and Gualtieri, 2006) و تولید آگار مهمترین ویژگی آنها محسوب می گردد (Winchester, 1969) . کیفیت آگار گراسیلاریا به گونه مورد بررسی ، زمان جمع آوری نمونه ، محیط رشد (Yee, 1999)، تناوب نسل ایزومورفیک و جنسیت آنها بستگی دارد بطوریکه میزان آگار استخراجی در گونه *Gracilaria verrucosa* به ترتیب از زیاد به کم در اشکال سیستوکارپ[5]، تتراسپوروفیت[6] و گامتوفیت نر مشاهده می شود(Whyte *et al.,* 1981) و در گونه *Gracilaria dura* تتراسپوروفیت ها کیفیت برتری از آگارز نسبت به گامتوفیت ها نشان داده است (Gupta *et al.,* 2011). همچنین در برنامه حفظ ژنتیکی و اصلاح نباتات ،دانش ارتباط ژنوتیپ و تنوع ژنتیکی برای موفقیت برنامه های اصلاحی دارای اهمیت می باشد. از طرفی استفاده تجاری از این جلبک دریایی و توسعه کشت آن نیازمند شناسایی صحیح و دانش چرخه زیستی آن می باشد و بلحاظ اهمیت تشخیص تمایز جنسیتی در مراحل زندگی در امر تکثیر و پرورش، تجزیه و تحلیل ساختار جنسیتی این گونه ضروری است (Törjék *et al*., 2002). با توجه به اینکه در حال حاضر هیچ روش قابل اعتمادی برای افتراق جلبک های تتراسپوروفیت ،گامتوفیت های نر و ماده جنس *G.corticata* وجود ندارد بکارگیری مارکر ISSR در تمایز جنسی مراحل زندگی ابتدایی این گونه در برنامه های پرورش و با کاربرد در امر تکثیر می تواند سودمند باشد.

محدودیت های صفات مورفولوژیک در سیستم های رده بندی گونه های مشابه بیانگر نقش مهم مارکرهای ژنتیکی در مطالعات سیستماتیک گونه های جلبکی می باشد. روش های جدید در بیولوژی مولکولی نه تنها درک عمیق ما از دانش چرخه حیات ، ژنتیک جمعیت ، جغرافیای زیستی و فیلوژنتیک جلبک را فراهم می کند(Olsen,1990)، بلکه به رفع ابهامات ارتباطات تکاملی و فیلوژنتیکی کمک می کند.بعلاوه ارتباطات بین موجودات از جمله جلبک های دریایی با بکارگیری آنالیز DNA و توسعه روش های جدید در بیولوژی مولکولی و بیوشیمی آشکارتر می گردد.بطوریکه اسید داکسی ریبونوکلئوتید، هسته ،پلاستید و میتوکندری از منابع با ارزش و ضروری خصوصیات رده بندی در آنالیز فیلوژنتیکی می باشند (Yee, 1999). مهندسی ژنتیک و دستکاری در ژنها می تواند به اصلاح صفات جلبک ها توسط تغییر در ساختار ژنتیکی آنها منجر شود و از این رو علاوه بر استفاده اقتصادی از منابع جلبک های دریایی با توسعه کشت جلبک [7] و فرایند های صنعتی ، محصولات جلبکی را افزایش می دهد (Tseng,1984).

در این گزارش برای اولین بار به بررسی تنوع جنسیتی بین افراد درون جمعیت های این جلبک در سواحل خلیج فارس و دریای عمان پرداخته شده است. بدین منظور جمع آوری نمونه ها ی *G. corticata* از مناطق بین

---

5. cystocarp
6. tetrasporophyte
7. phycoculture

جزر و مدی صخره ای سواحل خلیج فارس (سواحل بستانه از توابع بندر لنگه در استان هرمزگان) و سواحل دریای عمان(سواحل لیپار از استان سیستان و بلوچستان) طی فصول بهار و تابستان ۱۳۹۲انجام گردید وعملیات آزمایشگاهی در آزمایشگاه ژنتیک موسسه تحقیقات جنگل ها و مراتع کشور اجرا شد.

هدف کلی از مطالعه حاضر تجزیه و تحلیل ساختار ژنتیکی جمعیت *G.corticata* و ارزیابی نشانگرهای ISSR در تشخیص جنسیت این گونه است که این امر با هدف تشخیص تنوع جنسیتی برای کاربرد در امر تکثیر می باشد از این رو اهداف این مطالعه عبارتند از:

- تشخیص تنوع جنسیتی با استفاده از مارکر مولکولی ISSR
- تجزیه و تحلیل ساختار ژنتیکی بین و درون جمعیت های آگاروفیت *G.corticata*
- ارزیابی نشانگرهای ISSR ویژه تشخیص مراحل مختلف زندگی در گامتوفیت های نر و ماده و تتراسپوروفیت.
- برسی تنوع ژنتیکی بین و درون جمعیت های مختلف *G.corticata*

۱-۱- مروری بر منابع با تاکید بر نتایج آنها

۱-۱-۱- جلبک قرمز

جلبک ها از تالوفیتهای کلروفیل دارند. در تقسیمات جهان گیاهی جلبک ها دارای ۱۸۰۰ جنس و ۲۱۰۰ گونه و اکثراً آبزی بوده و همه آنها دارای کلروفیل می باشد. برخی از گروه ها همراه با انواع کلروفیل دارای پیگمانهای دیگری مانند کاروتنوئید(کاروتن –گزانتوفیل) فیکوسیانین و فیکواریترین هستند(قهرمان،۱۳۸۹).

جلبک های قرمز علاوه بر کلروفیل حاوی رنگدانه های قرمز بوده و غالباً به رنگ قرمز می باشند. تقریبا همه آنها در زیستگاه های دریایی ماوا دارند.بسیاری ازجنس ها در این شاخه اشکال زیبایی با شاخه های ظریف پر مانندی دارند.جلبک قرمز از اهمیت اقتصادی قابل توجهی برخوردار است. (Winchester, 1969)

جلبک های قرمز به علت داشتن ذخیره غذایی، مورد تغذیه ماهیها ،تغذیه دام و عده معدودی نیز مورد استفاده غذای انسان قرار می گیرند(قهرمان،۱۳۸۹).این رده ها از نظر رنگدانه های فتوسنتز کننده،دیواره سلولی و اندوخته غذایی با یکدیگر فرق دارند. جلبک ها معمولاًدر محیط های دریایی یا آبی غنی از مواد معدنی رشد می کنند. در تقسیم بندی های قدیمی تر نیز ،جلبک ها جزو شاخه گیاهان بوده اند. شواهد بیوشیمیایی بیانگر آن است که احتمالاً گیاهان سبز زمینی از جلبک های سبز به وجود آمده اند. (کافی،۱۳۷۸).

جلبک های قرمز اگر در معرض تابش اشعه مستقیم خورشید قرار گیرند ،رنگ قرمز خود را از دست داده و به رنگ سبز در می آیند(قهرمان،۱۳۸۹).رنگ جلبک قرمز به واسطه دارا بودن رنگدانه های محلول در آب به نام فیکوبیلین که معمولاً قرمز بوده اما بعضی اوقات سبز تیره تا روشن یا حتی قهوه ای تیره یا سیاه ظاهر شده و در

مناطق جزر و مدی کم عمق ساحلی یافت می شوند. رنگدانه غالب ،آر- فیکو اریترین[8] ، موجب رنگ قرمز می گردد . در حالی که رنگدانه های کلروفیل a، d، کاروتن ،لوتین[9] ، زیاکسانتین[10] و آر فیکوسیانین[11] نیز حضور دارند (Yee, 1999) .

عصاره جلبک قرمز به عنوان تثبیت کننده ها در بستنی ، دسر[12] ، آب نبات ،مربا و انواع کیک استفاده می شود. مهمترین محصول شناخته شده ماده ای ژلاتینی تحت عنوان آگار است که می تواند از برخی جلبک های قرمز استخراج شود. آگار به شکل خشک به فروش می رسد و در آب داغ حل خواهد شد که با سرد شدن آب ژلاتینی میگردد.

آگار کربوهیدرات پیچیده ای است، و هیچ آنزیمی در بدن انسان برای هضم آن وجود ندارد. از این رو، می توان جهت اضافه کردن حجم محتویات روده و در نتیجه کمک به رفع تنبلی آن خورده شود. با اینحال از دیدگاه زیست شناس آگار استفاده بسیار با ارزشمند تری دارد چنانکه به عنوان محیط کشت باکتری ها استفاده می گردد(Winchester, 1969)

جلبک قرمز گراسیلاریا دو پایه بوده (Martinez *et al.*, 1999) و بطور شگفت آوری محتوای ژن اجدادی را در ژنوم پلاستید خود حفظ کرده است ، و شامل مجموعه ای از کامل ترین ژن پلاستید شناخته شده در یوکاریوتهای فتوسنتیک می باشد. (Hagopian *et al.*, 2004). این جلبک پایه و اساس صنعت آگار در سراسر جهان می باشد(Destombe *et al.*, 2004).

۲-۱-۱- جنس گراسیلاریا

تعداد گونه های شناسایی شده از جلبک قرمز بیش از ۲۵۰۰ گونه می باشد(Norton *et al.*, 1996) و در بین جلبک های دریایی گراسیلاریا سومین جنس با بیشتر از ۱۵۰ گونه در سراسر دنیا گزارش شده است و شامل بسیاری از آگروفیت های مهم تجاری می باشد (Byrne *et al.*, 2002) در حال حاضر بیش از نیمی از نیاز صنعت جهانی آگار را تامین می کند(Peng *et al.*, 2009).جنس گراسیلاریا ،از میان تیره گراسیلاریاسه[13] بزرگترین جنس از شاخه ردوفیتا (جلبک قرمز) می باشد.هرچند به رنگ های مختلفی شامل سیاه ،زرد و قرمز مشاهده میشوند. حدود ۱۰۰ گونه از گراسیلاریا بطور گسترده ای از آبهای تروپیکال آبهای گرم سراسر دنیا وجود دارد (Yee,1999).صنعت پرورش گراسیلاریا در چندین کشور از جمله فیلیپین ،شیلی ، چین ،کره ، اندونزی ، نامبیا ، ویتنام و آرژانتین در مقیاس تجاری انجام می گردد (McHugh, 2003). برای تامین تقاضای رو به رشد مواد خام صنعت جهانی آگار از گونه های گراسیلاریا *G.corticata* که بطور معمول در حوضچه های بین

[8] . r-phycoerythrin
[9] . lutein
[10] . zeaxanthin
[11] . r-phycocyanin
[12]. pudding
[13]. Gracilariaceae

مناطق جزر و مدی ساکن اند به عنوان یک منبع بالقوه از مواد خام برای آگار گزارش شده است (Andriamanantoanina, 2007; Kappanna and Rao,1963)

G.corticata از سواحل غربی هند آگار با درجه بندی حدود ۱۶٪ ، ژل با استقامت ۱۰۰ گرم بر سانتی متر مربع تولید می کند (Törjék *et al.*, 2002).استفاده تجاری از این جلبک دریایی و افزون بر آن توسعه کشت گراسیلاریا و تولید صنعتی آگار نیازمند شناسایی صحیح آن می باشد.و نهال مناسب ،افزایش نرخ رشد و اصلاح ژنتیکی راه هایی جهت بهینه سازی بهره برداری تجارتی از جلبک های دریایی می باشند. (Michele *et al.*, 2002) .

۳-۱-۱- رده بندی گراسیلاریا

جنس گراسیلاریا متعلق به خانواده گراسیلارریاسه از جلبک های قرمز می باشد و طبقه بندی آن بر اساس سایت (Algaebase) به شرح زیر می باشد:

Classification:
Empire Eukaryota
Kingdom Plantae
Phylum Rhodophyta
Subphylum Eurhodophytina
Class Florideophyceae
Subclass Rhodymeniophycidae
Order Gracilariales
Family Gracilariaceae
Genus *Gracilaria*

٤-۱-۱- اهمیت اقتصادی گونه های گراسیلاریا

جلبک های قرمز گراسیلاریا از ارزش تجاری بالا برخوردار بوده و به عنوان غذا و تولیداتی از قبیل هیدرو کلوئیدها (آگار و کاراژینان) بالغ بر ۲/۵ میلیون دلار می رسد(Radner, 1996). در بین جلبک های دریایی گراسیلاریا شامل بسیاری از آگروفیت های مهم تجاری می باشد (Byrne *et al.*, 2002) در حال حاضر بیش از نیمی از نیاز صنعت جهانی آگار را تامین می کند(Peng *et al.*, 2009).

در میان جلبک های فیکوکلوئید[1] آگار بالاترین قیمت را در بازار جهانی دارد و اساساً از جلبک دریایی قرمز مانند جلیدیوم[2] و گراسیلاریا تهیه می شود.مزیت آگار به دلیل ژلاتینه بودن آن بر اساس نقطه ذوب بالای آن می می باشد.آگار استخراج شده از تیره گراسیلارریاسه اولین فیکوکولوئید مورد استفاده در صنایع غذایی انسانی می باشد.(Yee,1999)

قیمت بالای جلیدیوم و کمبود آن افزایش استفاده از گراسیلاریا در محصولات آگار را موجب شده است.در حال حاضر در برخی کشورها نظیر تایوان ،چین و شیلی کشت می شود . بطور کلی آگار از گراسیلاریا ممکن است وابسته به استقامت ژل و خصوصیاتی از قبیل چگالی بار [3]، مقدار سولفات ،پیرووات و متوکسیل آن به چند

---

[1]. phycocolloids
[2]. Gelidium
[3] . charge density

چند گروه تقسیم گردد. آگار گراسیلاریا درجه بالاتری از سولفاسیون ، متوکسیلاسیون و پیرووویلاسیون را در مقایسه با سایرین مانند جلیدیوم و پتروکلادیا[1] را دارد(Yee,1999) .

کیفیت و کمیت آگار گراسیلاریا به گونه مورد استفاده ،فصل یا زمان جمع آوری نمونه و محیط رشد آنها بستگی دارد(Yee,1999) . بنابراین قبل از هرگونه برنامه کشت و پرورش دریایی[2] ،انتخاب نژاد برای تولید آگار با کیفیت خوب ، مهم است زیرا کیفیت متغیر از آگار بدست آمده از گراسیلاریا ممکن است مشکلاتی را ایجاد نماید(Yee, 1999). اخیرا برخی از مواد بیواکتیو ازگونه های گراسیلاریا استخراج وگزارش شده است (Peng *et al.*, 2009)

مطالعه در زمینه گیاه گراسیلاریا دارای اهمیت ویژه ای است زیرا ارزش روز افزون آگار استحصالی از آن برای انسان و کاربرد آن در پرورش صدف آبالون که به مصرف تغذیه انسانی می رسد، قابل توجه است. اگرچه بهره برداری از گراسیلاریا از منابع طبیعی افزایش یافته است اما پرورش گراسیلاریا کمکی در جهت حفظ ذخایر طبیعی این گیاه آبزی است. باید گفت که بسترهای حاوی گراسیلاریا در دنیا محدود است و قادر به تامین نیازهای رو به رشد نمی باشند و برنامه ریزی دراز مدت به منظور درخواست متقاضیان از چنین منابعی غیر مقدور است (حسینی، ۱۳۸۳).

۲-۱- بیولوژی گراسیلاریا

۱-۲-۱- پراکنش جنس گیاه گراسیلاریا

جنس گراسیلاریا در جهان دارای پراکنش وسیع بوده و وجود آن در مناطق قطبی ،استوائی و مدیترانه ای گزارش شده است. در سال ۱۸۳۰، گرویل[3] جنس گراسیلاریا را مشتمل بر چهار گونه معرفی نمود. در سال ۱۸۵۲ بررسی مجدد توسط آگارد[4] نشان داد که تعداد گونه های جنس گراسیلاریا ۲۳ گونه است . او در سال ۱۹۰۱ با بازنگری مجدد،تعداد گونه های شناسایی شده را به شصت و یک گونه رساند. از آن پس شمار گونه های شناسایی شده گراسیلاریا در مناطق مختلف را بیش از ۱۵۰ گونه تخمین زده اند(حسینی،۱۳۸۳).

پراکنش گونه *G. corticata* ،از کشورهای پرو[5] از آمریکای جنوبی (Ramírez and Santelices 1991)، جیبوتی[6](Silva *et al.*, 1996) ، اریتره (Ateweberhan *et al.*, 2005) ، کنیا (Silva *et al.*, 1996; Bolton *et al.*, 2007) ماداگاسکار (Silva *et al.*, 1996) ، موریس[7](Børgesen, 1943; Silva *et al.*, 1996) ، سومالی (Silva *et al.*, 1996) ، آفریقای جنوبی (De Clerck *et al.*, 2005 ; Iyer *et al.*, 2005) ، تانزانیا (Silva *et al.*, 1996 ; Oliveira *et al.*, 2005)

---

1. *pterocladia*
2. marine culture
3. Greville
4. Agardh
5. Peru
6. Djibouti
7. Mauritius

از آفریقا گزارش گردیده است . از جزایر واقع در اقیانوس هند در جزایر آندامان ، کریسمس[1] ، لاکادیف ، مالدیو ، نیکوبار[2] ، ریونیون[3] ،رودریگز [4] ، سیشل (Silva *et al.,* 1996) ، مشاهده شده است و از کشورهای جنوب غربی آسیا می توان هند (Silva *et al.,* 1996; Sahoo *et al.,* 2001; Pareek *et al.,* 2010) ، ایران (Silva *et al.,* 1996; Sohrabipour and Rabii 1999; Yousefi *et al.,* 2013) ، کویت ، عمان ، پاکستان ، سواحل جنوب شرقی کشور های عربی [5] (Silva *et al.,* 1996) ،سریلانکا (Silva *et al.,* 1996; Iyer *et al.,* 2005) و یمن (Silva *et al.,* 1996) را نام برد. همچنین کره از آسیا (Lee and Kang 2001) و سنگاپور از جنوب شرقی آسیا (Pham *et al.,* 2011) نیز گزارش شده است.

۲-۲-۱- ویژگیهای گیاه گراسیلاریا

شکل ظاهری:

ظهور و رشد تالهای بر افراشته از یک صفحه دیسکی شکل کوچک نگهدارنده[6] آغاز می شود . تال بتدریج استوانه ای شده، بصورت تیغ فشرده و سپس ایجاد انشعابات جانبی بصورت متناوب یا متقابل می نماید. گاهی در یک گیاه انشعابات زیاد و متفاوتی دیده می شود. شکل ظاهری تال گاهی بعنوان عامل شناسایی گیاه بشمار می رود و زمانی در یک گونه شکل یک شاخه و نوک آن با گونه دیگر متفاوت است. (حسینی، ۱۳۸۳).رنگ جلبک قرمز *Gracilaria corticata* متمایل به ارغوانی تا قهوه ای می باشد و به اشکال مختلف ،غضروفی ، بوته ای و بادبزنی دیده می شود و ریسه ها تقسیمات دو تایی نا منظم متوالی دارد .سیستوکارپ نیمه کروی روی سطح تال در فصول تابستان و زمستان دیده می شود. شامل چندین محور اصلی پهن برخاسته از قاعده می باشد. دارای نگاهدارنه صفحه ای بوده و پهنای انشعابات اصلی ۷-۴ میلیمتر و ارتفاع تال ۱۵-۵ سانتیمتر می باشد(قرنجیک و همکاران، ۱۳۸۹.)

تشریح ریسه گیاه:

تال رویشی گیاه گراسیلاریا شامل دو قسمت پوست و استوانه مرکزی است . سلول های پوست کوچکتر هستند و از یک لایه یا دو لایه تشکیل شده است و سلول های بیرونی دارای رنگدانه می باشند. استوانه مرکزی از سلول های بزرگ پارانشیمی تشکیل شده است. وضعیت لایه های خارجی ، اندازه و تعداد سلول های استوانه مرکزی و تغییر شکل سلول ها از ناحیه پوست به ناحیه مرکزی در تشخیص گونه های گراسیلاریا موثر می باشد(حسینی، ۱۳۸۳).بطوریکه در مقطع ریسه رویشی سلول های برجسته مغزی در ناحیه میانی توسط سلول های پارانشیمی و

---

[1] . Christmas Island
[2] . Nic.obar Islands
[3] . Réunion
[4] . Rodrigues
[5] . Southeast Arabian coast
[6] . holdfast

قشری[1] احاطه می گردد(Marín-Salgado, 2011). در گونه *G.gracilis* که گیاهی چند ساله محسوب می شود (Destombe and Valero, 2001) افراد نر بالغ و تترااسپوروفیت با مشاهده توسط میکروسکوپ تشریحی تعیین میگردد. (Martinez *et al.*, 1999).

تشخیص ماده بالغ قبل از لقاح بسیار مشکل بوده ولی بعد از لقاح با گسترش سیستوکارپ بر روی تالوس ماده ها قابل تشخیص با چشم می باشند.تترااسپوروفیت های دیپلوئید اسپورهای میوزی را منتشر می کند که به ایجاد جوانه به منظور تولید هاپلوئید های مستقل گامتوفیت های دو پایه منجر می گردد. با این حال در برخی از موارد اسپورهای میتوزی منتشر نمی شوند و گامتوفیت های کوچک هاپلوئید تالوس ها به عنوان اپی فیت ها روی تترااسپوروفیت های دیپلوئید والدینی رشد می نمایند این پدیده جوانه زنی سینتاگامتیک[2] یا جوانه زنی در محیط کشت طبیعی[3] نامیده می شود(Martinez *et al.*, 1999).

تترااسپوروفیت

مرحله تتراسپوروفیت دیپلوئیدی،با حضور تتراسپور صلیبی به اشکال مکعبی تا بیضوی مشخص می گردد (Marín-Salgado and Peña-Salamanca, 2011: 125).تتراسپورها بصورت متراکم روی بخش اپیدرمی پراکنده می باشند. هر تتراسپور مرکب از چهار اسپور است که صلیبی شکل می باشد (حسینی، ۱۳۸۳).

اسپرماتانژ

اسپرماتانژها بشکل کروی یا بیضوی و بطور پراکنده در سطح تال دیده می شود. طرز قرارگرفتن کنسپتاکل اسپرماتانژها به سه صورت ذیل عامل مهم شناسایی گونه های گراسیلاریا از یکدیگر می باشد (حسینی، ۱۳۸۳).

۱. اسپرماتانژهای پراکنده شده در سطح تال بصورت سری یا با فاصله از یکدیگر که بوسیله سلولهای اپیدرمی ایجاد می شود.
۲. اسپرماتانژهای واقع شده داخل کنسپتاکل های عمیق تر بیضوی شکل.
۳. اسپرماتانژهای واقع شده در کنسپتاکل های سطحی تخم مرغی شکل.

سیستوکارپ

سیستوکارپ به صورت اجزاء کروی شکل در قسمت سطحی ساقه پراکنده شده و ممکن است به چهار بخش تقسیم شوند.

۱. پریکارب: شامل تعدادی لایه سلولی است که اغلب لایه ها بهم فشرده ودارای پیگمانهای رنگی می باشند.
۲. گونیموبلاست: واقع در مرکز سیستوکارپ و شامل سلولهای پارانشیمی است.
۳. کارپوسپورانژ: در بالای گونیموبلاست قرار گرفته است و به اشکال دایره ای یا تخم مرغی دیده می شود.

---

[1] . cortex
[2] . syntagmatic
[3] . in situ germination

۴. فیلامنتهای جذب کننده از بافت گونیموبلاست تا لایه پریکارپ امتداد داشته است و فقط برخی گونه ها دارای رشته های جذب کننده می باشند(حسینی، ۱۳۸۳).

سیستوکارپ بالغ واجد روزنه کوچکی بر روی آن می باشد که از قسمت انتهایی آن کارپوسپورها خارج می گردند(Marín-Salgado *et al.*, 2011: 128)

۳-۲-۱- چرخه زندگی جلبک گراسیلاریا

تولید مثل در جلبک قرمز پیچیده تر و پیشرفته تر از دیگر جلبک ها است. جلبک قرمز پلی سیفونیا[1] نمونه ای دریایی زیبا و پرمانند است که جنسیت ها مجزا بوده بطوری که گیاه نر و گیاه ماده به صورت مجزا دیده می شود.برروی گیاه نر خوشه های بزرگی از آنتریدی[2] توسعه می یابد ، اما هر یک از آنتریدیوم ها[3] تنها یک اسپرم منفرد تولید می کند که غیر متحرک است.زمان بلوغ آنتریدی با شکافته شدن باز شده و اسپرم ها آزاد می شوند و در آب شناور می گردند. گیاه ماده اندام ماده را تولید می کند که کارپوگونیا [4] نامیده میشود و تخم بزرگ منفردی را در پایه آن تولید می کند.در هر کارپوگونیوم[5] گردن طویل گسترش یافته و زمانی که اسپرم شانس تماس با آن را بیابد به این اندام می چسبد. اسپرم حاوی آنزیمی است که دیواره های سلولی از ناحیه گردن کارپوگونیوم را حل می کند ، و هسته اسپرم پس از ورود و در داخل کارپوگونیوم تخم را بارور می نماید.بدین سان تخم دیپلوئید شکل می گیرد اما بطوریکه در دیگر جلبکها مطالعه شده است از میوز پیروی نمی کند.در عوض تخم لقاح یافته توسط میتوز در داخل سیستوکارپ [6] تقسیم شده و تعداد زیادی سلول های دیپلوئید کارپوسپور[7] تولید می کند که غیر معمول است زیرا اغلب اسپورهای تولید شده توسط گیاهان هاپلوئید می باشند. هر کارپوسپور پس از رشد به گیاه دیپلوئید، تتراسپورفیت [8]منجر می شود. بر این گیاه میوز رخ می دهد،و چهار تتراسپور هاپلوئید شکل میگیرد.دو تا از این ها پس از رشد به گیاه نر و دوتای دیگر به گیاه ماده منجر می شوند . از آنجا که این گیاهان تولید گامت می نمایند ، آنها را گامتوفیتهای نر و ماده مینامیم (Winchester, 1969: 172).این چرخه پیچیده به عنوان تناوب نسل شناخته شده است و پدیده ای شایع در گیاهان عالی می باشد.در چرخه زندگی پلی سیفونیا سه نسل دیده می شود. اول نسل بزرگ گامتوفیت هاپلوئید است. دوم سیستوکارپ دیپلوئید نسلی است که از رشد تخم لقاح یافته[9] و با تولید کارپوسپور دیپلوئید در نهایت نسل اسپوروفیت را تولید

---

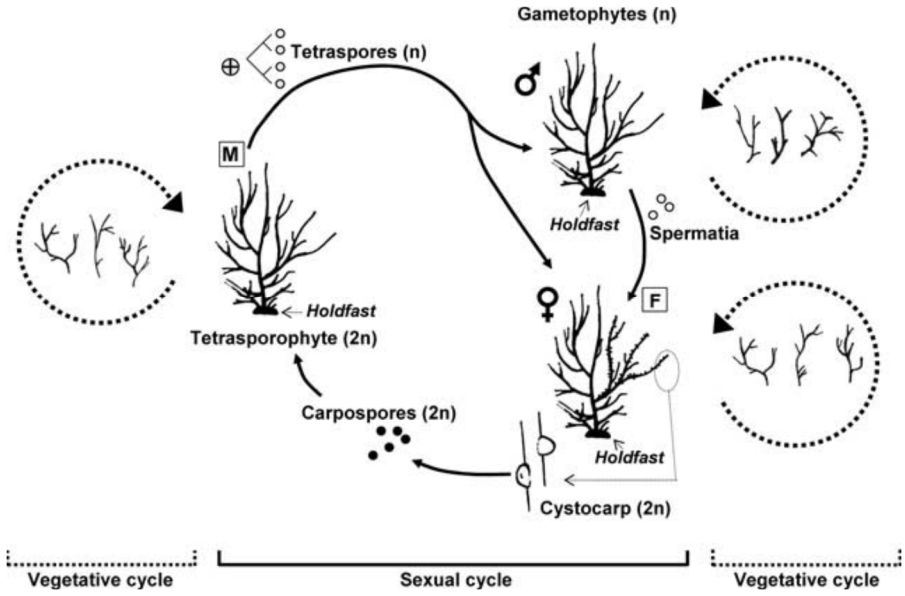
[1] . *polysiphonia*
[2] . antheridia
[3] . antheridium
[4]. carpogonia
[5] . carpognium
[6] . cystocarp

[7] . carpospores
[8] . tetrasporic
[9] . zygote

تولید می نماید. سوم گیاه تترااسپوروفیک ، نسل اسپوروفیت می باشد که دیپلوئید بوده و همچنین تترااسپورها را توسط میوز تولید می کند.چرخه هنگامیکه تترااسپورها رشد یافته و نسل گامتوفیت بزرگ را تشکیل می دهند کامل میگردد (Winchester, 1969 :173).

این چرخه در جنس گراسیلاریا با کمی تغییر مشابه پلی سیفونیا بوده بطوریکه در جنس گراسیلاریا تناوبی از نسل هم ریخت(ایزومورفیک) بین گامتوفیت هاپلوئید و تترا اسپوروفیت دیپلوئید را نشان می دهد.گامتوفیت دوپایه هستند.پایه نر[1] بارور تولید اسپرماتانژ [2] و پایه ماده تولید کارپوگونیا می نماید. پس از لقاح یک ساختار به نام سیستوکارپ تشکیل می گردد(Lewmanomont, 1996).این ساختار بر روی ریسه های گامتوفیت ماده با تقسیم میتوز هزاران اسپور دیپلوئید (کاپوسپور) را تولید می کند (Guillemin, 2008:1502).سیستوکارپ ها برجسته، گرد و یا نیم کره است، با یا بدون پوزه[3]، در سطح پایه ماده پراکنده می باشند. هر سیستوکارپ متشکل از پوسته[4]، گونیموبلاست[5] و کارپوسپورانژیا [6] و ، با یا بدون رشته های جذبی می باشد(Lewmanomont, 1996). سیستوکارپ بالغ واجد روزنه کوچکی بر روی آن می باشد که از قسمت انتهایی آن کارپوسپورها خارج می گردند(Marín-Salgado and Peña-Salamanca, 2011: 128). کارپوسپورها از طریق این روزنه کوچک آزاد می شوند و به تالوس های تترااسپوروفیت جوانه می زنند. تترااسپوروفیت بالغ تترااسپورونژیا را ایجاد می کند که عموماً در پوسته تالوس رخ می دهد و از طریق میوز تقسیم می شود و ۴ اسپور یا تترااسپور که به ۴ ریسه گامتوفیت جوانه می زند که دو تا نر و دو تا ماده می باشند(Lewmanomont, 1996).در این جلبک علاوه بر چرخه جنسی ، چرخه نباتی نیز در هریک از گامتوفیت های نر و ماده و ریسه های تترااسپوروفیت به صورت طبیعی و یا مصنوعی مشاهده می گردد(Guillemin, 2008:1502).

[1] . male thallus
[2] . spermatangia
[3] . rostrum
[4] . pericarp
[5] . gonimoblast
[6] . carposporangia



شکل ۱-۱ : چرخه زندگی جلبک قرمز گراسیلاریا(Guillemin, 2008:1502)

در گونه *G.tenuistipitata* در آبهای چین ، رشد و نمو تتراسپوروفیتها شبیه گامتوفیت ها می باشد و تقسیم سلولی در مدت پانزده دقیقه تا یک روز پس از اتصال اسپوورها صورت می گیرد. پس از ۷-۲ روز همسفر ها تشکیل می شود و سپس دیسکها شروع به رشد می نمایند . پس از ده روز از مرکز هر دیسک جوانه هلالی مانند مشاهده می گردد و با رشد تدریجی یک یا بیشتر ساقه برگی شکل بر افراشته بوجود می آورد(حسینی، ۱۳۸۳).

۳-۱-اثر فاکتورهای محیطی بر رشد گیاه گراسیلاریا

تجلی فصلی چرخه زندگی *Gracilaria corticata* در نواحی جزر و مدی سواحل ویساخاپاتنام[1] رخ می دهد جلبک ها در سراسر سال با دو چرخه رشد شش ماهه در دسترس بودند بطوری که اوج آن در خرداد تا تیر و آبان تا دی می باشد.گیاهان مولد در سراسر سال با فراوانی بیشتری از گیاهان رویشی مشاهده گردیدند. بسیاری از کارپوسپورها و تترا اسپورها در مدت ۲۴ ساعت بین ساعت ۲ تا ۶ صبح همه ماهه می ریزند و پیک آزاد سازی آنها آذر تا بهمن و مرداد تا مهر می باشد.(Subbarangalah, 1983)

رشد بهینه گراسیلاریا در بریتیش کلمبیا[2] بین۵ تا ۶ متر زیر سطح متوسط جزر و مد رخ می دهد وبا تابش خورشیدی ارتباط دارد(Whyte *et al.*, 1981:497). تغییرات فصلی در ریختن اسپور جلبک های قرمز یک ساله مختلف در هند مانند *Gracilaria corticata*،*Gelidium pusillium*،*peterocladia heteroplatos* و *Gelidiopsis*

[1] . Visakhapatnam
[2] . British Columbia

variabilis دیده می شود بطوریکه تولید اسپور ماهانه بیش از ۱۰۰۰ تا ۱۲۰۰۰۰۰ به ازای یک گرم وزن تر بوته بارده متغییر می باشد (Narasimha, 1989:143).

.دوره رشد *G. tenuistipitata* با توجه به درجه حرارت در ماههای مختلف سال از ۴۰ تا ۷۰ روز می باشد و اندازه آن به دو میلیمتر می رسد و در فصولی از سال با حرارت مناسب اندازه ریسه های آن ۳۰ تا ۶۰ سانتیمتر می رسد . و زمانی که درجه حرارت آب به ۲۹ درجه سانتیگراد رسید رشد ریسه ها متوقف شده و سپس ریسه از نوک گیاه شروع به پوسیدن کرده و در نهایت از بین می رود بطوریکه هنگامی که درجه حرارت آب به ۳۱ درجه رسید هیچگونه ریسه مسن در بستر مشاهده نمی گردد و در این هنگام بعضی از هاگ های رشد یافته جدید که رنگ آنها زرد و اندازه کمتر از ۲ میلیمتر قابل رویت می باشد و با کاهش دما رنگ سبز در گیاه ایجاد شده و بخوبی به رشد ادامه خواهند داد. (حسینی، ۱۳۸۳).

محل رویش جلبک *Gracilaria corticata* در استانهای هرمزگان و سیستان و بلوچستان بر سطح حوضچه های صخره ای در قسمت های میانی و پایین محدوده بین جزر و مدی است. پراکنش کم و بیش در کل استان های هرمزگان و سیستان و بلوچستان (بریس، لیپار، کچو،گوردیم و تنگ) در فصول تابستان و زمستان می باشد(قرنجیک و روحانی ، ۱۳۸۹).

میانگین دمای آب دریا از منطقه لنگه تا جاسک (جگین)در فصول پاییز ، زمستان ، بهار و تابستان به ترتیب۰/۲۶ ±۲۶/۶۵، ۰/۳۵ ±۲۲/۲ ، ۰/۶۳±۲۴/۵۷ و ۰/۵۵± ۳۰/۴۹ می باشد و میانگین شوری آب دریا در این فصول به ترتیب۰/۱۰۵ ±۳۷/۴۸ ، ۰/۴۷ ±۳۷/۱۲ ، ۰/۱۴۵ ±۳۶/۷۸ ، ۰/۱۴۵ ±۳۷/۴۲ می باشد (طالب زاده ، ۱۳۷۴).

۱-۳-۱- درجه حرارت:

درسواحل چین ، حداقل میزان رشد در حرارت ۱۵ درجه سانتیگراد و در بالاترین دما ۳۲ درجه سانتیگراد بود. میزان رشد در حرارت ۳۰-۲۰ درجه سانتیگراد بیش از دو درصد بود. بنابراین ،ممکن است حرارت بین درجات ۳۰-۲۰ درجه سانتیگراد مناسبترین وضعیت برای رشد گیاه باشد (حسینی، ۱۳۸۳).

۲-۳-۱-شوری:

شوری عامل مهم و موثر در چرخه رشد این گونه از جلبکها می باشد. نتایج فائو[1] در چین نشان داد که ماکزیمم رشد گیاه در تانک مورد آزمایش ،بیست ویک درصد بود که بین هفت تا بیست و هفت درصد نوسان داشت. کاهش شوری به حد سه در هزار در مدت دو روز سبب بی رنگ شدن نوکهای گیاه گردید و پس از چهار روز حالت نکروز (خشکیدن) رخ داد و در شوری بالا به میزان ۳۴ قسمت در هزار ،رشته ها بسیار ضعیف رشد

[1] . FAO

نمودند و انشعابات نرمتر بودند در حالیکه در ۴۷ در هزار ، رنگ اجزاء رویش در مدت دو هفته از بین رفت. (حسینی، ۱۳۸۳).

٤-۱- عوامل موثر در تمایز مراحل جنسی

سطوح پلی آمین های درونزا[1] ،مراحل مختلف رسیدگی سیتوکارپ را در جلبک قرمز *Gracilaria cornea* تغییر می دهد. بالاترین مقادیر پلی آمین در بافت مرحله ابتدایی بعد از لقاح یافت شد که منجر به کاهش رسیدگی سیتوکارپ گردید.آزمایشات انکوباسیون نشان داد پلی آمین های برون زاد[2] رسیدگی سیستوکارپ را القاء میکند و آزادسازی کارپوسپورها را افزایش می دهد و توده سلولی را در ظرف ۴ تا ۷ روز با تیمار اسپرمین[3] توسعه می دهد. این اولین گزارش در مورد تاثیر پلی آمین ها در رسیدگی سیستوکارپ در جلبک های دریایی می باشد.(Unostegui *et al.,* 2002: 1169)

٥-۱- اپی فیت[4]

اپی فیت در گراسیلاریا پدیده ای عمومی است و در جمعیت های بومی و تحت کشت مشاهده می شود. بطور کلی ، اپی فیت ها به سطح میزبان متصل می گردد . در جنس هایی مانند *Polysiphonia* spp. و *Ceramium* spp. می توانند به درون بافت میزبان نفوذ کنند و بر رشد و باروری آنها اثر میگذارند .در مطالعاتی که در آبهای کم عمق پارک دریایی ، پرت ، استرالیای غربی بر *Gracilaria cliftonii* انجام شد ۲۴ گونه اپی فیت ماکرو جلبک شناسایی گردید که ۲۱ گونه متعلق به ردوفیتا[5] و ۳ گونه متعلق به کلروفیتا[6] بود . (Munoz *et al.,* 2009).

٦-۱- بررسی های مولکولی

جلبک قرمز *G. cortiacta* چرخه تری فازیک ایزو مورفیک دارد که در آن تناوب نسل مورفولوژیکی جدایی ناپذیر در عین حال متمایز ژنتیکی از مرحله هاپلوئید و دیپلوئید رخ می دهد. از سه مرحله زندگی تنها گامتوفیت هاپلوئید ماده می تواند به آسانی توسط حضور سیستوکارپ روی سطح ریسه بعد از لقاح تشخیص داده شود. دو مرحله دیگر زندگی به عنوان مثال گامتوفیت نر و تتراسپورفیت می تواند تنها بعد از بلوغ بطور میکروسکوپی تشخیص داده شود.در حال حاضر هیچ روش قابل اعتمادی برای افتراق گیاهان تتراسپورفیت ، نر و ماده *G corticata*.در مراحل اولیه رشدی وجود ندارد. تشخیص و تمایز جنسیتی طی مراحل مختلف زندگی به کمک بررسی های مولکولی در برنامه هایی با اهداف اصلاح ژنتیکی صفات انتخابی در جلبک های مهم اقتصادی سودمند می باشد(Törjék *et al.,* 2002).

---

[1] . endogenous
[2] . exogenous
[3] . spermine
[4] . Epiphytism
[5] . Rhodophyta
[6] . Chlorophyta

۱-۶-۱- مطالعات ژنتیکی انجام شده در جلبک ها:

در برنامه حفظ ژنتیکی و اصلاح نباتات ، دانش ارتباط ژنوتیپ و تنوع ژنتیکی برای موفقیت برنامه ها دارای اهمیت می باشد (Yee, 1999) و استفاده تجاری از این جلبک دریایی و افزون بر آن توسعه کشت گراسیلاریا و تولید صنعتی آگار نیازمند شناسایی صحیح آن می باشد.و نهال مناسب ،افزایش نرخ رشد و اصلاح ژنتیکی راه هایی جهت بهینه سازی بهره برداری تجارتی از جلبک های دریایی می باشند (Yee,1999).

جداسازی اسیدهای نوکلئیک از گیاهان و جلبک ها با توجه به ساختار سلولی ، متفاوت از تکنیک های مورد استفاده برای بافت های حیوانی است. در گیاهان و ماکرو آلگ ها دیواره های سلول عمدتا از سلولز و یا برخی دیگر پلی ساکارید های پیچیده تشکیل شده است، و درجه جداسازی اسید نوکلوئیک (به خصوص RNA) بستگی به قصد و اهداف استفاده از آن دارد. DNA هسته ای بسته به این که در چه مرحله از چرخه زندگی آن قرار دارد می توانند از یک تا چهار نسخه در هر سلول وجود داشته باشد، با این حال، مناطق خاص در ژنوم هسته ای از تکرارهای پشت سر هم توالی یکسان تشکیل شده است که rDNA هسته ای حاوی ژنهای RNA های بزرگ و زیرواحد کوچک ریبوزومی و مناطق رونویسی و غیر رونویسی نمونه ای از آن است (Michele, 2002: 251) .

گیاهان و ماکروجلبک ها همچنین شامل دو ژنوم دیگر میتوکندری و پلاستید می باشند.ژنوم میتوکندری ماکرو جلبک ها از ژنوم کوچک در محدوده ۵۰۰-۱۰۰ جفت کیلوباز می باشد و به شکل حلقوی و خطی، مشابه به قارچ ها و تک یاخته ها یافت می شوند (Michele, 2002: 252) .بررسی های درون گونه ای جلبک های قرمز که به منظور بررسی های سیستماتیک، جغرافیای زیستی یا ژنتیک جمعیت تا کنون انجام پذیرفته است بر روی نشانگر های هسته ای و یا پلاستید متکی بوده است تا اطلاعات میتوکندری(Zuccarello *et al.*, 1999) .اگر چه کاربرد نشانگر میتوکندری در مطالعات ژنتیک جمعیت و تکامل جغرافیایی[1] در حیوانات بسیار مفید می باشد ، استفاده از آنها درگیاهان و جلبک ها مناسب نیست زیرا توالی نوکلئوتیدی DNA میتوکندری گیاهی (mtDNA) به آرامی تکامل می یابد و این تغییرات آهسته ،کاربرد کم آن در مطالعات درون گونه ای را منجر شده است(Zuccarello *et al.*, 1999).

استخراج DNA از سلول های جلبک دریایی بدلیل اتصال محکم آن با پلی ساکاریدهای سولفاته دیواره های سلول و ماتریکس بین سلولی ، پیچیده ووقت گیر است (Varela-Á lvarez *et al.*, 2006). علاوه بر این، یک روش که برای یک گیاه و یا یک گروه جلبکی مناسب است اغلب به دلیل تنوع دیواره سلولی، ذخیره سازی، و ترکیبات ثانویه با سایرین با شکست مواجه می شود(Doyle and Doyle, 1990 : 13).

[1] . phylogeographical

۲-۶-۱- تعیین توالی DNA

تعیین توالی DNA از طریق اطلاعات ژنتیکی موجود درDNA (در نظم خطی بازهای نوکلئوتیدی)با استفاده از روش های مانند تعیین توالی دی دآکسی[1] به روش سنجر[2] و تخریب شیمیایی نسبی[3] به روش گیلبرت[4] انجام می شود(Yee, 1999: 28).

روش جداسازی در تعیین توالی DNA باید قادر به تشخیص الیگومرهای طویل ،که تنها توسط یک نوکلئوتید در طول متفاوتند باشند. توالی ژنوم حلقوی پلاستید در جلبک قرمز *Gracilaria tenuistipitata* واریته *liui* تعیین توالی گردید. این ژنوم از ۱۸۳۸۸۳ جفت باز تشکیل شده است و شامل ۲۳۸ ژن ، از جمله تنها یک کپی از اپرون RNA ریبوزومی می باشد. در مقایسه با ژنوم پلاستید *Porphyra pupurea* حفاظت قویتری از محتوای ژن و نظم را نشان می دهد. گراسیلاریا بطور شگفت آوری محتوای ژن اجدادی را در ژنوم پلاستید خود حفظ کرده است ، و همراه با سایر ردوفیتا، شامل مجموعه ای از کامل ترین ژن پلاستید شناخته شده در یوکاریوتهای فتوسنتتیک می باشد (Hagopian *et al.*, 2004).

۳-۶-۱- جدا سازی و خالص سازی DNA

به دست آوردن DNA خالص از گیاه و ماکرو جلبک ها معمولا یک فرایند دشوار می باشد. و استفاده از کشت خالص ایده آل ترین روش برای خالص سازی اسید نوکلئیک است و برای این منظور بایستی نسبت به تمیز کردن نمونه های جمع آوری شده اقدام و اپی فیت ها و تمام موارد انگلی (حیوانی، گیاهی و یا قارچها) حذف شود. بافت های مطلوب بخش های در حال رشد فعال و یا بخش های تولید گامت یا اسپور می باشد. یک مثال خوب در این مورد ساختار تولید مثل در جلبک قرمز، سیستوکارپ است که به تولید مقادیر زیادی هسته و اندامکها نسبت به سایر قسمت هایی از ارگانیسم در آن ایجاد می گردد. و معمولا عاری از مواد انگلی است. بیشتر مواد به دست آمده در این روش بازده مقداری DNA آن کم بوده ، اما مواد اسید نوکلئیک آن خالص است (Nishiguchi *et al.*, 2005).

مرحله نخست در بیولوژی مولکولی جداسازی و خالص سازی با کیفیت بالا و مناسب از DNA می باشد. متاسفانه روش های جداسازی اسید نوکلئیک قابل اجرا برای گونه گیاهی معین، شاید برای گونه دیگر مناسب نباشد . همچنین خالص سازی DNA که در تکنیک مولکولی معین مناسب است (مانند تکثیر زنجیر پلیمراز) شاید قابل اجرا برای دیگر روش ها مانند چند شکلی طول قطعات برشی[5] نباشد (Yee,1999).

---

[1] . dideoxy: یک نوکلئوتید تغییر یافته که فاقد گروه OH ´ ۳ است و مانع رشد زنجیره پلی نوکلئوتیدی می شود

[2] . Sanger

[3] . partial chemical degradation

[4] . Gilbert

[5] . restriction fragment-leangth polymorphism

تغییر این پروتکل ها اغلب منجر به صرف وقت و روشهای پیچیده می گردد که نیاز به مقادیر بیشتری از مواد در شروع کار را به همراه خواهد داشت. بنابراین ژنتیک مولکولی جلبک ها با روشهای جداسازی نوکلئیک اسید که سریع ، راحت و مناسب و قابل اجرا برای گونه های مختلف می باشند توسعه می یابد. در ابتدا پروتکل هایی که برای استخراج DNA توسعه یافته بودند زمانبر و سخت بود و معمولاً با ترکیب یک یا دو مولکول سزیم کلراید (CsCl) در یک چرخش اولترا سانتریفوژ انجام می گردید (Yee,1999).

هرچند لی[1] و همکاران (۱۹۹۷) مشکلاتی نظیر مقادیر کم DNA با استفاده از تکنیک شیب آنها و از طرفی صرف وقت و گران بودن روش را اظهار داشتند. از اینرو تکنیک هایی مختلف برای رفع این مراحل از قبیل استفاده ستون چرخش سفاروز [2]، روش های خالص سازی شامل پروتکل CTAB و ستون وابستگیQiagen و مراحل خالص سازی ژل مورد استفاده قرار گرفت (Yee, 1999). متاسفانه استخراج DNA از جلبک های دریایی به دلیل حضور پلی ساکارید های سولفاته پیچیده می باشد. خرد کردن و سائیدن نمونه با استفاده از نیتروژن مایع بطور معمول پلی ساکارید های محلول چسبناک متصل به DNA را آزاد می سازد. (Yee,1999) و محصول بدست آمده توسط بافت کلپ[3] پودر شده در نیتروژن مایع ۶۴٪ بیشتر از بافت خرد شده در بافر در درجه حرارت اتاق بود. بنابراین به منظور رفع این مشکلات تکنیک هایی از قبیل استفاده از اتصالات هیدروکسی آپاتیت [4](Yee,1999) و تیمار با استیل تری متیل آمونیوم برمید [5] توسعه یافت (Yee,1999).

بسیاری از روش های منتشر شده برای استخراج DNA از جلبک سبز ،جلبک قرمز و جلبک قهوه ای نیاز به بافت های خرد شده در نیتروژن مایع دارد.پلی ساکارید محلول چسبناک که به بافت جلبکی خرد شده در نیتروژن مایع متصل است جدا سازی آنها را از DNA مشکل می سازد(Varela-Álvarez *et al.,* 2006). مشکلات بوجود آمده در استخراج DNA از گونه های گراسیلاریا مربوط به پلی ساکارید ها و سایر آلاینده ها می باشد و استخراج با استفاده از روش ترکیبی CTAB و فنل کلروفرم در مقایسه با سایر روش ها موثرتر می باشد (Yee,1999) ، بنابراین استیل تری متیل آمونیوم برمید در رفع این مشکل بکار می رود . این روش برای جداسازی DNA با کیفیت بالا برای جلبک ها ارائه شد روشی است که برای شبیه سازی، توالی، هیبریداسیون تکنولوژی پروب، و در نتیجه، برای ساخت و ساز کتابخانه ژنومی مناسب می باشد وDNA استخراج شده دارای وزن مولکولی بالا و بدون نشانه ای از تخریب است . بازده در حدود ۶-۱۰ میکروگرم DNA از ۱ گرم از بافت تازه[6] می باشد.این روش ارزان و مناسب برای جداسازی نمونه های متعددی از DNA از مقادیر کم نمونه های تازه جلبکی است. در نهایت، برخی از روش های موجود (به عنوان مثال CSCL شیب طولانی مدت سانتریفوژ) پر

---

[1] . Lee

[2] . sepharose spin

[3] . kelp

[4] . hydroxyapatite

[5] . cetyl trimenthyl ammonium bromide(CTAB)

[6] . fresh blades

هزینه هستند.در نتیجه، پروتکل ارائه شده برای استخراج DNA جلبک دریایی توسط Varelaقویاً توصیه شده است (Varela-Á lvarez *et al*., 2006).

روش CTAB و فنل کلروفرم بهترین عملکرد از نظر کیفیت و کمیت DNA دارد و برای نمونه با اتدازه بزرگتر مانند *G. changii* مناسب است (Sim *et al.,* 2007).

٤-٦-١- مارکرهای مولکولی مورد استفاده در جلبک ها:

تا سال ۲۰۰۳، اکثر مطالعات ژنتیک مولکولی در جلبک ها از طیف نسبتا محدود از نشانگرهای مانند ژن rbcL پلاستید و جداکننده cox_{2-3} میتوکندری و یا DNA ریبوزومی هسته ای استفاده می گردید. فقدان مارکرهای در دسترس ،مشکل به خصوص در مطالعات انجام شده از تنوع درون گونه ای بوده است.در حالی که در حال حاضر از میکروساتلایت ها در بسیاری از گونه های جلبکی استفاده می شود، همچنان استفاده از نشانگر ها عمومی ، می تواند در طیف گسترده ای از گونه ها اعمال شود.(Provan *et al.,*2003).

اگر چه آلوزیمها بطور موفقیت آمیزی برای آزمایشات ساختار ژنتیکی برای بسیاری از موجودات استفاده شده است ،آنها عموماً بدلیل تعداد کم جایگاه های ژن در دسترس و سطوح پایین پلیمورفیسم ابزار ایده آلی در جلبک ها نمی باشند .(Faugeron *et al.,* 2001). در این زمینه، مجموعه ای متنوع از مارکرهای مولکولی در بررسی مطالعات ژنتیکی جلبک ها از جمله میکرو ساتلایتها در جلبک قرمز دریایی *Gracilaria gracilis* و در کلپ *Laminaria digitata* ،تکثیر طول قطعات پلی مورفیسم در کلپ *Alaria marginata* ، و تکثیر تصادفی پلی مورفیک DNA(RAPD) در چند گونه جلبک قرمز و چند گونه کلپ توسعه داده شده است (Faugeron *et al* .(.,2001

تکنیک RAPDs بطور گسترده ای در تعیین ساختار ژنتیکی جمعیت استفاده می شدزیرا آنها از تکنیک ساده ای برخوردار بودند. این روش به طور همزمان نواحی بسیاری از DNA ژنومی را تکثیر می کند و بنابراین تقریباً تعداد نامحدودی از جایگاه های ژن را تهیه می کند و میتوانند الگو های پلی مورفیسم گوناگونی را ایجاد نمایند.(Faugeron *et al.,* 2001).

- **مارکر RAPD:**

روش رپید[1] یا چند شکلی تکثیر شده تصادفی آسان،سریع است و افراد گونه های مشابه به خوبی از همدیگر تمیز داده می شوند . می تواند اطلاعات ژنتیکی را حتی در سطح درون کلونی[2] تعیین کند که برخی از سایر روشها از قبیل RFLP و آلوزیم ممکن است با محدودیت هایی روبرو باشند.استفاده از رپید برای تعیین اختلافات

[1] . Random Amplified Polymorphism DNA
[2] . intra clonal

جزئی بین افراد گونه های مشابه بکار می رود و این اختلاف جزئی ممکن نیست با استفاده از سایر روشها تعیین گردد.

داده های رپید به تنهایی اطلاعات کافی برای مطالعات فیلوژنی فراهم نمی کند. سایر روش ها مانند توالی ژنی – RFLP یا آنالیز آلوزیم برای بدست آوردن اطلاعات ترکیبی بایستی انجام گردد تا اطلاعات قابل اطمینانتر باشد (Yee,1999).

تنوع ژنتیکی جلبک قرمز *Mazzaella laminarioides* در نواحی شیلی به روش رپید بررسی گردید و از نظر ساختمان ژنتیکی اختلاف معنی د اری در مقیاس فواصل مختلف مشاهده گردید. از آنالیز مجموع ۲۸۸ گامتوفیت هاپلوئید با ۱۷ باند رپید پلی مورفیک ، ۲۰۲ ژنوتیپ مولتی لوکوس مجزا تولید گردید. در این موضع متوسط تنوع ژنی دارای دامنه ای از ۰/۲۱۰ تا ۰/۲۴۹ بود (Faugeron *et al* .,2001) . آنالیز واریانس مولکولی در ایستگاههایی (کمتر از ۳۰ متر) تا حدودی معنی دار بود. در مقابل در مقیاس های فاصله ای بزرگتر (در میان ایستگاههای از ۵ تا ۶۰ کیلومتر)، افزایش فواصل جغرافیایی به نظر می رسد باعث افزایش جدایی بین جمعیت ها شود بطوریکه وجود موانع طبیعی از قبیل سواحل شنی یا دهانه رودخانه ها ممکن است نقشی در چنین جدایی ایفا کند. از این گذشته تمایز ژنتیکی قوی میان مکان هایی که با حداقل ۶۰ کیلومتر از هم فاصله دارند روی می دهد و این تمایز اجازه می دهد که افراد هر جمعیت با منشاء اصلی از طریق آنالیز متعارفی [1] از همدیگر جدا شوند.این رویکرد، مهاجران بالقوه از یک جمعیت به جمعیت دیگر را امکان شناسایی داده است.(Faugeron *et al.,* 2001) .

Yee در سال ۱۹۹۹ چهار پرایمر جهت ایجاد الگوی باند پلی مورفیک برای همه نمونه ها تحت دمای بهینه انتخاب کرد. در مجموع این پرایمر ها در ارتباط با مقیاس جغرافیایی مورد مطالعه بدلیل تفاوت درون جمعیتی زیاد، ناتوان بودند هرچند برای فواصل جغرافیایی بزرگ پرایمر CAGCACCCAC توانست *Gracilaria changii* مالزی را از *Gracilaria changii* جمع آوری شده از تایلند را از هم تمیز دهد(Yee, 1999) . در مطالعات بین گونه ای ،این پرایمرتوانست *Gracilaria changii* را از هر دو گونه *G.salicornia* و *G.edulis* جدا کند در حالی که پرایمر CAATCGCCGT نشان داد که یک امکان از هیبرید بین *G. Changii* و *G.salicornia* یا بین *G. Changii* و *G.edulis* وجود دارد. هردو پرایمر فوق نمونه های گراسیلاریا را از نمونه های سارگاسوم جدا ساختند..(Yee, 1999)

در مطالعات دیگر ، روش RAPD به منظور شناسایی جنسیتی جلبک دوپایه *Gracilaria gracilis* استفاده گردید. ۶۹ پرایمر الیگو نوکلئوتید دکامر بر روی ۲ گروه (۲ توده) از DNA آزمایش گردید که شامل ۵ نر هاپلوییید و دیگری از ۵ ماده هاپلوئید بود . یکی از این پرایمرها با توالی TCGTCACCCC ، یک بخش خاص bp ۴۳۰ برای نرها و نیز یک بخش خاص bp ۶۲۰ برای ماده ها ایجاد نمود. افراد دیپلوئید (تترا اسپوروفیت ها) ، وقوع مشترک این ۲ بخش را نشان دادند (Martinez *et al.,* 1999:1533).

[1] . canonical discriminant

در مطالعات دیگر در سواحل کودگدائو[1] و بندر ژان شان[2] به روش رپید و با استفاده از ۱۰آغازگر تصادفی باندهای ویژه جنسیت را در *Gracilaria lemaneiformis* بررسی کردند بطوریکه توسط پرایمر CGACCAGAGC باند ۱/۴ kb در گامتوفیت ماده و تترا اسپوروفیت مشاهده شد و توسط پرایمر CCGGCCTTAG باند ۰/۶ kb در گامتوفیت نر و تترا اسپوروفیت ظاهر شد.پرایمر TTCCCCGCGC باند ۰/۷۶ kb را در گامتوفیت نر و تترا اسپوروفیت پدیدار کرد و همچنین این پرایمر(TTCCCCGCGC) باند ۰/۷۲ kb را نیز در گامتوفیت ماده و تترا اسپوروفیت ظاهر کرد و پرایمرTTCCCCGACC باند ۰/۳۷ kb را تنها در گامتوفیت نر نمایان کرد(Xiangfeng et al., 1998: 147).

- **مارکر AFLP:**

AFLP[3] یا طول پلی مورفیسم قطعه تکثیر شده نیز روش دیگری است که با ثبات و اطمینان بیشتری انگشت نگاری DNA[4] را فراهم می کند. نتایج بدست آمده از آنالیز AFLP می تواند مرتبط با اطلاعات RAPD و اطلاعات تاکسونومی باشد و بدین ترتیب توصیف و ارزیابی بهتری از تنوع بیولوژیکی و ارتباط فیلوژنتیکی ارائه می دهد (Yee,1999). این مارکر به طور گسترده برای نقشه پیوستگی ژنتیکی ، شناسایی گونه، تعیین محل ژن، و شناسایی جایگاه صفت کمی استفاده می گردند.(Pang *et al*., 2010)

با استفاده از هشت جفت آغازگر AFLP شاخص تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت *G.lemaneiformis* در سه مکان از سواحل چینگدائو و یک مکان از وی های[5] چین ، سطوح پایینی از تنوع ژنتیکی را در این مکان ها نشان داد(Pang *et al., 2010*). دندروگرام UPGMA دو خوشه اصلی را نشان داد که یکی از آن ها مربوط به چینگدائو بود.این نتایج نشان می دهد که جمعیت های وحشی .*G .lemaneiformis* باهم پیوند تنگاتنگی دارند و تنوع ژنتیکی کمی در ژرم پلاسم وحشی در مناطق نمونه برداری وجود دارد.

- **بارکدینگ DNA:**

بارکدینگ DNA روشی است برای تاکسونومی که با استفاده از نشانگر ژنتیکی کوتاه در DNA موجودات ،تعلق آن به گونه های خاص را مشخص می کند و متفاوت از فیلوژنی مولکولی است و هدف اصلی آن تعیین رده بندی نیست بلکه شناسایی یک نمونه ناشناخته در وضعیتی از رده بندی شناخته شده می باشد. اگر چه گاهی اوقات بارکدها برای شناسایی گونه های ناشناخته و یا تشخیص این که چه گونه هایی بایستی با یکدیگر و یا جدا از یکدیگر قرار داده شوند بکار برده می شود ولی کاربردپذیری DNA بارکدینگ برای این اهداف مورد تردید است.

---

[1] . Qidgdao
[2] . Zhanshan Bay
[3] Amplified Fragment Lentgh Polimorphism-
[4] . fingerprinting DNA: الگوی تکرارهای متغیر پشت سر همDNA از یک توالی اصلی که منحصر به فرد است
[5]. Weihai

کاربردهای این روش، برای مثال شناسایی برگ گیاهان حتی وقتی گل و یا میوه در دسترس نباشد، شناسایی لارو حشرات که خصوصیات تشخیصی آنها نسبت به بالغین کمتر است، شناسایی رژیم غذایی جانوران بر اساس محتویات معده یا مدفوع و تشخیص فراورده های تجاری (برای مثال مکمل های گیاهی یا چوب) (Wikipedia13. October . 2012).

شناسایی گونه های گرایسلاریا تنها از طریق صفات مورفولوژیکی مشکل است و استفاده از توالی DNA، CO1 میتوکندری در درک حد و مرز تشخیص گونه های این تیره نتایج معتبرتری را نشان می دهد و DNA بارکدینگ می تواند روشی موثر در سطح تشخیص گونه ای و تحقیقات در زمینه تنوع زیستی و تاکسونومی باشد(Kim *et al.*, 2010).

مارکر SSR :

میکرو ساتلایت ها ،تکرار توالی ساده[1] نیز نامیده می شوند و در حال حاضر به طور گسترده ای به عنوان مارکرهای مولکولی در ژنتیک کاربردی و مطالعات تنوع زیستی در زمینه دریایی و علوم شیلاتی استفاده می شود. در حال حاضر مارکرهای میکروساتلایت برای ماکروجلبک ها و میکرو جلبک ها توسعه یافته است. میکروساتلایت ها توالی های کوتاهی از یک تا شش نوکلئوتید می باشند که به عنوان مثال (CT)n یا (CAG)n، که پنج تا دوازده و گاهی صدها بار تکرار شده اند. در بررسی هایی که تا کنون انجام پذیرفته است آنها به وفور در سراسر ژنوم تمام موجودات زنده پراکنده می باشند. این فراوانی به همراه تعداد زیادی از آلل ها ،نرخ بالایی از جهش را به دلایل ساختار منظم و ویژه آنها نتیجه می دهد و باعث می شود مارکرهای مولکولی بسیار مفیدی در سطح جمعیت باشند.پلی مورفیسم بالای میکروساتلایت ها می تواند مواردی که در آن انواع مارکرهای دیگر ناکام بوده اند را آشکار سازد.و به همین دلیل به طور ویژه برای گونه هایی که فاقد درجه بالایی از پلی مورفیسم می باشند از قبیل گونه های اصلاح شده (سویا) و یا گونه های کلونال(جلبک های پلانکتونی که چرخه جنسی مشخصی ندارند)استفاده می شوند.مقایسه انواع مختلف مارکرها نشان داده اند که میکروساتلایت ها درجه بالایی از پلیمورفیسم را نسبت به همه نوع مارکر عمومی نشان می دهد.بطوری که هم تنوع ژنتیکی و جریان ژن[2] می تواند توسط این مارکرها برآورد گردد(Medlin *et al.*, 2010) .

تنوع ژنتیکی در ۲ جمعیت از *G. chilensis* در سواحل شیلی با استفاده از ۶ مارکر میکروساتلایت ارزیابی شد و نسبتاً میزان پایینی از هتروزیگوتی با دامنه ای از ۰/۰ تا ۰/۵۱ معلوم گردید.این شش جایگاه کاندید خوبی برای ارزیابی میزان منابع ژنتیکی در گونه هایی که احتمالاً متحمل بهره برداری شدید در نواحی متعدد در طول سواحل شده اند می باشد. تغییر پذیری میکروساتلایت گونه هایی مورد بررسی با استفاده از ۴۰ نمونه از ده مکان مختلف در آبهای ساحلی شیلی آزمایش گردید.(۴ نمونه از هر مکان). و انتظار می رود که تنوع آللی مشاهده شده هترو زیگوس باشندو ۶ جایگاه پلی مورفیک در ۲ جمعیت تعیین گردید.(Guillemin *et al.*, 2004)

[1] . simple sequence repeat
[2] . gene flow

- **مارکر ISSR:**

نشانگر ISSR[1] یا مارکر بین توالی های تکراری ساده بطور بطور موفقیت آمیزی برای تشخیص جنسیتی و تجزیه و تحلیل ساختار ژنتیکی در گیاهان عالی بکار می رود. اساس این روش مبتنی بر PCR است. با استفاده از پرایمرهای اولیگونوکلئوتیدی شامل واحد های تکراری و به اندازه کافی نزدیک به هم می باشند.در این روش از توالی های تکراری برای طراحی پرایمر استفاده می شود . سادگی و سریع بودن این روش، عدم نیاز به دانستن توالی DNA ، تکرار پذیری بالا، نیاز به DNA کم ،(۵ تا ۵۰ نانوگرم) ، توزیع تصادفی در سطح ژنوم از مزایای آن بشمار میرود. (Danilova and Karlov., 2006; Geng *et al.,* 2009; Korpelainen *et al.,* 2008; Li and Jin ., 2008; Song *et al.,* 2010; Wang *et al.,* 2009; Younis *et al.,* 2008; Yuan *et al.,* 2009) .

در این روش DNA توسط واکنش زنجیر پلی مراز[2] با استفاده از اتصال یک پرایمر ISSR به توالی میکروساتلایت در '۳ یا پایانه '۵ تکثیر می یابد و اغلب به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی استفاده می گردد. به عنوان یک نشانگر غالب پرایمر ISSR تکرار توالی ساده میکروساتلایت را که در سراسر ژنوم یوکاریوتی به سرعت در حال تکامل است مورد هدف قرار می دهد(Qian, 2001).

- **مقایسه مارکرهای مولکولی SSR ، ISSR ، RAPD، AFLPS :**

نشانگرهای مختلف ممکن است مراتب مختلف از تنوع را نشان دهند(Powell *et al., 1996*). نشانگر مولکولی RAPD که در تعیین جنسیت جلبک دریایی استفاده می گردید Xiangfeng, 1998; Martinez *et al*., 1999; Sim, (2007)، دارای محدودیت های مختلف از جمله مارکری غالب بوده و جایگاه ژن همسان ، نامشخص[3] و حتی حساس به شرایط واکنش نشان می دهد. انتخاب نشانگر مولکولی بستگی به قابلیت تکثیر و سادگی آن دارد. بهترین نشانگر برای نقشه ژنوم ،مطالعات فیلوژنیک و شناسایی جنسی باید کم هزینه و از نظر نتایج قابلیت اطمینان باشد(Qian, 2001:441). روش RAPD دارای مزایای متعددی از جمله سادگی ، هزینه کمتر و با مقدار کمی از مواد گیاهی انجام پذیر است . این روش برای بسیاری از گونه های گیاهی با موفقیت بکار گرفته شده است. با این حال RAPD محدودیتهای مختلفی از جمله غالبیت ،هموزوژی جایگاه نامشخص و به خصوص حساس به شرایط واکنش است. به منظور حل برخی از این مشکلات ،روش جدید تکثیر تکرار توالی ساده داخلی (ISSR) که توسط تکثیر DNA بوسیله واکنش زنجیر پلی مراز با استفاده از اتصال یک پرایمر به توالی میکروساتلایت درپایانه '۳ یا '۵ و اغلب به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی استفاده می گردد. به عنوان یک نشانگر غالب ISSR تکرار توالی ساده میکروساتلایت را که در سراسر ژنوم یوکاریوتی به سرعت در حال تکامل است ، مورد هدف قرار می دهد. به عنوان یک نتیجه تکثیر ISSR تعداد بیشتری از قطعات پلی مورفیک را در هر پرایمر

---

1 Inter simple sequence repeat
2. PCR
3. uncertain locus homology

نسبت به روش RAPD آشکار می کند . این روش نیازی به دانش قبلی از توالی DNA برای طراحی پرایمر ندارد. مطالعات اخیر برتری ISSR را به RAPD بلحاظ قابلیت تکثیر جایگاه های پلی مورفیک گزارش می دهد(Qian, 2001)

نشانگرهای SSR بالاترین هتروزیگوسیتی مورد انتظار را دارند (۰/۶۰) ، درحالیکه نشانگر AFLP بالاترین نرخ مولتی پلکس موثررا دارا می باشد(۱۹). پارامترهای ،هتروزیگوسیتی مورد انتظار و نرخ مولتی پلکس به عنوان پارامترهای شاخص نشانگر می باشند و برای ارزیابی کل سیستم نشانگر استفاده می شود. مقایسه شدت همبستگی ماتریس شباهت ژنتیکی در تودهٔ سویا پرورشی و وحشی بر اساس ، AFLPs و SSR ، تجانس بین این تست ها را نشان می دهد. با این حال همبستگی داده های نشانگر RAPD نسبت به سایر سیستم ها کمتر بود.زیرا RAPDs برآورد بالاتری از شباهتهای خصوصیت ذاتی خود تخمین میزند(Powell, 1996).

تمایز جنسیتی در جلبک دریایی در پرورش آنها جهت انتخاب نژاد برای اصلاح کیفیت مقادیر بیشتر محصولات آنها سودمند است. (Whyte, 1981).

به این ترتیب توسعه یک روش مولکولی مناسب و قابل اعتماد برای شناسایی و نمایش مرحله زندگی ایزومورفیک از آگاروفیت انگیزه ای جهت پرورش صنعتی آگاروفیت می باشد که منجر به بهبود محصول خواهد گردید. نشانگرهای مولکولی ابزار ارزشمندی برای شناسایی و بررسی تنوع ژنتیکی درون گونه ای و بین گونه ای از جمعیت های هم نژاد[1] بوده است. علاوه بر این بکارگیری نشانگر مولکولی برای تشخیص مراحل جنسی ابزاری برای تمایز در مراحل زندگی گونه ها ، حتی در مرحله نابالغی[2] می باشد که بطور معمول نیازمند صرف زمان طولانی برای توسعه و شناسایی اندام های تولید مثلی آنها است Xiangfeng, 1998; Martinez et al., 1999; Sim, 2007) .

انتظار می رود که دستاوردهای این پژوهش بتواند کمک موثری در حل بخشی از ابهامات موجود فرا راه بهره برداری و مدیریت پویای ذخایر این آبزی در آبهای جنوبی کشور بنماید. پژوهش حاضر تلاشی است در راستای دستیابی به اهداف زیر:

- تشخیص تنوع جنسیتی با استفاده از مارکر مولکولی ISSR
- ارزیابی نشانگرهای ISSR مخصوص در تشخیص مراحل مختلف زندگی در جنس های نر و ماده و تتراسپوروفیت
- بررسی تنوع ژنتیکی بین افراد درون جمعیت های مختلف *G.corticata*

[1] . inbreeding
[2] . juvenile

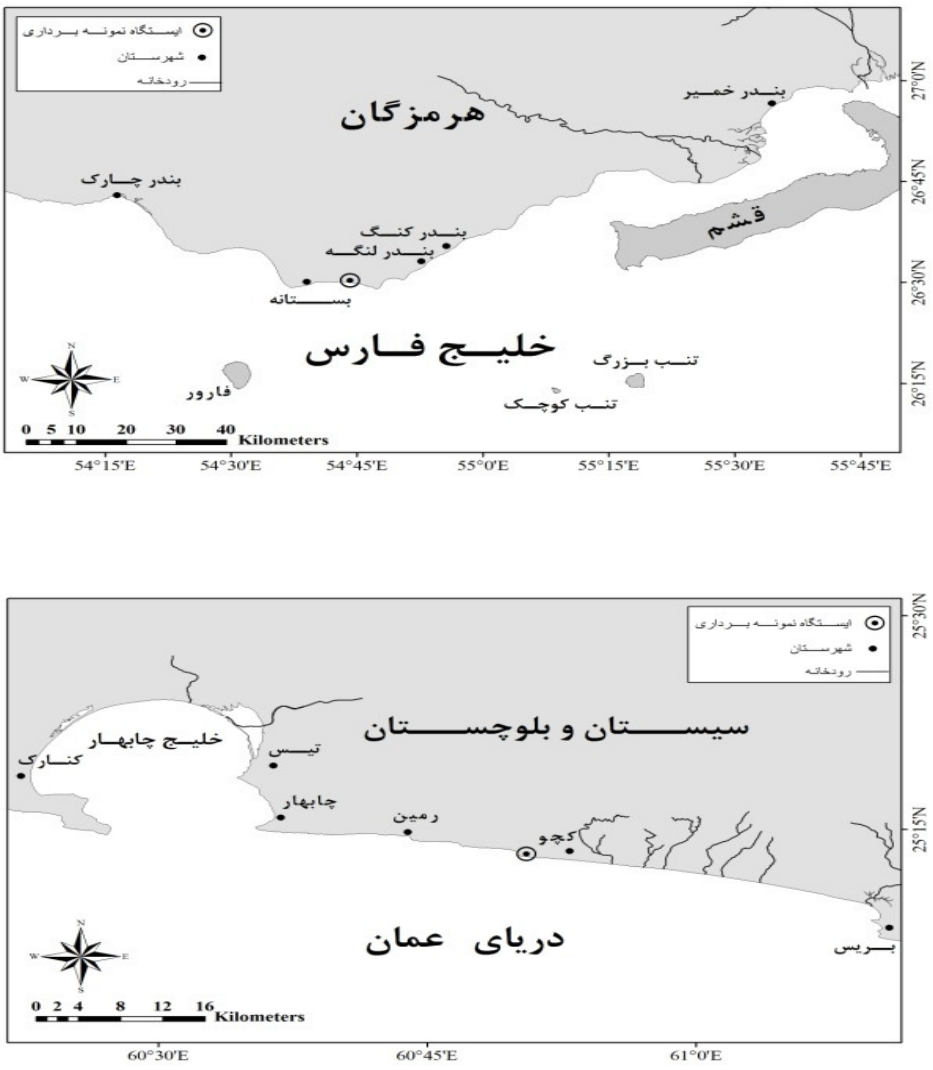
۲. مواد و روش ها

۲-۱. منطقه مورد بررسی

نمونه ها ی جلبک *G. corticata* از مناطق بین جزر ومدی صخره ای در نواحی از سواحل خلیج فارس (سواحل بستانه از توابع بندر لنگه در استان هرمزگان به ترتیب با طول و عرض جغرافیایی E ´ ۳۸ °۵۴، N ´۳۰ °۲۶) و سواحل دریای عمان(منطقه لیپار در شرق چابهار به ترتیب با طول و عرض جغرافیایی E ´ ۴۹ °۶۰، N ´۱۵ ° ۲۵) در ماه های اردیبهشت ، خرداد و مرداد ۱۳۹۲ بر اساس روش نمونه برداری تصادفی و از نظر زمانی و مکانی براساس تجربات حاصل از گزارشات تحقیقاتی (قرنجیک و روحانی ، ۱۳۸۹)جمع آوری گردید(جدول ۲-۱). محدوده مکان نمونه برداری در شکل (۲- ۱) نشان داده شده است.

جدول۲-۱: موقعیتهای جغرافیایی، مناطق مورد مطالعه در سواحل خلیج فارس و دریای عمان- ۱۳۹۲

ردیف	نام منطقه	تاریخ نمونه برداری	عرض جغرافیایی	طول جغرافیایی
۱	بستانه (غرب بندر لنگه-خلیج فارس)	۹۲/۲/۸	۲۶° ۳۰´N	۵۴° ۳۸´E
۲	بستانه (غرب بندر لنگه-خلیج فارس)	۹۲/۳/۷	۲۶° ۳۰´N	۵۴° ۳۸´E
۳	لیپار (شرق چابهار-دریای عمان)	۹۱/۵/۴	۲۵ ° ۱۵´N	۶۰° ۴۹´E



شکل۲- ۱: نقشه مناطق نمونه برداری در سواحل جنوبی ایران

شکل۲-۲ : منطقه جمع آوری نمونه جلبک در بستانه

۲-۲- روش نمونه‌برداری

به منظور جمع آوری نمونه ها با توجه به سایت "Iranhydrography.org" جدول جزر و مدی تهیه و بر اساس آن در زمان مناسب نمونه برداری از ایستگاه های مورد نظر انجام گردید.

تعداد ۳۰ نمونه از جلبک *G. corticata* از منطقه بستانه در هریک از ماه های اردیبهشت و خرداد و ۴۰ نمونه از منطقه لیپار به طور تصادفی جمع آوری شد و بدین منظور چند تال (ریسه) از هریک از نمونه های جلبکی پس از شستشو توسط آب دریا و پاک شدن از گل و لای ،جهت بررسی ریخت شناسی و تشریحی وهمچنین استخراج DNA داخل ظروف نمونه برداری ۵۰ میلی لیتری فیکول تیوب[1] قرار داده شد و فضای خالی لوله ها از آب دریا پر گردید و کد آن بر روی ظرف نمونه برداری ثبت گردید و تاریخ نمونه برداری و موقعیت جغرافیایی یادداشت و نمونه ها داخل یخدان بر روی یخ نگهداری گردید.(درب لوله ها فقط در هنگام حمل توسط هواپیما محکم بسته شد تا موجب خفگی گیاه نشود) و جهت بررسی آزمایشگاهی به تهران منتقل شد (شکل ۲-۳).ضمناً ۳ لیتر از آب دریا از محل نمونه برداری همراه نمونه ها به آزمایشگاه ارسال گردید تا در محیط کشت پس[2] استفاده گردد. عملیات آزمایشگاهی در آزمایشگاه ژنتیک موسسه تحقیقات جنگل ها و مراتع کشور انجام شد.

شکل ۲-۳ : حمل نمونه های جلبک *G. corticata* به آزمایشگاه

۳-۲- روش آماری

۱-۳-۲- جامعه آماری

جلبک های قرمز گونه *G. corticata* در مناطق بستانه از توابع بندر لنگه از استان هرمزگان و لیپار از استان سیستان و بلوچستان به عنوان جامعه آماری در نظر گرفته شد.

---

1. ficoll tube
2. PES : Provasolis Enriched Sea water medium

۲-۳-۲-روش تجزیه و تحلیل داده ها

از آنالیز واریانس یکطرفه جهت مقایسه ی میانگین تیمارهای مختلف استفاده گردید . آزمون ها در محیط نرم افزار SPSS version 18 انجام شد .باند های ایجاد شده از محصول PCR توسط نرم افزار Excel و Notpad جهت بررسی لازم در نرم افزارهای Genalex و PopGen آماده سازی گردید.

امتیاز دهی باند های ایجاد شده توسط ISSR[3] برای حضور (۱) و یا عدم حضور (۰) کد گذاری شد و مورد تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزارهای Genalex و PopGen قرار گرفت. مولفه های هماهنگ اصلی[4] جهت یافتن قرابت بین جمعیت ها و افراد داخل جمعیت ها تجزیه و تحلیل گردید.

٤-۲- روش تحقیق آزمایشگاهی

۱-٤-۲- بررسی ریخت شناسی

ریسه های جلبکی بکمک برس و شستشو با آب مقطر از انگلها و اپی فیت ها پاک گردید(شکل ۲-۴) و قسمتی از تال در هر نمونه با حفظ شماره جهت بررسی های مورفولوژیکی در مخلوط ۴٪ فرمالین و آب دریا نگهداری شد (Byrne *et al,* 2002) و مقداری از بافت های در حال رشد (حدود ۵ تا ۲۰ گرم وزن تر)جهت استخراج DNA در$^{\circ}C$ ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردید. مابقی هر نمونه در محیط کشت PES (Provasoli, 1968) با$^{mg}/_{ml}$ ۱۰ اکسید ژرمانیوم (Geo_2)در دمای ۱±۲۵ زیر نور سرد سفید از ۱۵ میکرومول فوتون بر متر مربع ثانیه($m^{-2}\ s^{-1}$) با دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری گردید و به کمک پمپ هوا اکسیژن آن تامین گردید(Byrne *et al*, 2002).(شکل۲- ۵)

شکل ۲-٤ : مراحل پاک سازی نمونه های جلبکی از گل و لای و اپی فیت ها (a تا c)به منظور نگه داری بافت های در حال رشد آن در $^{\circ}C$ ۸۰-

[3]. ISSR band scoring
[4]. PCA

شکل ۲-۵ : :نگهداری جلبک های منطقه بستانه و لیپار در محیط کشت PES

جهت تهیه مقاطع از نمونه های مورد بررسی در محیط کشت PES ابتدا قطعه ای از تال داخل محلول فرمالین ۴٪ با آب دریا به مدت ۱۰ دقیقه فیکس گردید. و سپس عمل برش گیری انجام شد ولی برای نمونه هایی که از ابتدا در فرمالین ۴٪ آب دریا نگهداری و تثبیت شده بودند جهت جلوگیری از متلاشی شدن بافت هنگام برش گیری قطعه ای از تال به مدت حدود یک ساعت در الکل مطلق (۹۶٪) قرار داده شد و سپس عمل برش گیری انجام گردید. تهیه مقاطع بصورت دستی و به کمک تیغ معمولی انجام شد(Byrne *et al*, 2002). و رنگ آمیزی مقاطع تهیه شده از نمونه ها به مدت ۲ الی ۳ ثانیه در رنگ آبی متیلن قرار داده شد(Yamamoto, 1986). تشخیص مورفولوژیک نمونه ها بر اساس مشاهده ماکروسکوپی سیستوکارپ در جنس ماده و یا ساختار تشریحی اسپرماتانجیال کانسپتاکل در مورد جنس نر و تتراسپورها در تتراسپوروفیت با استفاده از میکروسکوپ BH_2 Olympus با لنز های x ۱۰، x ۴۰و x۱۰۰و حداکثر بزرگنمایی x۲۰۰۰ بررسی گردید.

۲-٤-۲- مطالعات مولکولی:

در مطالعه مولکولی جلبک قرمز *G. corticata* استخراج DNA از دو روش CTAB تغییر یافته (Hu and Zhou, 2001) و SDS (Watfier *et al.*, 2000) انجام گردید.دستگاه های مورد استفاده برای مطالعات مولکولی در جدول (۲-۲) نشان داده شده است.

جدول ۲-۲ : دستگاه های مورد استفاده برای مطالعات مولکولی

نوع دستگاه	نوع دستگاه
سانتریفیوژ(Centrifuge) مدل Eppendorf 5417 C	دستگاه ترموسیکلر(PCR)مدل Eppendorf
سانتریفیوژ با دور پایین مدل سیگما	تقویت کننده ولتاژ
سانتریفیوژ (خلاء) مدل Eppendorf concentrator 5301	ماکروویو
بن ماری	مانیتور سونی مشاهده باندها
ورتکس	چاپگر Mitsubishi p91
(Shaker) شیکر	Gel Documention
اسپکتروفتومتر مدل CECIL CE 2502	تانک الکتروفورز
ترازو دقیق دقت.۰/۰۰۰۱	ترازو دقیق دقت. ۰/۱

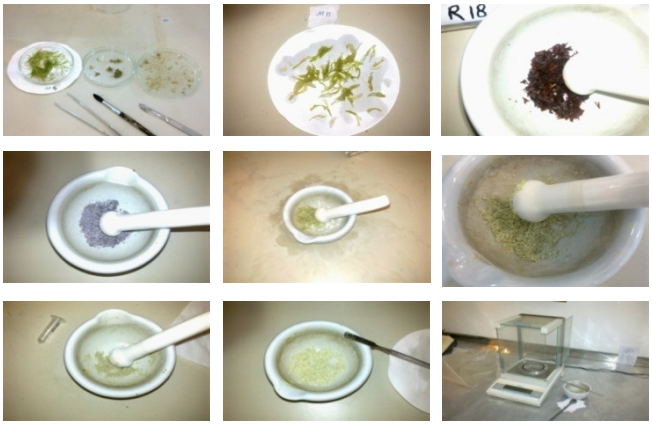
- استخراج DNA به روش CTAB:

بافر استخراج در این روش طبق جدول ۲-۳ می باشد.

جدول ۲-۳: بافر استخراج DNA به روش استیل تری متیل آمونیوم بروماید:

	غلظت نهایی	میزان
(pH=8)Tris- HCL	100 mM= 0.1 M	1.5 cc
Na_2 EDTA	50 mM	1.5 cc
Nacl	1.5 M	4.5 cc
CTAB	4 %	0.6 gr
Sodium sulfite	50 mM	0.75 cc
β-mercapto ethanol	0.3 %	45 µl
PVP	1.5 %	0.23 gr
dd water		تا حجم 15 cc
حجم کل محلول		15 cc

- تالوس ها با دستمال کاغذی پاک وخشک گردید و به کمک بوته چینی در نیتروژن مایع(LN) بخوبی سائیده شد تا پودرکاملاً نرم و یکنواختی تبدیل شود و ۰/۵گرم از آن به تیوپ ۲ cc انتقال یافت. پودر کردن بافت گیاهی در ازت مایع موجب تخریب دیواره سلولی و سهولت دسترسی محلول استخراج به سلول ها می شود(شکل ۲-۶).

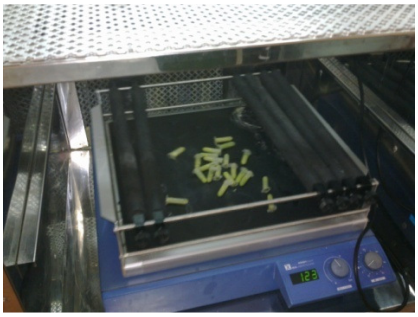


شکل ۲-٦: مراحل پودر کردن بافت جلبک در ازت مایع

- ۸۰۰ میکرولیتر بافر استخراج که قبلاً در ۶۵°C گرم شده بود به هر یک از تیوپ های فوق اضافه شد و به مدت ۱/۵ ساعت در حمام آب گرم ۶۵°C قرار گرفت و همواره عمل تکان دادن بمدت ۱/۵ ساعت هر ۱۰ دقیقه یک بار انجام گردید(شکل ۲-۷)

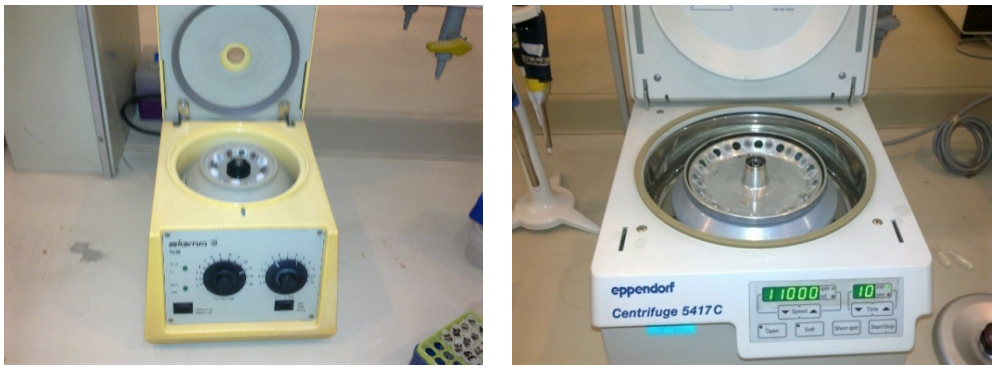
شکل ۲-۷: نگهداری نمونه ها در بن ماری ٦٥°C

- لوله ها از حمام آب گرم خارج گردید و به مدت ´۱۰ بر روی یخ خنک گردید
- مخلوط سرد شده با هم حجم خود با (کلروفرم : ایزو آمیل الکل)(۱:۲۴) به کمک ورتکس مخلوط گردید و بر روی شیکر به مدت ´۱۵ در دمای اتاق قرار گرفت(شکل ۲-۸).



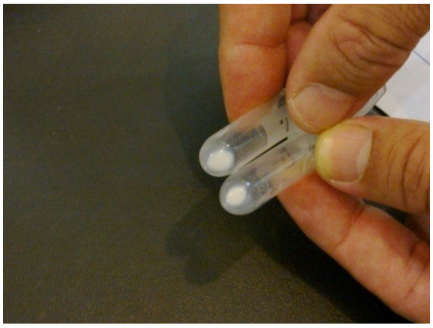
شکل ۲-۸: نگهداری نمونه ها بر روی شیکر به مدت ´۱۵

- لوله های فوق به مدت ´۱۰ در rpm ۱۰۵۰۰ سانتریفوژ شد(شکل ۲-۹)



شکل ۲-۹: سانتریفوژ نمونه ها دردور بالا (شکل سمت راست) و مدت زمان کوتاه و موردی (شکل سمت چپ)

- مراحل ۴ و ۵ تکرار گردید و به کمک سمپلر مایع روئی در تیوپ جدید ریخته شد
- به تیوپ فوق میزان $\frac{۲}{۳}$ حجم الکل ایزوپروپیلیک ۷۰ ٪ اضافه شد و خوب مخلوط گردید و در °C ۴ در طول شب و یا °C ۲۰- به مدت ´۲۰ نگهداری شد
- تیوپ های فوق به مدت ´۱۰ در rpm ۱۰۵۰۰ سانتریفوژ شد تا پلیت[5] ایجاد شود(شکل ۲-۱۰).



شکل ۲-۱۰: تشکیل پلیت از نمونه ها

- مایع رویی دور ریخته شد و پلیت های ایجاد شده با اتانول ۷۰ ٪ سرد شستشو داده شد و سپس در rpm ۱۱۰۰۰ به مدت ´۱۰سانتریفوژ گردید و پس از ریختن مایع رویی پلیت خشک گردید
- پلیت ایجاد شده فوق در μl ۳۰۰ (۱۰:۱) TE در دمای °C ۴ در طول شب حل شد و قبل از مرحله بعدی Spin کوتاه انجام گردید

[5]. pellet

- به تیوپ های فوق میزان ۴ μl {RNase A } و ۲ μl {Proteinase k} افزوده و به مدت ۱ ساعت در حمام آب گرم ۳۷ °C نگهداری گردید .
- افزودن هم حجم (فنول:کلروفرم:ایزوآمیل الکل)(۱:۱) و مخلوط نمودن آن و ورتکس کوتاه و سانترفیوژ در ۱۳۰۰۰rpm به مدت ´۱۵ و لایه بالایی جمع آوری گردید و به تیوپ جدید منتقل شد
- افزودن هم حجم (کلروفرم:ایزوآمیل الکل) و مخلوط نمودن آن و ورتکس کوتاه و سانتریفیوژ در ۱۳۰۰۰rpm به مدت ´۱۵ و لایه بالایی آن جمع آوری و به تیوپ جدید منتقل گردید.
- به تیوپ فوق $\frac{۱}{۱۰}$ حجم آن سدیم استات (۰/۲ M) یا آمونیم استات (۱۰mM) و ۲ حجم اتانول٪ ۱۰۰ سرد افزوده و مخلوط گردیدد.(در طول شب در ۷۰ °C- یا ۲ ساعت در ۷۰°C-)
- تیوپ ها در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ´۱۰ سانتریفیوژ گردید و پلیت ایجاد شده خشک شد و سپس با الکل ۷۰٪ و سانتریفیوژ در ۱۳۰۰۰rpm به مدت ´۳ و دورریختن الکل شستشو گردید و پس از وکیوم خشک شد و نهایتاً در ۱۰۰ μl- ۲۰۰ μl(۰/۱: ۱۰)TE حل شد. و در ۷۰ °C- نگهداری گردید(شکل ۲-۱۱).

شکل ۲-۱۱: وکیوم و خشک شدن نمونه ها پس از شستشو و حل آن ها در TE

- استخراج DNA به روش SDS:

بافر استخراج در این روش طبق جدول ۲-۴ می باشد.

جدول ۲-٤: بافر استخراج DNA به روش سدیم دودوسیل سولفات:

	غلظت نهایی	میزان
Tris- HCL	100 mM	6 cc
EDTA	50 mM	6 cc
Nacl	500 mM	6 cc
SDS	20%	1.8
PK (پروتئین کیناز)	$20^{mg}/_{ml}$	50 ml
حجم کل محلول		20 cc

- ۱۰mg ریسه خشک شده جلبک در (سلیکاژل) به کمک بوته چینی در نیتروژن مایع(LN) بخوبی سائیده شد تا پودرکاملاً نرم و یکنواختی تبدیل شود و در تیوپ ۲cc نگهداری شود
- نگهداری روی یخ تا تمام نمونه ها سائیده شود
- افزودن cc ۱/۵ بافر استخراج و بطور قوی تکان داده شد
- نگهداری تیوپ ها بطور افقی در ۳۷°C به مدت ´۳۰ با تکان دادن مرتب
- سانتریفیوژ در rpm۱۳۰۰۰ به مدت ´۱۵
- انتقال سوپر ناتانت در تیوپ جدید
- افزودن RNase، ۱۵ μl($۲\ ^{mg}/_{ml}$)
- نگهداری در ۳۷°C به مدت ´۶۰
- انتقال تیوپ به روی یخ و نگهداری برای ´۳۰ و گهگاهی به آرامی تکان داده شد
- سانتریفیوژ در rpm۱۳۰۰۰ به مدت ´۱۵ در ۴°C
- انتقال cc ۱/۲ از سوپر ناتانت به تیوپ جدید
- افزودن ۸۰۰μl ایزوپروپانل سرد ۲۰°C – و به ارامی مخلوط شد (چند مرتبه)
- نگهداری تیوپ ها در ۲۰°C – در طول شب
- سانتریفیوژ در rpm۱۳۰۰۰ به مدت ´۳۰ در ۴°C
- سوپر ناتانت دور ریخته و DNA سه مرتبه با ml ۱ اتانول ۷۰٪ سرد شسته شود(طی سانتریفیوژ rpm ۳۰۰۰ به مدت ´۱۰ برای سه بار شستشو)(هر شستشو سه دقیقه)
- پلیت خشک شود و در ۱۰۰μl ،بافر (۱۰ : ۰/۱)TE حل شد

۵-۲-کنترل کمی و کیفی DNA :

استفاده از مارکرهای مولکولی در انجام واکنش های PCR نیازمندDNA خالص و با کیفیت بالا می باشد بنابراین ضرورت دارد قبل از شروع واکنش ها ، کیفیت و خلوص DNA استخراج شده تعیین گردد.

۱-۵-۲- کنترل کمی DNA:

کنترل کمی DNA ژنومی توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل CECIL CE 2502 انجام شد. بدین منظورکریستال ها توسط الکل ۷۰٪ و آب مقطر ۲ بار تقطیر شستشو گردید و و جهت کالیبره کردن، دستگاه با کریستال شاهد محتوی ۱۰۰۰ μl آب مقطر ۲ بارتقطیر صفر گردید و کریستال دوم نیز حاوی ۱۰ μl اسید نوکلوئیک و ۹۹۰ μl اب مقطر ۲ بارتقطیر با طول موجهای ۲۳۰، ۲۶۰ ، ۲۸۰ و ۳۲۰ نانومتر به ترتیب جهت تعیین پلی ساکارید ،اسید نوکلوئیک ، پروتئین و سایر مولکول های بافت در نظر گرفته شد و میزان اسید نوکلوئیک نیز بر حسب $^{ng}/_{\mu l}$ توسط فرمول (۲-۱) تعیین گردید:

فرمول ۲-۱-

$$q = (\lambda\ 260 - \lambda\ 320) \times 5000$$

در این فرمول:

میزان عددی اسید نوکلوئیک=q

طول موج اسید نوکلوئیک= λ_{260}

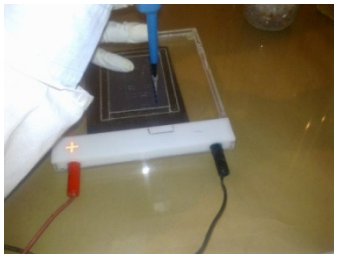
طول موج سایر=λ_{320}

شکل ۲-۱۲ : کنترل کمی DNA بوسیله اسپکتروفتومتر

۲-۵-۲- کنترل کیفی DNA:

کنترل کیفی DNA ژنومی توسط الکتروفروز مدلCECIL CE 2502 با تزریقDNA بر ژل آگارز ۰/۸ ٪ همراه بافر TBE 1 X و۲ μl اتیدیوم بروماید به مدت ۲۰ دقیقه تا ۱ ساعت در ولتاژ ۵۰ ولت و جریان ۲۵ آمپر ارزیابی گردید.بدین منظور از ۲ تا ۳ میکرولیتر ، DNA بکمک ۱ μl ماده رنگی دای در داخل تیوپ ۲۰۰ μlمخلوط و سپس داخل چاهک در ژل آگارز ۰/۸ ٪به کمک سمپلر بارگذاری شد. و در نهایت در زیر نور ماوراء بنفش مشاهده شد. شدت باند حاصل از DNA و همچنین در صورتی که باند ایجاد شده بر روی ژل آگارز کاملاً مشخص ، واضح و منفرد و بدون هرگونه اسمیر باشد دلالت بر کیفیت بالای DNA و عدم پارگی و آسیب DNA استخراج شده دارد.

(رنگ دای برای مشاهده تزریق DNA روی ژل آگارز و اتیدیوم بروماید برای مشاهده نوار DNA بر روی ژل در دستگاه ژل داک بکار برده می شود).



شکل ۲-۱۳: کنترل کیفی DNA بوسیله الکتروفرز ژل آگارز

۲-۶- رقیق سازی و همسان سازی غلظت DNA

DNA استخراج شده توسط TE(۱۰:۱) تا میزان $5\ ^{ng}/_{\mu l}$ رقیق گردید .(رقیق کردن DNA توسط آب مقطر ۲ بار تقطیر نیز انجام میگردد)

برای رقیق سازی غلظت همه نمونه های DNA با غلظت تعیین شده از فرمول زیر استفاده گردید(فرمول ۲-۲)

(فرمول ۲-۲)

$N_1V_1=N_2V_2$

که در آن:

N_1 = غلظت DNA در محلول پایه

V_1 = حجم محلول پایه

N_2 = میزان DNA نمونه مورد نظر در محلول آماده مصرف

V_2 = حجم کل محلول

۲-۷- واکنش زنجیره ای پلیمراز[6]

در واکنش زنجیره ای پلیمراز ،غلظت مناسب از DNA ،کلرید منیزیم و مطلوب بودن دمای اتصال آغازگرها به DNAتک رشته ای برای مشاهده باندهای واضح حائز اهمیت می باشد بطوریکه عدم رعایت آن باعث اتصالات غیر اختصاصی و یا عدم تکثیر باند می شود.

[6] . PCR

۱-۷-۲- رقیق سازی پرایمر

پس از سانتریفوژ کوتاه تیوپ های حاوی پرایمرها ، بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده بکمک آب مقطر ۲ بار تقطیر از پرایمر فوق نسبت ۱۰ به ۱ تهیه گردید.بدین منظور در ۲۰ تیوپ PCR (۰/۲ میلی لیتری)به ترتیب برای پرایمرهای A، B، C، AB ، ABC_1، ABC_2 و .... مقادیر ۹۰μl آب مقطر ۲ بار تقطیر اضافه شد و از هریک پرایمرهای فوق الذکر میزان ۱۰ µl به تیوپ ها اضافه گردید و بکمک عمل پر و تخلیه توسط سمپلر و ضربه توسط انگشت نشانه مخلوط گردید .

۲-۷-۲- مواد مورد نیاز برای واکنش زنجیره ای پلیمراز

بر اساس نتایج کمی و کیفی DNA استخراج شده نمونه های مورد بررسی ، غلظت DNA در هر واکنش ۵۰ میکرولیتری مقادیر ۲ تا ۲/۷ میکرولیتر از DNA رقیق شده فوق(Template DNA) به هر یک از نمونه ها تعلق گرفت و طبق دستورالعمل شرکت سازنده پرایمر برای هر یک از نمونه ها میزان ۵ میکرولیتر بافر x ۱۰ [۷]، سه میکرولیتر $Mgcl_2$، ۲/۵ میکرولیتر پرایمر۱:۱۰، ۱ میکرولیتر dNTP و در نهایت ۰/۵ میکرولیتر آنزیم Taq پلی مراز [۸]منظور گردید و محلول فوق توسط ۳۵/۴ تا ۳۶ میکرولیتر آب مقطر ۲ بار تقطیر [۹] برای هر یک از نمونه ها به حجم ۵۰ میکرولیتر رسانده شد.ولی برای انجام هر واکنش PCR حجم ۲۵ میکرولیتر از آن استفاده گردیدجدول (۲-۵).

جدول ۲-۵ : مواد مورد نیاز برای واکنش زنجیره ای پلی مراز

اجزا	حجم مورد استفاده(µl)	غلظت نهایی
بافر x ۱۰	۵	۱ x
Mg Cl2	۳	۱ mM
پرایمر	۲/۵	۱۰ µM
d NTP	۱	۰/۲ µM
آنزیم Taq پلیمراز	۰/۵	۲/۵ u
DNA	۲ تا ۲/۷	۵ ng
dd H_2O	تا ۵۰	

۳-۷-۲- آغاز گرهای مورد استفاده در واکنش زنجیره پلیمراز

پرایمرهای مورد استفاده طبق جدول (۲-۶) و سفارش به شرکت QIAGEN آلمان با چگالی نوری ۰/۰۲ تهیه گردید.

در این مطالعه از ۲۰ آغازگر مولکولی ISSR استفاده گردید که تنها ۴ گروه از آنها ،قابلیت پلی مورفیسمی DNAژنومی را صد درصد نشان دادند.

با توجه به قابلیت پرایمرها در نشان دادن پلی مورفیسمی در نهایت از چهار پرایمر استفاده شد.

---

[7] . 10 x PCR Buffer
[8] . Taq DNA polymerase
[9] . Dionised H_2o

جدول ۲-٦- آغاز گرهای مورد استفاده برای نشانگر ISSR

کد پرایمر	توالی پرایمر	کد پرایمر	توالی پرایمر
A	**5'-(AG)$_8$C-3'**	C1	**5'-(GA)$_6$AG-3'**
A1	5'-(GT)$_6$CC-3'	C2	**5'-(GA)$_6$GT-3'**
A2	5'-(GA)$_7$GT-3'	C3	**5'-(CGG)$_6$-3'**
A3	5'-(GA)$_6$AC-3'	**AB**	**5'-(GA)$_6$CC-3'**
B	5'-(CA)$_6$GT-3'	AB1	**5'-(ACG)$_7$-3'**
B1	5'-(GAA)$_6$-3'	AB2	**5'-(GAC)$_7$-3'**
B2	5'-(AAG)$_7$-3'	AB3	**5'-(CCA)$_6$-3'**
B3	5'-(GGA)$_6$-3'	**ABC1**	**5'-(GA)$_6$GG-3'**
B4	5'-(CGA)$_7$-3'	ABC2	**5'-(CA)$_6$GG-3'**
C	**5'-(AG)$_8$T-3'**	ABC3	**5'-(GA)$_8$C-3'**

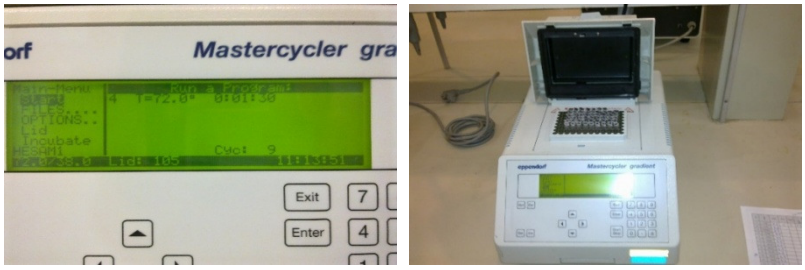
٤-۷-۲- چرخه حرارتی

تکثیر DNA با استفاده از آغازگرهای ISSR و DNA ژنومی با برنامه ریزی دستگاه ترموسایکلر[10](شکل ۲- ۱۴) صورت گرفت. بدین منظور مراحل واسرشت سازی اولیه[11] ،واسرشت سازی[12] ،اتصال [13] ، توسعه آغازگر[14]، توسعه نهایی آغازگر (تکمیل سنتز آغازگر) ، مرحله پایانی نگهداری محصول PCR در دمای ۴ درجه سانتیگراد تا زمان استفاده و چرخه های تکراری برای پرایمر A ، C ، AB و ABC1 و مدت زمان هر مرحله طبق جدول ۲-۷ انجام گرفت.

جدول ۲-۷- زمان و دمای لازم برای سه مرحله باز شدن ،اتصال و بسط در هر یک از چرخه های حرارتی آغازگرهای ISSR در دستگاه ترموسایکلر

کد پرایمر	مرحله ۱ واسرشت سازی اولیه		مرحله۲ واسرشت سازی		مرحله ۳ اتصال پرایمر		مرحله ٤ توسعه آغازگر		مرحله ٥ توسعه نهایی آغازگر		مرحله ٦		چرخه های تکراری (مراحل ۲-٤)
	دما(°c)	زمان(دقیقه)	دما(°c)	زمان(دقیقه)	دما(°c)	زمان(دقیقه)	دما(°c)	زمان(دقیقه)	دما(°c)	زمان(دقیقه)	دما(°c)	زمان(دقیقه)	
A	۹۵	۵	۹۵	۱	۳۸	۱	۷۲	۱/۵	۷۲	۱۰	۴	∞	۴۰
C	۹۵	۵	۹۵	۱	۳۵	۱	۷۲	۱/۵	۷۲	۱۰	۴	∞	۴۰
AB	۹۵	۵	۹۵	۱	۲۸	۱	۷۲	۱/۵	۷۲	۱۰	۴	∞	۴۰
ABC1	۹۵	۵	۹۵	۱	۳۰	۱	۷۲	۱/۵	۷۲	۱۰	۴	∞	۴۰

10. Mastercycler gradien
11. Pre denaturing stage
12. Denaturing stage
13. Annealing stage
14. Extention stage



شکل ۲-۱٤ : دستگاه ترموسایکلر جهت تکثیر DNA ژنومی در واکنش زنجیره پلی مراز

مرحله واسرشته سازی DNA الگو در دمای زیاد (۹۵ درجه سانتیگراد) انجام شده و رشته های مکمل از همدیگر جدا می شوند.

مرحله اتصال آغازگر در دمای کمتر (۳۸- ۲۸ درجه سانتیگراد) نسبت به مرحله واسرشت سازی صورت می گیرد تا شرایط اتصال آغازگرها ی الیگونوکلئوتیدی به ناحیه مکمل بر روی DNA الگو فراهم می شود.

مرحله توسعه آغازگر که معمولاً در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد صورت می گیرد ، ساخته شدن DNA جدید از طریق افزوده شدن نوکلئوتیدها به انتهای آغازگر بر مبنای الگوگیری از رشته DNA موجود و پلیمریزه شدن نوکلئوتیدها امکان پذیر می شود. آغازگرهای الیگونوکلئوتیدی در حضور ۴ دی اکسی نوکلئوتید(dTTP, dCTP dATP , dGTP) و شرایط بافری خاص توسعه می یابند و در نتیجه ناحیه DNA الگو بین دو آغازگر تکثیر می شود. بدین ترتیب در نخستین دور PCR دو رشته جدید ایجاد می شود و تعداد کپی های ناحیه هدف دو برابر می شود، یعنی پس از اولین دور PCR رشته های اولیه ، دو رشته جدید کوتاهتر از رشته های اولیه را خواهیم داشت. معمولاً چرخه های PCR ۲۵ تا ۴۰ بار تکرار می شوند. واکنش زنجیره ای پلیمراز با استفاده از آنزیم DNA تک پلیمراز [۱۵] که از نوعی باکتری گرما دوست بنام ترموس آکواتیکوس گرفته شده است مزایای فراوانی دارد. این آنزیم در برابر دما دارای ثبات می باشد. بنابراین پس از هر چرخه ای که در آن رشته های DNA الگو توسط حرارت از هم باز می شود فعالیت خود را از دست نمی دهد و نیاز به افزودن پلیمراز جدید منتفی می گردد.این تحقیق با استفاده از آغازگرهای ISSR انجام شد و بر اساس الگوی باندی قابل امتیاز دهی از بین تمامی آغازگرها، تنوع جنسیت های جلبک *G. corticata* مورد بررسی قرار گرفت. تکثیر قطعات DNA با واکنش زنجیره پلی مراز در حجم ۲۵ میکرو لیتر انجام گرفت. واکنش PCR با واسرشت سازی DNA ژنومی در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه آغاز و با ۴۰ چرخه شامل واسرشت سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه ، اتصال آغازگر در دمای مناسب برای هر آغازگر به مدت یک دقیقه توسعه رشته جدید

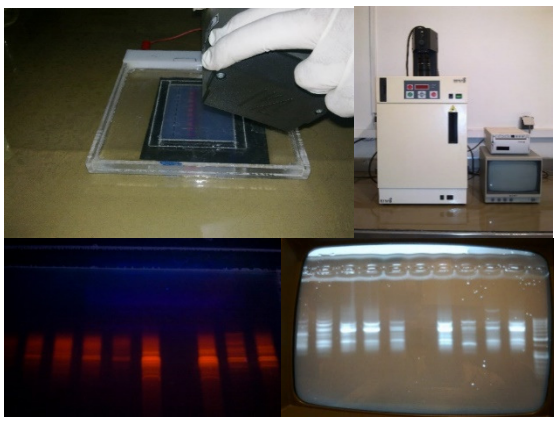
15. Taq DNA polymeraz

در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱/۵ دقیقه و توسعه نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه دنبال شد.

پس از ۴۰ تکرار از مراحل ۲ تا ۴ و انجام مرحله توسعه نهایی آغازگر در مدت ۱۰ دقیقه دمای دستگاه از ^{o}c ۷۲ به ^{o}c ۴خواهد رسید و دستگاه خاموش گردیده و محصولات PCR تا زمان استفاده جهت کنترل کیفی و الکتروفرز نگهداری گردید.

۸-۲- کنترل کیفی محصول واکنش زنجیره پلی مراز

کنترل کیفی محصول واکنش زنجیره پلی مراز توسط الکتروفروز محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ ٪که با بافر TBE 1 X و۲ μl اتیدیوم بروماید تهیه شده است رانده شد و به مدت ۲ تا ۳ ساعت در ولتاژ ۵۷ ولت و جریان ۲۷ آمپر ارزیابی گردید(شکل ۲- ۱۵) .بدین منظور ۲۵ میکرولیتر از محصول PCR داخل چاهک ایجاد شده بر روی ژل به کمک سمپلر بارگذاری شد. و در نهایت در زیر نور ماوراء بنفش در دستگاه ژل داک[16] مشاهده شد. سرعت حرکت باندهای ایجاد شده روی ژل با ولتاژ نسبت مستقیم دارد. با شروع الکتروفورز، DNAکه بار منفی دارد به طرف قطب مثبت حرکت می کند و سرعت حرکت آن با اندازه مولکول و با غاظت آگارز نسبت عکس دارد. برای مقایسه اندازه قطعات روی ژل از مقیاس[17] ۵۰ و ۱۰۰ جفت نوکلئوتیدی استفاده گردید. لازم به ذکر است که بدلیل وجود ماده رنگی موجود در بافر X ۱۰در در ژل الکتروفرز واکنش زنجیره پلی مراز نیازی به رنگ دای نمی باشد.



شکل ۲- ۱۵: کنترل کیفی محصول واکنش زنجیره پلی مراز توسط الکتروفروز محصول PCR

16. Gel documentation
17. Ladder

۹-۲-امتیازدهی نوارها

پس از تهیه تصاویر ژل با استفاده از دستگاه ژل داک و اسکن تصاویر آنها، الگوی باندی تمام جمعیت ها برای هر آغازگر بصورت جداگانه رسم گردید و عمل امتیاز دهی بر اساس حضور و یا عدم حضور باندهای DNA در محدوده باندی ۲۵۰ bp تا ۳۰۰۰ bp انجام شد. بدین ترتیب که در هر جمعیت در صورت حضور باند، امتیاز یک و در صورت عدم حضور باند ، امتیاز صفر داده شد و ماتریس صفر و یک تشکیل گردید. بعد از تشکیل ماتریس صفر و یک در نرم افزار Excel و Notepad ، داده ها به نرم افزار GenAlex نسخه ۶/۴ و PopGen نسخه ۱/۳۲ منتقل شد و تجزیه خوشه ای به روش WARD بدست آمد.

۱۰-۲- روش های آماری برای تجزیه و تحلیل داده ها

در این بررسی از مجموع ۱۰۰ نمونه جلبک که مورد بررسی مورفولوژیکی و آناتومیکی واقع گردید، تعداد ۵۲ نمونه استخراج DNA انجام پذیرفت و با توجه به کیفیت DNA استخراجی ، نهایتاً ۴۱ نمونه توسط واکنش زنجیر پلی مراز با استفاده از اتصال پرایمر ISSR به توالی میکروساتلایت به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی انجام گردید.

۱-۱۰-۲- فاصله ژنتیکی[18]

برآورد فاصله ژنتیکی یکی از معیارهای اساسی در تعیین میزان ارتباط ژنتیکی بین افراد نمونه ها یا جمعیت ها می باشد . نی[19] فاصله ژنتیکی را به صورت " تفاوت بین دو موجود که می تواند توسط اختلاف اللی توصیف شود" تعریف نمود. این واژه بعداً توسط خود نی به "میزان تفاوت ژنی بین جمعیت ها یا گونه ها که با برخی کمیت های عددی اندازه گیری شده است" تغییر داده شد.(Nie, 1979)

۲-۱۰-۲- اندازه گیری فاصله یا شباهت ژنتیکی[20]

فاصله و شباهت ژنتیکی بین دو ژنوتیپ، جمعیت یا فرد بسته به نوع داده های مورد مطالعه با روش های آماری است که به روش های متفاوتی محاسبه می شود. این شاخص ها می توانند برای بیان تنوع بین جفت نمونه ها به طور مستقیم به کار رود. همچنین می تواند بر حسب مبدأ جمع آوری نمونه ها گروه بندی و در یک جدول فراوانی نمایش داده شود(Menkir, 1997). اکثراً ماتریس تشابه (یا فاصله) دو به دو به عنوان یک فایل ورودی برای روش های تجزیه و تحلیل چند متغیره مختلف به کار می رود (Weising, 2005).

---

18. Genetic distance
19. Nei
20 . Genetic similarity

۱۱-۲- روش های محاسبه شباهت یا فاصله در مارکرهای مولکولی

فاصله اقلیدوسی متداولترین آماره برای برآورد فاصله ژنتیکی بین افراد (ژنوتیپ ها یا جمعیت ها) بر اساس داده های مورفولوژیکی می باشد اما خصوصیات گیاهی توسط نشانگرهایی مانند ایزوزایمها و مارکرهای مولکولی (Beaumont, 1998; Menkir, 1997; Weising, 2005) به صورت داده های دو دوئی(باینری) امتیاز دهی می شوند از این رو تشابه و فاصله ژنتیکی بین دو ژنوتیپ ، جمعیت یا فرد ممکن است با مقیاس های آماری مختلفی بر حسب نوع داده ها محاسبه شوند. از شاخص های اندازه گیری فاصله دو جمعیت که براساس فراوانی های آللی محاسبه می شوند، می توان به ضرایب زیر اشاره نمود:

۱-۱۱-۲- ضریب تشابه[۲۱]

دامنه تغییرات این ضرایب بین صفر و یک است، که به ترتیب بیانگر عدم تشابه و شباهت دو فرد می باشد(Kosman, 2005). یکی از شاخص های تشابه که بطور معمول مورد استفاده قرار می گیرد، ضریب دیک[۲۲] است(Dice, 1945) که ضریب نی[۲۳] ، نیز نامیده می شود(Nei, 1979) و از رابطه زیر بدست می آید:

$$S=\frac{2\,n\,ab}{na+nb}$$

که در آن n_a و n_b به ترتیب ، تعداد نوارهای حاضر در افراد a و b و n_{ab} تعداد نوارهای مشترک در هر دو فرد را نشان می دهد. S می تواند ، هر مقداری بین صفر و یک بدست آید، که صفر به مفهوم عدم وجود نوار مشترک و یک به معنای الگوی همانند است. شاخص دیگری که معمولا، بکار می رود ، ضریب جاکارد[۲۴] است(Jaccard, 1908):

$$S=\frac{n\,ab}{na+nb-nab}$$

دو شاخص اخیر فقط تطابق های مثبت (حضور نوار در هر دو) را در بین داده ها می پذیرند، و اغلب نتایج همبسته ای را می دهند(Weising *et al.,* 2005).ضریب تشابه نی و لی در مقایسه با ضریب جاکارد وزن بیشتری را بوجود نوارهای مشترک نسبت به حالتی که فقط یک نوار در یکی از افراد وجود دارد(۰-۱ یا ۱-۰) نشان می دهند (Kosman, 2005).

---

21. Similarity coefficient
22. Dice
23. Nei
24. Jaccard

۲-۱۱-۲- ضریب تفاوت و فاصله ژنتیکی

فاصله ژنتیکی بین نمونه ها اغلب به عنوان مکمل ضریب تشابهی که قبلاً ذکر شد، محاسبه می شود. مکمل ضریب تشابه ساده ، شاخص گاور[۲۵] نامیده می شود. همچنین یکی از رایج ترین برآوردکننده های فواصل ، به عنوان مثال برای تجزیه کلاستر ، فاصله اقلیدسی است،که این پارامتر در واقع مساوی با شاخص گاور چند گانه شده است (Gower, 1971) و به وسیله تعداد کل نوارهای امتیاز بندی می شود (Weising, 2005). که از رابطه زیر قابل محاسبه است:

$$D_E = \sum \quad (X_a - X_b)^2$$

در اینجا X= ۰، وقتی نوار در افراد a یا b وجود ندارد و X= ۱ ، وقتی نوار وجود دارد.

۲-۱۲- تجزیه واریانس مولکولی[۲۶]

تجزیه واریانس مولکولی (Excoffier et al, 1992) روشی است که اغلب برای داده های مارکرهای غالب به کار برده می شود. که با استفاده از فاصله بین افراد، واریانس بین و درون گروه های از پیش تعیین شده را محاسبه می کند.AMOVA ،امکان یک آزمون برای اجزای مختلف را فراهم می کند. آزمون تبدیل ، برای انجام آزمون های معنی دار بودن هر یک از اجزای واریانس آشیانه ای بر اساس ماترس مربع فاصله بین افراد استفاده می شود. در این روش ،تجزیه آشیانه ای واریانس مولکولی مستقیماً از روی ماتریس مربع فاصله بین همه جفت مشاهدات انجام می شود و از اصطلاح مجموع مربع انحرافات بین همه جفت مربعات بجای مجموع مربعات تجزیه واریانس معمولی ، استفاده می شود(Li, 1976). اصولاً برای این کار ،مجذور فاصله اقلیدسی ترجیح داده می شود. ولی نتایج خیلی مشابهی با استفاده از ضریب تشابه جاکارد بدست آمده است(Excoffier et al, 1992).

اجزای واریانس می توانند برای هرسطح ترتیبی (آشیانه)، محاسبه شوند. ثابت شده است که تجزیه واریانس مولکولی برای تفکیک واریانس در گونه های وحشی و بین گروه های ارقام ، که از مناطق مختلف منشاء گرفته اند بسیار کارآمد است.(Weising et al., 2005).طرح کلی تجزیه واریانس مولکولی برای تجزیه مجموع مربع انحرافات کل جمعیت ($SSD_{(Total)}$)، از مجموع مربعات درون جمعیت ها ($SSD_{(wp)}$) ،مجموع مربعات بین جمعیت های درون گروه ها ($SSD_{(AP/WG)}$) و مجموع مربعات بین گروه ها ($SSD_{(AG)}$) تشکیل می گردد(Excoffier et al., 1992).

[25] . Gower
[26] . AMOVA(Analysis of molecular variance)

۱۳-۲- تجزیه خوشه ای

تجزیه خوشه ای به گروهی از روشهای چند متغییره گه هدف اولیه آنها گروه بندی افراد مـی باشـد، اطـلاق مـی گردد. بطوریکه افراد مشابه از نظر صفات مورد بررسی در یک خوشه واحد در کنار هم قرار می گیرند. در نتیجه این دسته بندی افرادی که در یک خوشه قرار می گیرند، دارای شباهت های زیادی و افرادی که در خوشه های جداگانه قرار می گیرند تفاوتهای زیادی دارند. بنابراین اگر طبقه بندی بطور صحیح انجام گرفته باشـد ، افـرادی که در یک خوشه قرار دارند در نمایش هندسی در کنار هم قرار گرفته و افرادی که در خوشـه هـای جـدا قـرار دارند، از هم دورتر خواهند بود. در بین روشهای تجزیه خوشه ای بیشتر الگوریتم های مبتنی بر فاصله[۱] در تجزیه تجزیه تنوع ژنتیکی استفاده می گردد. روش های مبتنی بر فاصله که در آن ماتریس فاصله به عنوان ورودی مورد تجزیه و تحلیل قرار می گیرد و خروجی به صورت گرافیکی مانند دندوگرام یا به صورت درختی قابل ارائه مـی گردد.روش های مبتنی بر فاصله به دو گروه تقسیم می شوند که عبارتنداز سسلسله مراتبی[۲] و غیر سلسله مراتبی[۳]. مراتبی[۳] .روش های سلسله مراتبی کاربرد زیادی در تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکـی گونـه هـای گیـاهی دارد، ایـن روشها با ترکیب کردن افراد در گروه ها یا تقسیم بندی افراد یک گروه به زیرگروه ها، عمل تجزیـه و تحلیـل را انجام می دهند. در روشهای سلسله مراتبی ترکیبی[۴] ابتدا هر فرد به عنوان یک خوشـه در نظـر گرفتـه مـی شـود. بنابراین در فاصله ژنتیکی صفر تعداد خوشه ها به تعداد افراد می باشد. سپس افـراد یـا گـروه هـایی کـه بیشـترین شباهت را دارند،با همدیگر ادغام شده و در یک خوشه قرار می گیرند، لـذا ترکیـب کـردن گروههـا بـر اسـاس میزان تشابهات صورت می گیرد. در نهایت تمام ژنوتیپ ها به یک خوشـه واحـد منتصـب مـی گردنـد.در روش سلسله مراتب تقسیمی[۵] ابتدا تمام افراد در یک گروه قرار می گیرند و سپس درون گروه افراد بر اساس شـبا هـت به دو زیر گروه تقسیم می شوند و همین طور در داخل هر زیر گروه افراد بر اساس میزان کاهش شـباهت تقسـیم بندی می شوند تا به فرد برسند . در بین تمام روش های سلسله مراتب ترکیبـی، روش ادغـام بـر حسـب میـانگین همسایه ها یا UPGMA[۶] و روش واریانس حداقل وارد[۷] بیشترین کـاربرد را بـرای تجزیـه خوشـه ای دارنـد. سـایر روش ها نیز مانند نزدیکترین همسایه و دورترین همسایه توسـط برخـی از محققـین بـرای تجزیـه و تحلیـل تنـوع ژنتیکی بکار برده می شوند. در روش UPGMA پس از تشکیل هسته اولیه ، هر خوشه بر اساس شباهت بین دو فرد تشکیل می شود . سپس شباهت یا تفاوت هر فرد با افراد درون یک خوشه به صورت میانگین فاصـله یـا شـباهت آن فرد از افراد خوشه در نظر گرفته می شود. این روش با تشکیل n گروه شروع می شود و هر ژنوتیپ ابتدا یک

---

1 . distance
2 . Hierarchical
3 . Non Hierarchical
4 . Agglemerative
5 - Divisive Hierarchical
6 . un weighted paired group method using arithmetic average
7. Ward

گروه را تشکیل می دهد و قرار گرفتن فرد در خوشه ها و ادغام خوشه ها بر این اساس است که در هر مرحله ، واریانس درون گروهی باید کمتر از واریانس بین گروهی باشد(Gordon, 1981).

٢-١٤- تجزیه به مولفه های اصلی [1]

هدف از این تجزیه ،یافتن ترکیبات از چند متغییر جهت ایجاد شاخص های مستقل می باشد. عدم همبستگی بین این شاخص ها یک ویژگی مفید است ، زیرا به این معنی است که شاخص ها ،جنبه های متفاوتی از داده ها را اندازه گیری می نمایند(فرشادفر ، ١٣٨٠)

تجزیه به مؤلفه های اصلی همراه با تجزیه خوشه ای یکی از روش های چند متغیره است که دارای کاربرد زیادی است این روش را می توان برای نمایش دو بعدی پراکنش افراد به کار برد، تجمع افراد در یک ناحیه از پلات نشان دهنده تشابه ژنتیکی آن افراد می باشد. به دلیل اینکه در این مطالعه داده ها کیفی بوده و مقادیر صفر و یک گرفتند به جای تجزیه به مؤلفه های اصلی از تجزیه به مختصات اصلی [2] استفاده شد.تجزیه به مختصات اصلی به عنوان روشی برای کاستن حجم داده ها به منظور روشن ساختن روابط بین دو یا چند متغییر و توجیه تغییرات کل داده های اصلی و اولیه به وسیله تعداد محدودی از متغیر های جدید مستقل به نام مختصات اصلی می باشد،این نوع دسته بندی اجازه نمایان شدن تفاوت ها را بین افراد داده و مشاهده همه گروه ها را ممکن می سازد.کاسته شدن حجم داده ها بوسیله تبدیل خطی داده های اصلی به متغیر های مستقل جدیدی که به عنوان مختصات اصلی شناخته می شوند انجام می گیرند، بطوریکه اولین مؤلفه بیشترین مقدار تغییرات داده های اولیه را توجیه می کند و مؤلفه دوم بیشترین مقدار تغییرات باقیمانده را بعد از مؤلفه اولیه توجیه می کند و الی آخر. لازم به ذکر است که هر مؤلفه تغییراتی را توجیه می کند که توسط مؤلفه های قبلی بیان نشده است (Gordon, 1981).

٢-١٥- معیار های محتوای اطلاعات نشانگرها

معیارهای محتوای اطلاعات نشانگرها شامل محتوای اطلاعات چند شکل [3] و شاخص نشانگری [4] می باشد

٢-١٥-١- محتوای اطلاعات چند شکل

محتوای اطلاعات چند شکل تخمینی از قدرت تشخیص دهندگی یک مارکر را به وسیله تعداد آلل ها در هر لوکوس و فراوانی نسبی آن آلل ها می دهد. در واقع PIC نشان دهنده میزان چند شکلی یک نشانگر می باشد که می تواند از صفر تا یک متغییر باشد. هر چقدر این عدد بزرگتر باشد، بیانگر فراوانی بالای چند شکل برای جایگاه جمعیت تحت مطالعه است. بمنظور بررسی کارایی آغازگرهای مورد استفاده در بررسی تنوع ژنتیکی

---

1 . (PCA) Principle component analysis
2 . principle coordinate analysism
3 . PIC(Polymorphism information content)
4. MI (marker index)

جمعیت های مورد مطالعه، مقادیر محتوای اطلاعاتی چند شکلی PIC مربوط به هر آغازگر با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (Gordon, 1981).

$PIC=2p_i (1-p_i) = 2p_iq_i$

که در آن PIC میانگین اطلاعات چند شکلی هر آغازگر و p_i فراوانی باندهای مارکری که حضور دارند می باشد.

۲- ۱۵-۲- شاخص نشانگری

شاخص نشانگری نیز با فرمول زیر محاسبه شد(Tams et al, 2005):

$MI = PIC\times n$

که در آن MI ،شاخص مارکری و n ، تعداد باند پلی مورفیسم می باشد. تعداد باند پلی مورفیسم نیز از رابطه زیر بدست می آید

$n = N \times \beta$

و در آن N ، تعداد کل باند ها و β درصد باندهای چند شکل که توسط هر آغاز گر تولید شده است. بنابر این هر دو شاخص میزان قدرت تشخیص دهندگی یک مارکر را بیان می کنند با این تفاوت که MI به دلیل اینکه تعداد کل باندها را در نظر می گیردمی تواند شاخص بهتری نسبت به PIC باشد.

از شاخص تنوع ژنتیکی Nei (h) تعداد آلل های مشاهده شده (na) و تعداد آلل های موثر (ne) و نیز فراوانی داده ها محاسبه می شود(Nei, 1973). و Gst یا ضریب تنوع بین جمعیت ها، نسبتی از کل تنوع ژنتیکی است که در تفکیک و تمایز زیرجمعیت ها قابل استفاده است و از رابطه زیر به دست می آید(کاملی ، ۱۳۹۱)

$$Gst = 1 - \frac{Hs}{Ht}$$

Hs: هتروزیگوسیتی قابل انتظار درون جمعیت

Ht : هتروزیگوسیتی کل جمعیت

Ne یا تعداد آلل های مؤثر مجموعه الل های تاثیر گذار موجود در جمعیت می باشد که از رابطه زیر بدست می آید(کاملی، ۱۳۹۱).

$$Ne = \frac{1}{1-h}$$

h : تنوع ژنی (هتروزیگوسیتی)

Nm[1] میانگین تعداد مهاجرت ها در هر نسل برای هر لوکوس است. تخمین جریان ژنی با استفاده از رابطه زیر بدست می آید. (کاملی ، ۱۳۹۱)

$Nm =(1-Gst/ 2Gst)$

[1]. Number of migrant

١٦-٢- خلاصه محاسبات آماری انجام شده در این پروژه:

- تعداد کل نوارهای چند شکل ،تعداد نوارها در هر نمونه ، تنوع ژنتیکی کل و درون جمعیت ، درجه تمایز ژنی ، میزان تنوع ژنی درون جمعیت ها برای هر آغاز گر با استفاده از شاخص تنوع ژنی نی (Nei) برآورد شد.
- فاصله ژنتیکی بین جمعیت ها بر اساس ضریب نی محاسبه و دندروگرام به روش Ward برای گروه بندی جمعیت ها رسم شد.
- برای تشخیص دقیق تر روابط ژنتیکی بین جمعیت ها تجزیه به مؤلفه های هماهنگ اصلی بر اساس فاصله ژنتیکی نی انجام شد
- تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) بر اساس مربع فاصله اقلیدسی برای تفکیک واریانس کل مولکولی به واریانس بین و درون جمعیت ها به عمل آمد(Excoffier *et al.*, 1992).

١٧-٢- نرم افزارهای مورد استفاده برای تجزیه و تحلیل داده ها

از برنامه Ecxel برای وارد کردن داده های مولکولی استفاده شد. از نرم افزار PopGen و GenAlex (Peakall and smouse,2006) برای رسم دندروگرام با ضریب تشابه مختلف و بدست آوردن PCOA استفاده گردید.

۳- نتایج

ژنوم موجودات به طور طبیعی دارای تفاوت هایی در ردیف بازهای خطی می باشند. این تغییرات طبیعی که سبب گوناگونی در افراد یک جمعیت می شود چند شکلی ژنتیکی نام دارد که در بین و داخل یک گونه اساس ایجاد تنوع ژنتیکی می باشد .چندین روش برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در جلبک قرمز ابداع شده اند از جمله نشانگرهای مورفولوژیک که در جلبک های بالغ کاربرد دارد و به این نشانگرها ، نشانگرهای کلاسیک یا ظاهری هم گفته می شود که در واقع همان صفات یا خصوصیات فنوتیپی قابل رویت هستند. به عبارتی دیگر این نشانگرها مبتنی بر پلی مورفیسم در شکل ظاهری یک صفت می باشند. نشانگرهای مولکولی از دیگر روش ها سیستمی است که قادر به شناسایی و برآورد تنوع موجود در توالی های DNA ژنومی می شوند. از جمله این روش ها می توان از RAPD، AFLP، SSR، ISSR, DAF نام برد. نشانگر های ISSR که در این مطالعه استفاده گردید ، به اطلاعات اولیه در زمینه ژنوم وطراحی آغازگر ها نیاز ندارد، در حضور یک آغازگر مکمل نسبت به ریز ماهواره هدف، تکثیر می یابد. این آغازگرها بدون جایگاه انتخابی، ولی دارای نوکلئوتید های تکراری مانند AC,AG,GT است و از ریز ماهواره هایی با طول ۲۵-۱۶ باز به عنوان آغازگر استفاده می شوند. این تکنیک سریع و سودمند بوده ، قابلیت تکرارپذیری بالایی دارد و پرایمرها خیلی اختصاصی نبوده و به آسانی قابل سنتز هستند.و ناحیه قلاب شده آغازگر ، اجازه اتصال محکم تر آغازگر به جایگاه هدف در نمونه الگو را می دهد .از دیگر مزایای آن می توان به داشتن چندین جایگاه چند شکل ، قابل کاربرد با تعداد زیادی نمونه ، هزینه پایین نام برد و محصول تولید شده طولی برابر با ۲۰۰ تا ۲۰۰۰ جفت باز دارد و قابل تشخیص با الکتروفورز ژل آگارز و پلی آکریل آمید می باشد .از معایب آن این است که نشانگری غالب بوده و برای برخی ترکیبات آغازگری از نتیجه بخشی کم و تولید تعداد کمی باند برخوردار است.

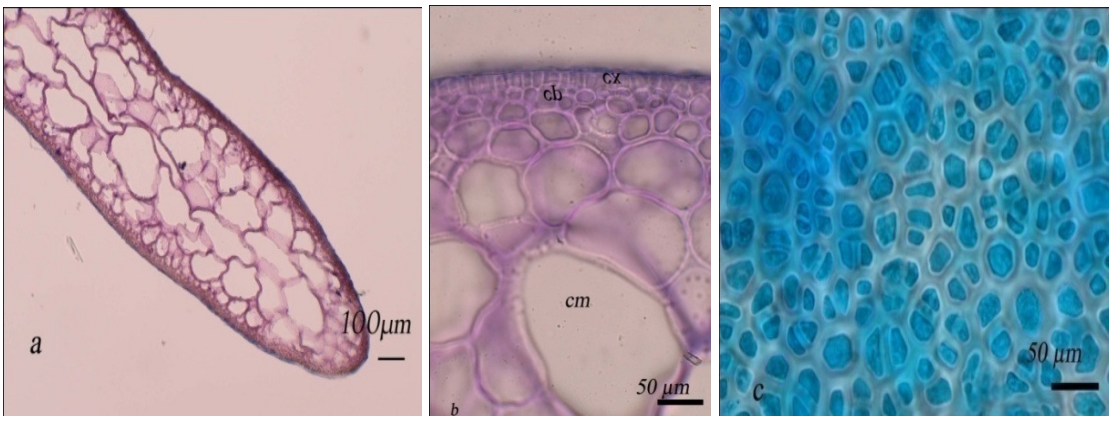
۳-۱- بررسی نتایج ریخت شناسی و آناتومی

خصوصیات ریخت شناسی نمونه های مورد بررسی در جدول۳-۱ و شکل های ۳-۱ تا ۳-۷مشاهده می گردد.

جدول ۳-۱ :نسل های ایزومورفیک جلبک *G. corticata* جمع آوری شده از مناطق بستانه و لیپار(۱۳۹۲)

مکان نمونه برداری	ماه نمونه برداری	تعداد کل	تعداد مورد بررسی			
			نر	ماده	تتراسپوروفیت	نا بالغ
بستانه	اردیبهشت	۳۰	–	–	–	۳۰
بستانه	خرداد	۳۰	۲	۴	۶	۱۸
لیپار	مرداد	۴۰	۸	۴	۲۸	–

خصوصیات مراحل ویژه ایزومورفیک در نمونه های مورد بررسی تنها در جلبک هایی با بلوغ کامل مشاهده شد. از مجموع نمونه های جمع آوری شده از منطقه بستانه در نوبت اول همگی نابالغ بوده و هیچکدام از مراحل جنسیتی از طریق خصوصیات ریخت شناسی قابل تشخیص نبود(شکل ۳-۱).



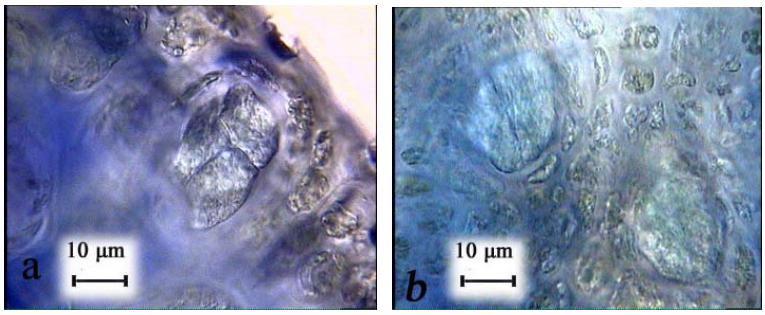
شکل ۳-۱: برش عرضی و سطحی از نمونه های نابالغ *G.corticata* در منطقه بستانه (اردیبهشت ۱۳۹۲)

a: مقطع عرضی از ریسه جلبک با استفاده از رنگ آمیزی کالمن و آبی متیل و بزرگنمایی ۱۰۰

b: مقطع عرضی از ریسه جلبک در ناحیه میانی ، سلولهای برجسته مغزی (cm) ، احاطه شده توسط سلول های پارانشیمی (cp) و قشری(cx) با استفاده از رنگ آمیزی کالمن و آبی متیل و بزرگنمایی ۴۰۰

c: مقطع سطحی از ریسه جلبک با استفاده از رنگ آمیزی آبی متیل و بزرگنمایی ۴۰۰

از ۳۰ نمونه نوبت دوم ، که با یک ماه فاصله زمانی جمع آوری شده بود فقط ۲ نمونه به عنوان نر ، ۴ نمونه به عنوان ماده و ۶ نمونه به عنوان تتراسپورفیت تشخیص داده شد و ۱۸ نمونه نیز نا بالغ بودند(شکل ۳-۲).

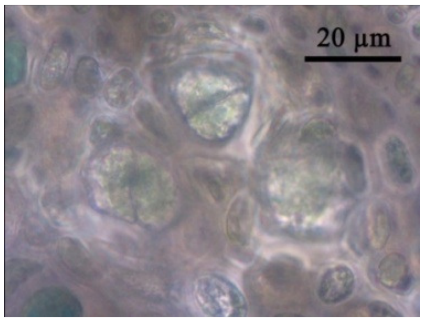


شکل ۳-۲: برش عرضی و سطحی از نمونه های بالغ *G.corticata* در منطقه بستانه

a : مقطع عرضی از تتراسپوروفیت برجسته در بخش قشری ریسه جلبک با استفاده از رنگ آمیزی آبی متیل و بزرگنمایی ۲۰۰۰

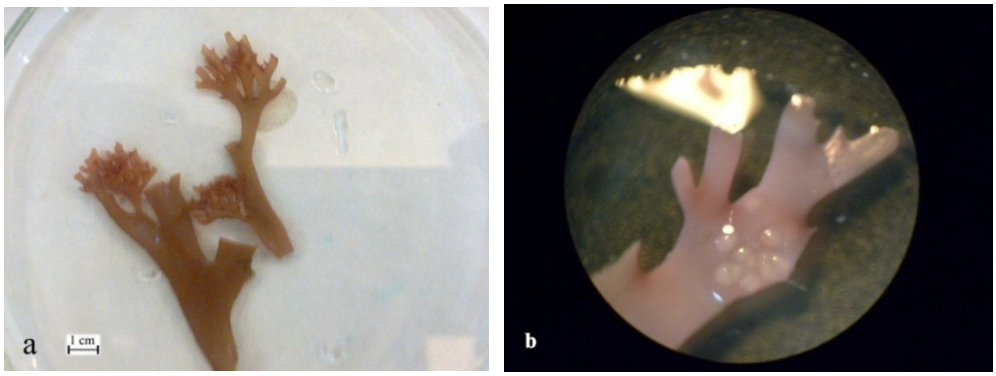
b: تتراسپوروفیت در مقطع سطحی از ریسه جلبک با استفاده از رنگ آمیزی آبی متیل و بزرگنمایی ۲۰۰۰

از مجموع ۴۰ نمونه منطقه لیپار که مورد بررسی مورفولوژیک قرار گرفت کـه تعـداد ۸ نمونـه بـه عنـوان نـر ، ۴ نمونه به عنوان ماده و ۲۸ نمونه به عنوان تتراسپوروفیت مشخص گردید (شکل ۳-۳ تا ۳-۶).



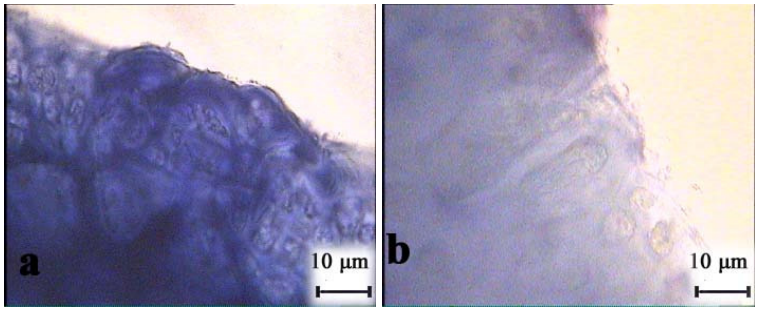
شکل ۳-۳ پراکندگی تتراسپورانژیا بطور متراکم در سطح ریسه

از نظر شکل ظاهری بین نمونه های نابالغ در اردیبهشت و خرداد منطقه بسـتانه اختلافـی مشـاهده نشـد ولـی ۴۰ ٪ نمونه های سری دوم بستانه بالغ بودند که تنها بالغین ماده با سیستوکارپ نیمه کروی برجسته بر روی ریسه هـا بـا چشم غیر مسلح از نابالغین تمیز داده می شد و تتراسپوروفیت های بالغ و گامتوفیت های نر بالغ در مناطق بستانه و لیپار تنها به کمک میکروسکوپ قابل تشخیص از نابالغین بودند.



شکل ۳-٤ :شکل ظاهری گامتوفیت ماده (a) و نمایش سطحی از زوائد سیستوکارپ نیمه کروی بالغ با اسـتفاده از استریو میکروسکوپ(b)

در جنس نر *G.corticata* اسپرماتانژها در داخل حفره های عمیق تر بیضوی شکل قرار می گیرند



شکل ۳- ۵: برش عرضی از گامتوفیت نر با اسپرماتانژیا کانسپتاکل[1] در *G.corticata*.

[1]. spermatangial conceptacles

ریسه ها فشرده تا برگی شکل ، رنگ ریسه ها سبز ، زرد تا قرمز متمایل به ارغوانی متغییر می باشد. محور آن صاف بوده و انتهای ریسه ها دو بخشی با انشعابات نا منظم و لبه های صاف می باشد.
نمونه های نر در مقایسه با نمونه های ماده و تتراسپورفیت از پرپشتی کمتری برخوردار بوده و بلندی آن ۱۶-۱۰ سانتیمتر و پهنای ۶-۴ میلیمتر بوده و نمونه های ماده ۱۰-۸ سانتیمتر ارتفاع و سیستوکارپ نیمه کروی در سطح ریسه های بالغ آن مشاهده گردید و تتراسپوروفیت ها ریسه های منشعب پر پشت تری داشته و ۱۰-۶ سانتیمتر بلندی آن می باشد(شکل۳- ۷).

۲-۳- نتایج حاصل از استخراج و جدا سازی DNA

جداسازی DNA از *G.corticata* با استفاده از پروتوکل CTAB و SDS با تغییراتی انجام گردید. محصول DNA [۲]، غلظت DNA و ضریب P=λ260 / λ280 بدست آمده از نمونه ها در جدول ۳-۲ تا ۳-۳ ارائه شده است.

جدول ۳-۲ :کمیت و کیفیت DNA جداسازی شده از *G.corticata* در مجموع مناطق با استفاده از از روش های CTAB و SDS

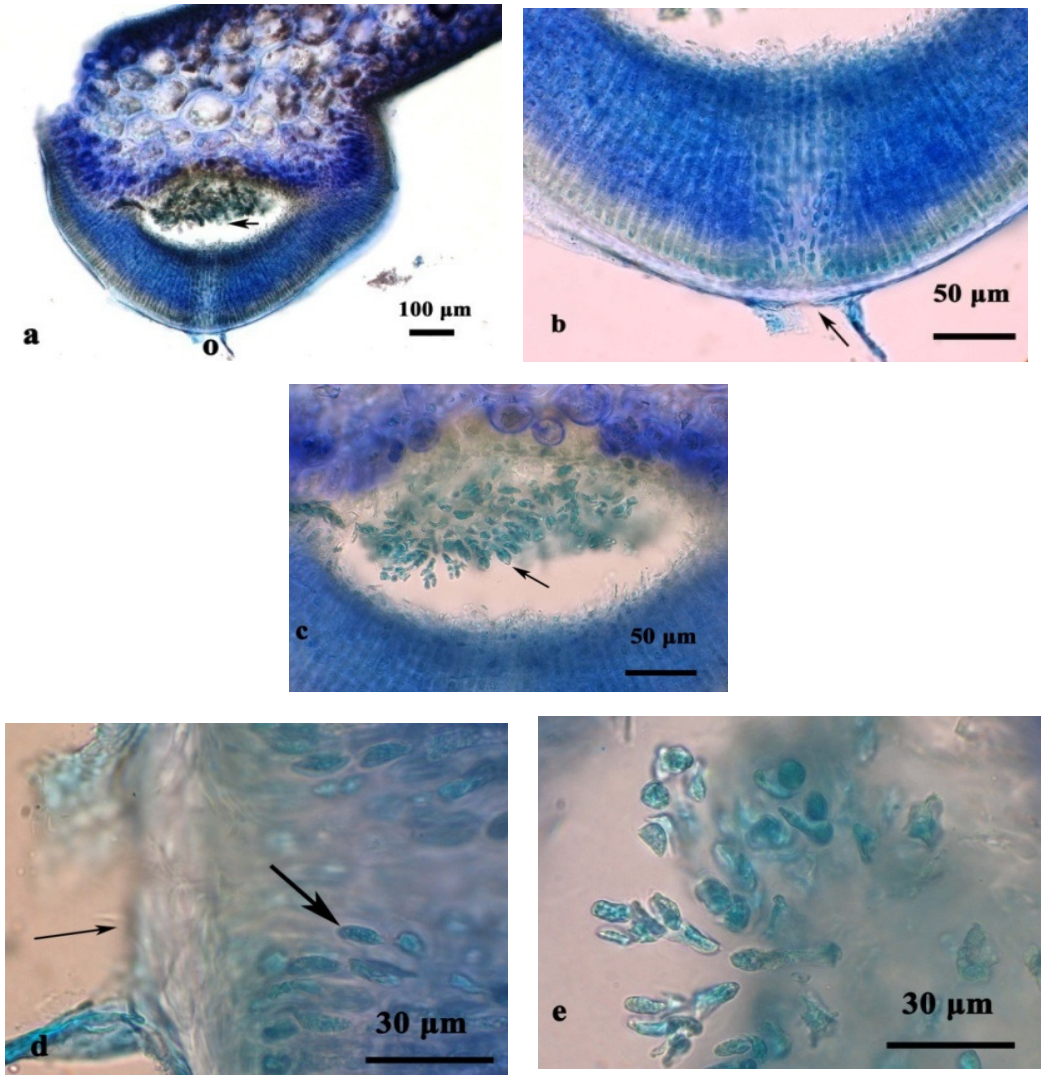
روش استخراج	تعداد نمونه	P=λ260 / λ280			غلظت DNA(n g/μl)		
		میانگین	حداقل	حداکثر	میانگین	حداقل	حداکثر
CTAB	۳۰	۱/۴۵	۱/۰۰	۲/۰۰	۴۹/۱۷	۵/۰۰	۲۴۰/۰۰
SDS	۲۱	۱/۵۹	۱/۲۰	۱/۸۰	۷۰/۹۵	۲۰/۰۰	۱۴۵/۰۰

جدول ۳-۳ : مقایسه خلوص و کیفیت DNA از *G.corticata* در مجموع مناطق مورد بررسی

مکان جمع آوری	تعداد نمونه	P=λ260 / λ280			غلظت DNA(n g/μl)		
		میانگین	حداقل	حداکثر	میانگین	حداقل	حداکثر
بستانه و لیپار	۵۱	۱/۵۱	۱/۰۰	۲/۰۰	۵۸/۱۴	۵/۰۰	۲۴۰/۰۰

دامنه خلوص DNA بدست آمده بر اساس $p_{260/280}$ و جداول ۳-۲ تا ۳-۴ از ۱/۰۰ الی ۲/۰۰بود در حالی که محصول DNA در دامنه $^{ng}/_{\mu l}$۵ الی $^{ng}/_{\mu l}$۲۴۰ بود. شکل ۳-۸ (a) ژل آگارز DNA ژنومی *G.corticata* با استفاده از این پروتکل ها را نشان می دهد.

[2]. DNA yield



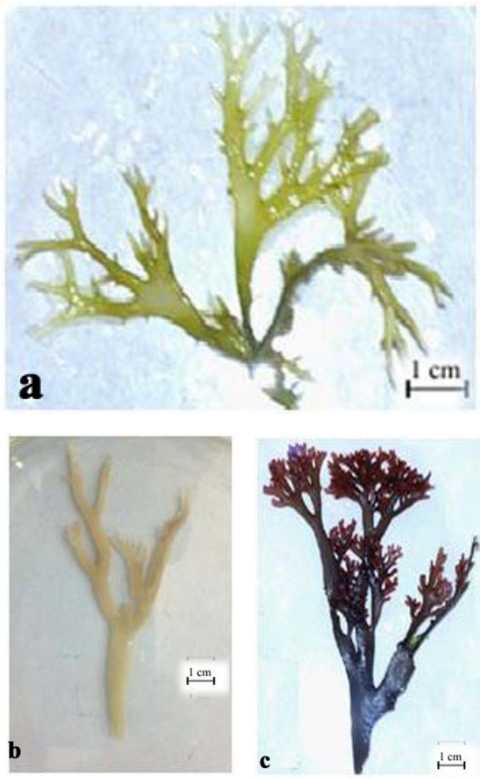
شکل ۳- ٦: نمایش مقاطع عرضی سیستوکارپ *G.corticata* از منطقه لیپار

a: سیستوکارپ بالغ با روزنه کوچک بر روی آن (o) که از قسمت انتهایی آن کارپوسپورها خارج می گردند.کارپوسپور با پیکان نمایش داده شده است.(بزرگنمایی ۱۰۰)

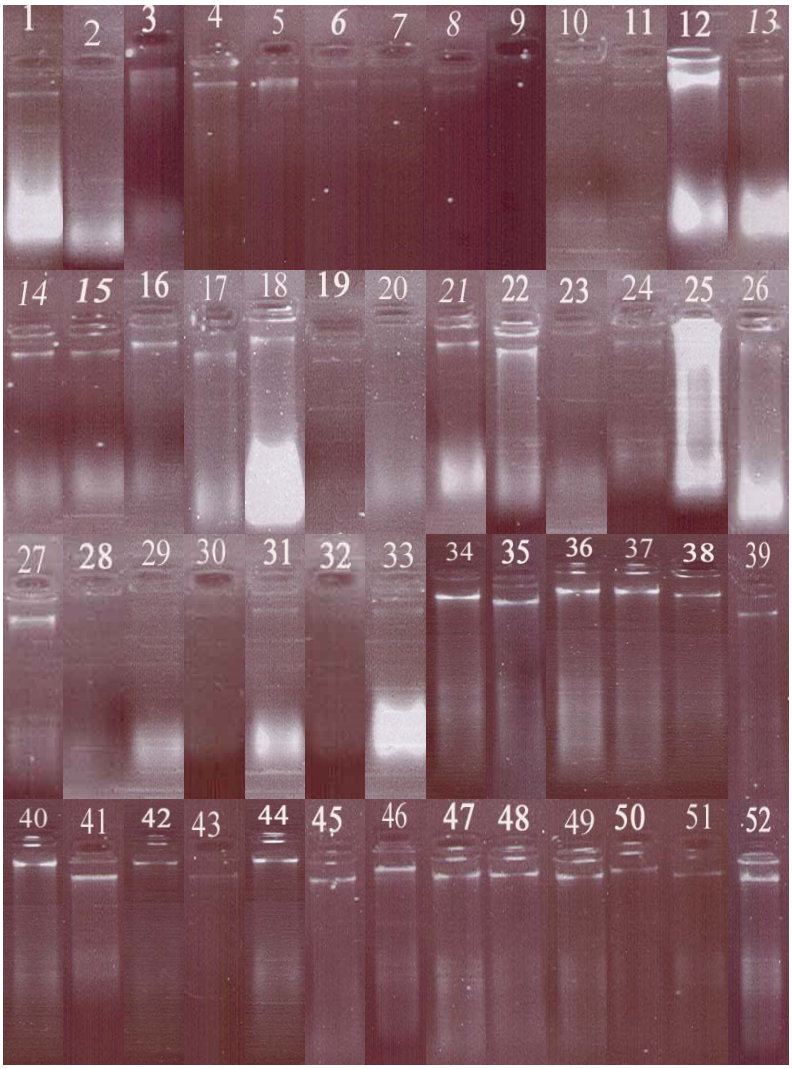
b: نمایش روزنه سیستوکارپ بالغ با بزرگنمایی ٤۰۰ . پیکان روزنه را نشان می دهد

c: نمایش کارپوسپورانژ با بزرگنمایی٤۰۰ .کارپوسپور با پیکان نمایش داده شده است

d و e: نمایش کارپوسپورانژ با بزرگنمایی۱۰۰۰ .

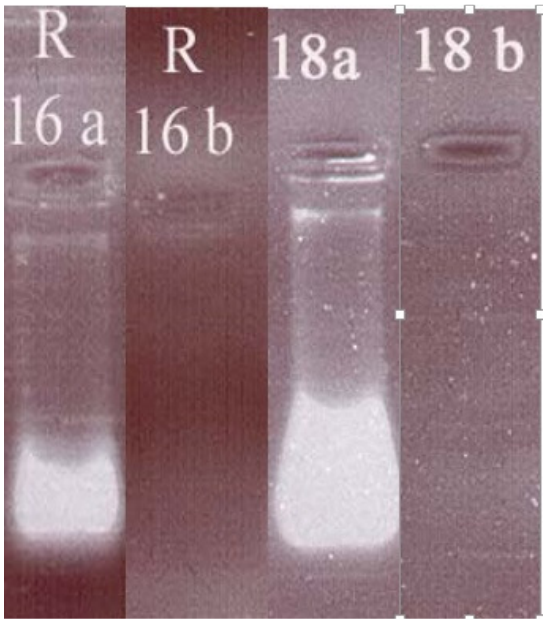


شکل ۳- ۷ :نمایش اشکال ایزومورفیک جلبک *G. corticata*
a -تتراسپوروفیت ، b –گامتوفیت نر و c – گامتوفیت ماده



شکل ۳-۸ (a): ژل الکتروفروز از استخراج DNA به روش CTAB (نمونه های ۱ تا ۳۳) و SDS (نمونه های ۳٤ تا ۵۲)

در روشهای CTAB و استفاده از RNase A،۴ µl و SDS با استفاده از مقادیر ۵ تا ۱۵ میکرولیتر از RNase A ، در ژل الکتروفوز برخی از نمونه ها علاوه بر نوار DNA مقادیر زیادی RNA نیز مشاهده شد که پس از شستشو توسط ۶ میکرولیتر RNase A ، کلیه نوارهای DNA و RNA حذف گردیدند (شکل ۳-۸ (b)).



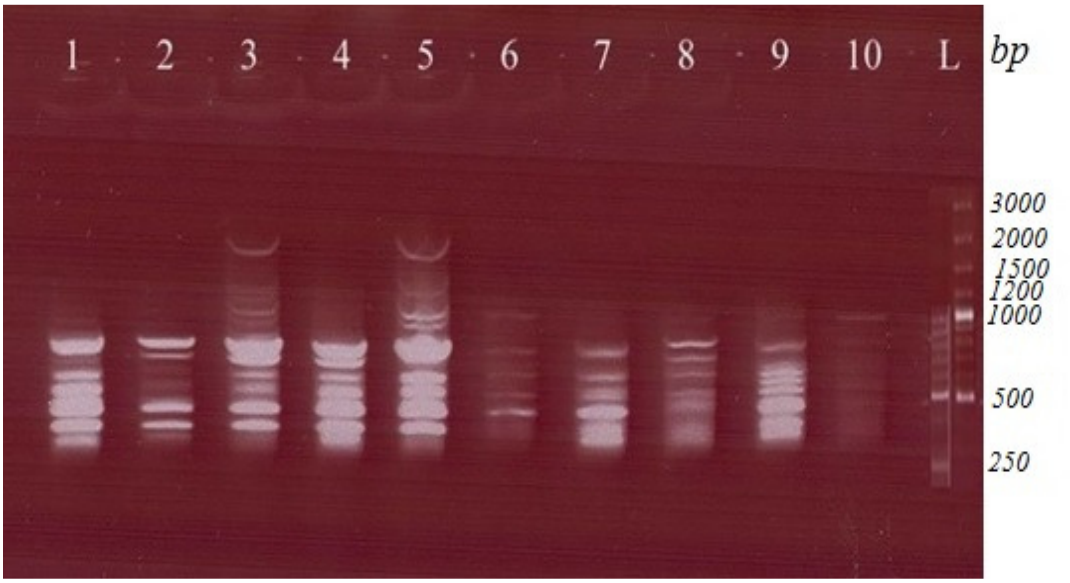
شکل ۳-۸(b) - ژل الکتروفورز نمونه هـای R 16 a و a ۱۸ از اسـتخراج DNA بـه روش CTAB و اسـتفاده از l µRNase a ٤ و شستشوی مجدد آنها توسط RNase a µl ٦ (R 16 b و ۱۸ b)

۳-۳- نتایج محصولات PCR تحت آغازگر های ISSR

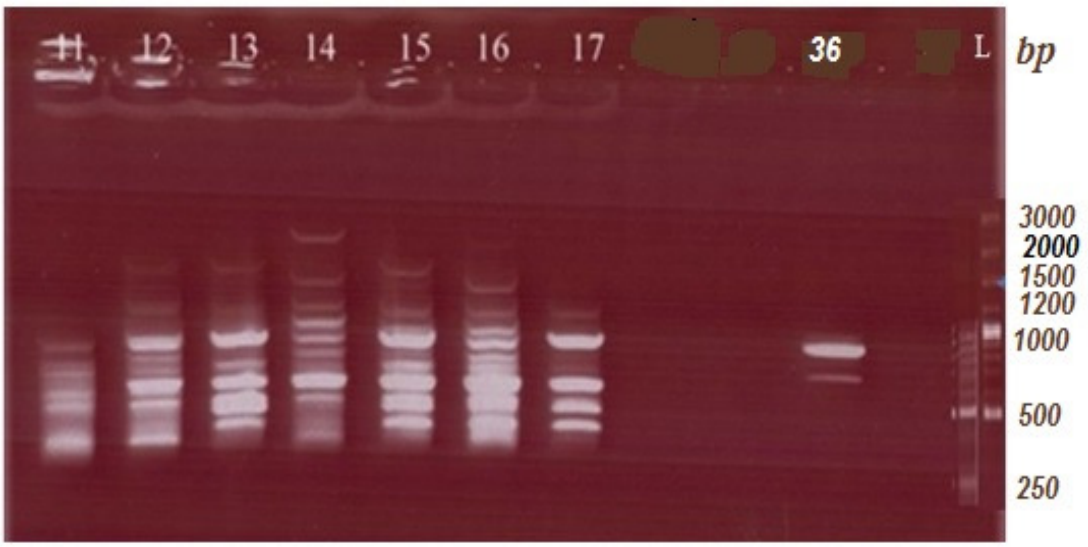
در تحقیق انجام شده بیشترین و کمترین تعداد باندها به ترتیب در آغازگرهای AB و ABC مشاهده شـد و اغلـب DNA جداسازی شده از نمونه های *G.corticata* الگوی باند پلی مورفیک در ISSR نشان دادند.

۱-۳-۳-محصولات PCR آغازگر ISSR- A

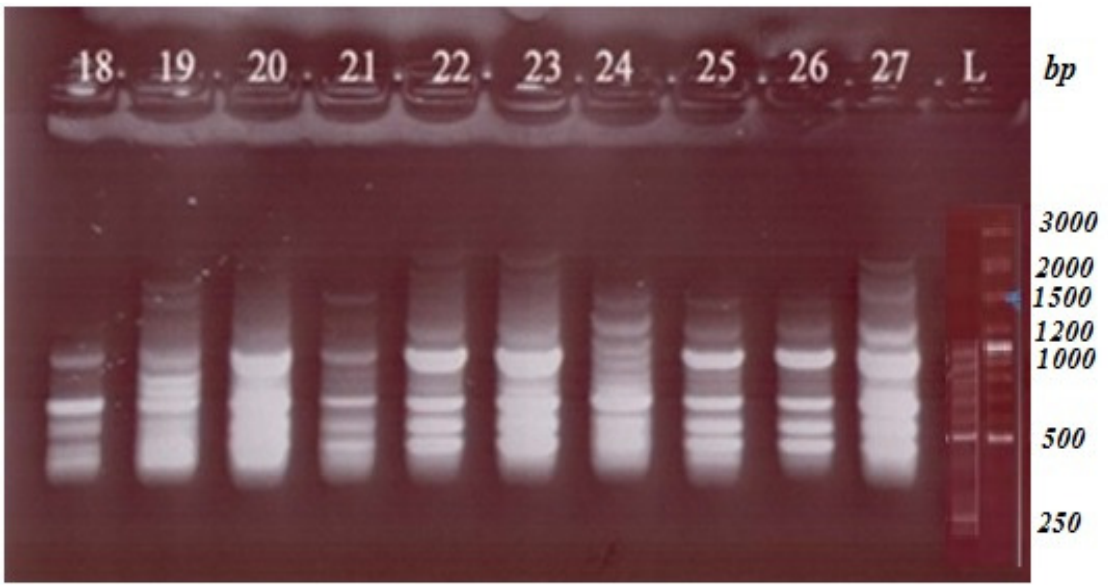
این آغاز گر در کل ۲۰ باند در محدوده bp ۳۰۰۰-۳۰۰ تکثیر نمودکه از بین آنها قطعه (باند) تتراسپوروفیت هـا ی دیپلوئید دو باند bp ۱۲۰۰ و bp ۱۷۰۰ تولید کرد و قطعه (باند) bp ۳۰۰ ویژه نـر ایجـاد کـرد. (۳- ۹(a)تـا ۳- ۹ (e)).این پرایمر باندهای واضحی برای گامتوفیت ماده ایجاد نکرد.



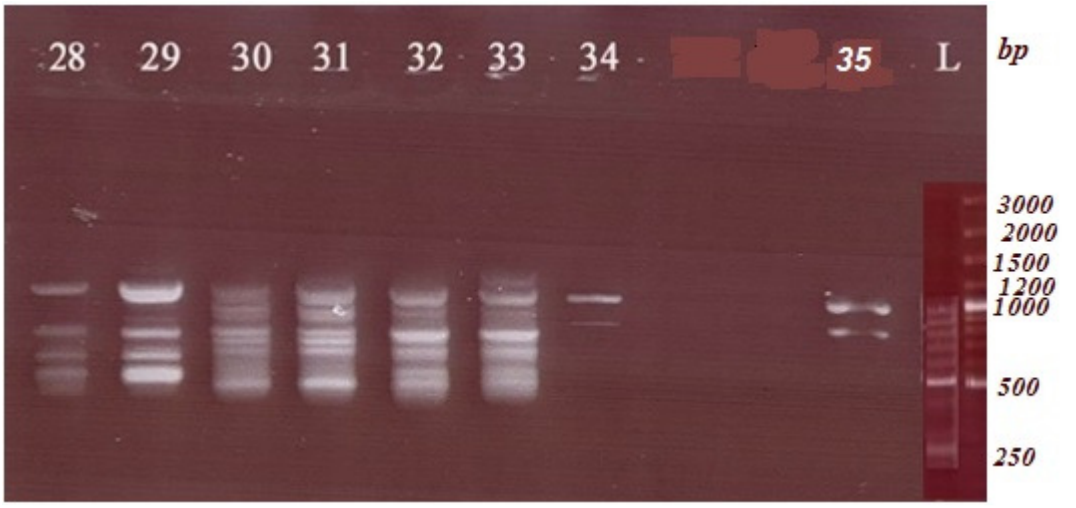
شکل ۳– ۹(a) . محصولات PCR آغازگر ISSR- A در جمعیت *G. corticata* به ترتیب از چپ به راست نمونه ۱ الی ۱۰ مربوط به منطقه بستانه . L : Ladder 50 , 100 bp



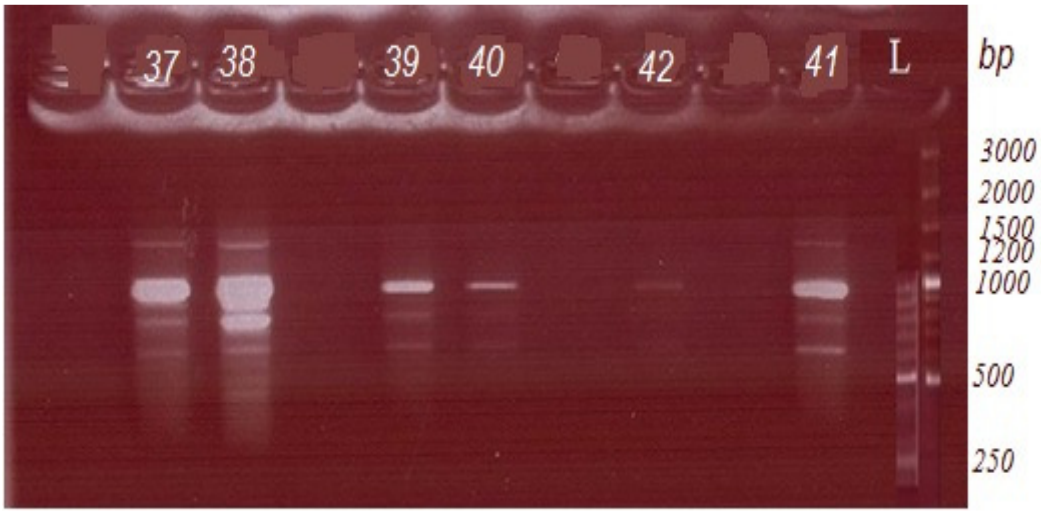
شکل ۳ – ۹(b) . محصولات PCR آغازگر ISSR- A در جمعیت G. corticata به ترتیب از چپ به راست نمونه ۱۱ مربوط به بستانه و نمونه های ۱۲ الی ۱۷ و ۳۶ مربوط به منطقه لیپار .L : Ladder 50 , 100 bp



شکل ۳- ۹(c). محصولات PCR آغازگر ISSR- A در جمعیت *G. corticata* به ترتیب از چپ به راست نمونه ۱۸ تا ۲۷ لیپار.L : Ladder 50 , 100 bp



شکل ۳- ۹ (d) . محصولات PCR آغازگر ISSR- A در جمعیت *G. corticata* به ترتیب از چپ به راست نمونه ۲۸ الی ۳۵ مربوط به لیپار .L : Ladder 50 , 100 bp

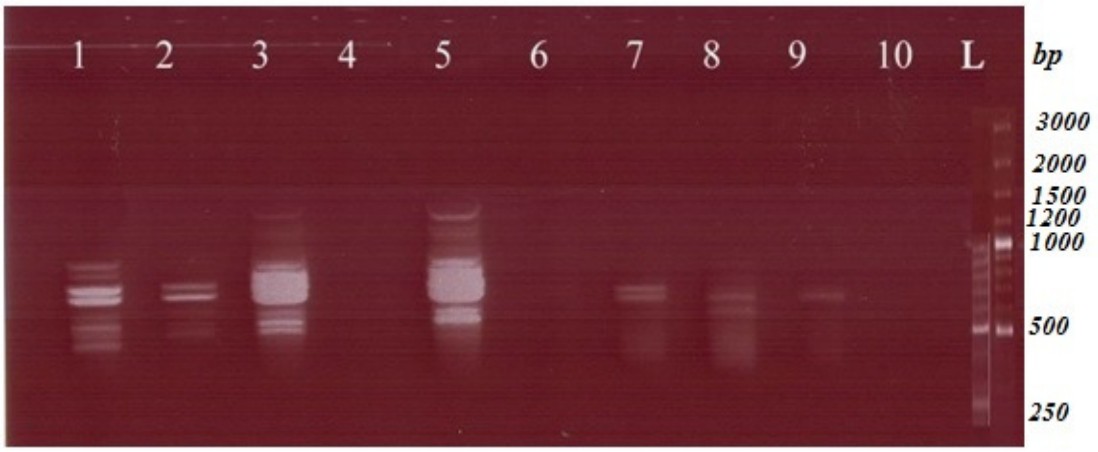


شکل ۳- ۹ (e) . محصولات PCR آغازگر ISSR- A در جمعیت *G. corticata* به ترتیب از چپ به راست نمونه ۳۷، ۳۸ ، ۳۹، ۴۰، ۴۱ و ۴۲مربوط به لیپار L : Ladder 50 , 100 bp.

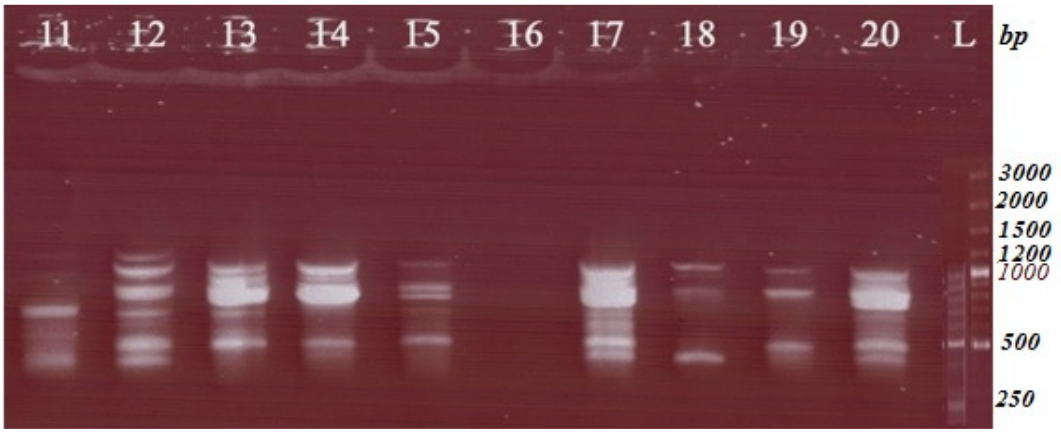
نمونه های ۴۲ تا ۵۲ با این پرایمر تکثیر نگردید .

۲-۳-۳- محصولات PCR آغازگر ISSR- C

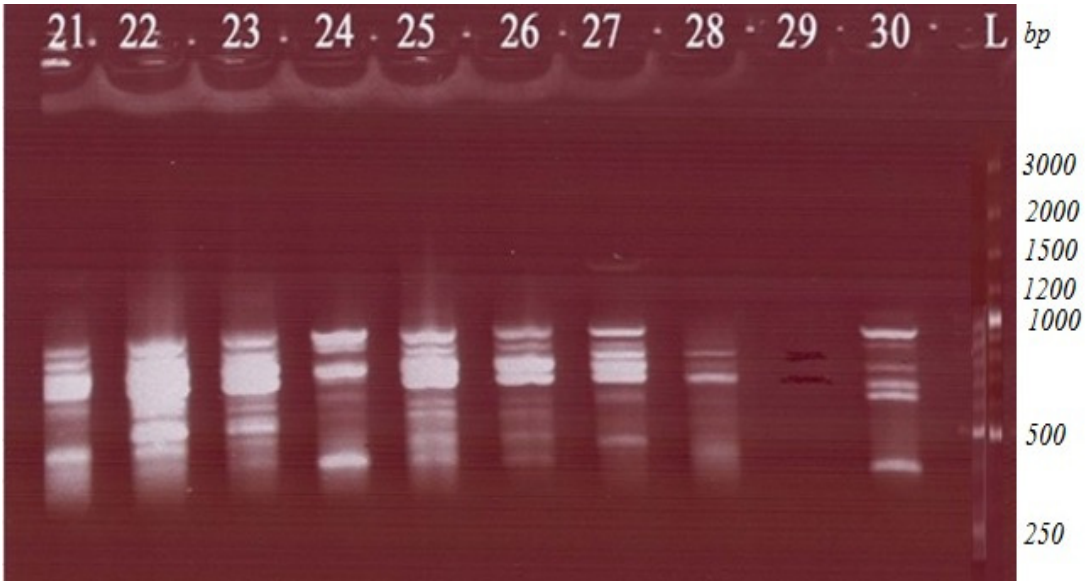
این آغاز گر در کل ۱۸ باند در محدوده ۱۵۰۰-۲۵۰ bp تکثیر نمود.و از بین آنها دو باند ۸۲۰ bp و ۹۰۰ bp ویـژه تتراسپوروفیت ها ی دیپلوئید تولید کرد و قطعه (باند) ۵۰۰ bp نیز ویژه گامتوفیت ماده ایجاد کرد. ولی بانـدهای ویژه ای برای تشخیص مراحل گامتوفیت های نر تشکیل نگردید (شکل ۳- ۱۰(a) تا ۳- ۱۰(d)).



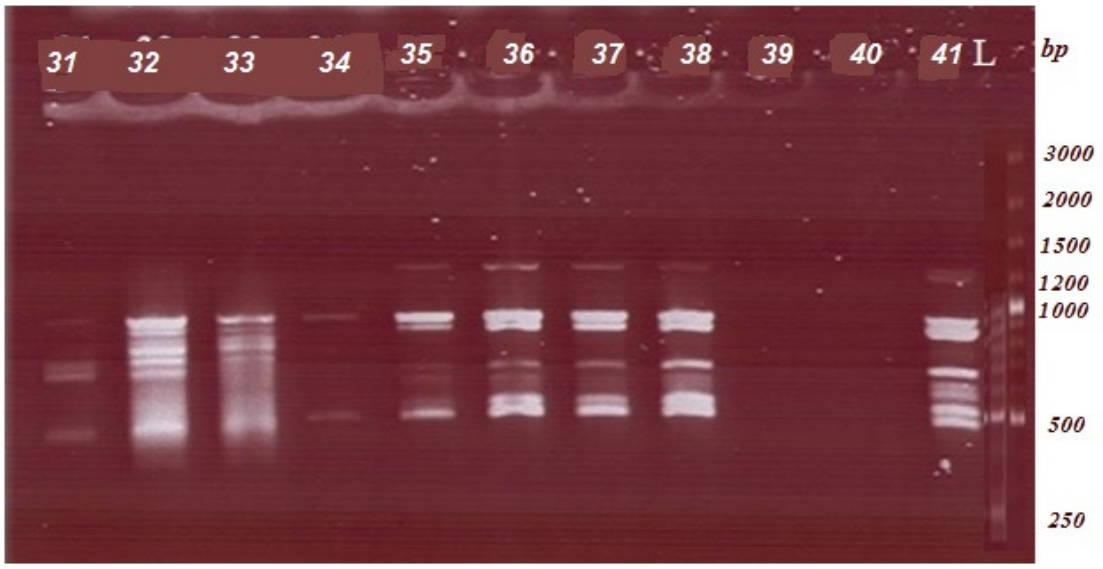
شکل ۳- ۱۰(a).محصولات PCR آغازگر ISSR- C در جمعیت *G. corticata* به ترتیب از چپ به راست نمونـه ۱ الی ۱۰ مربوط به بستانه. L : Ladder 50 , 100 bp



شکل ۳ – ۱۰(b). محصولات PCR آغازگر ISSR- C در جمعیت *G. corticata* به ترتیب از چپ به راست نمونه ۱۱ مربوط به بستانه و نمونه ۱۲ تا ۲۰ مربوط به لیپار .L : Ladder 50 , 100 bp



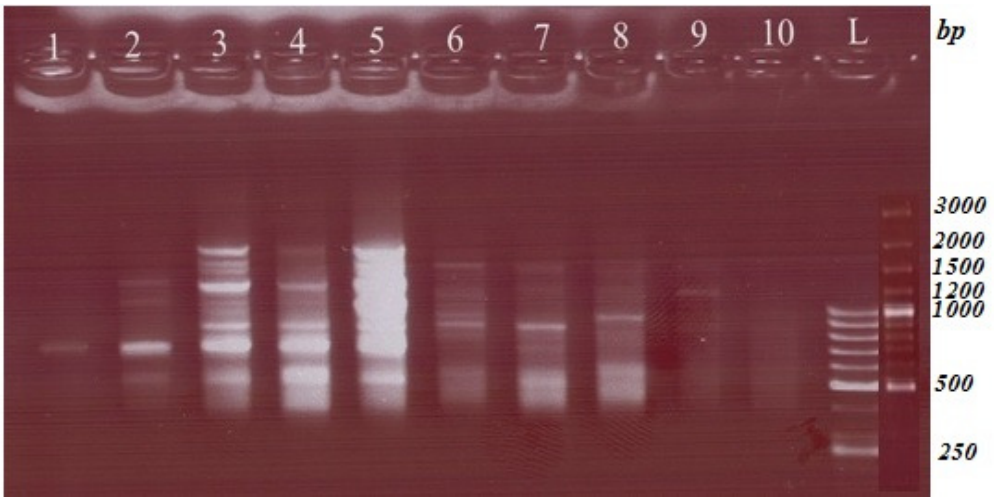
شکل ۳– ۱۰(c). محصولات PCR آغازگر ISSR- C در جمعیت *G. corticata* به ترتیب از چپ به راست نمونه ۲۱ تا ۳۰ لیپار ، L: Ladder 50 , 100 bp



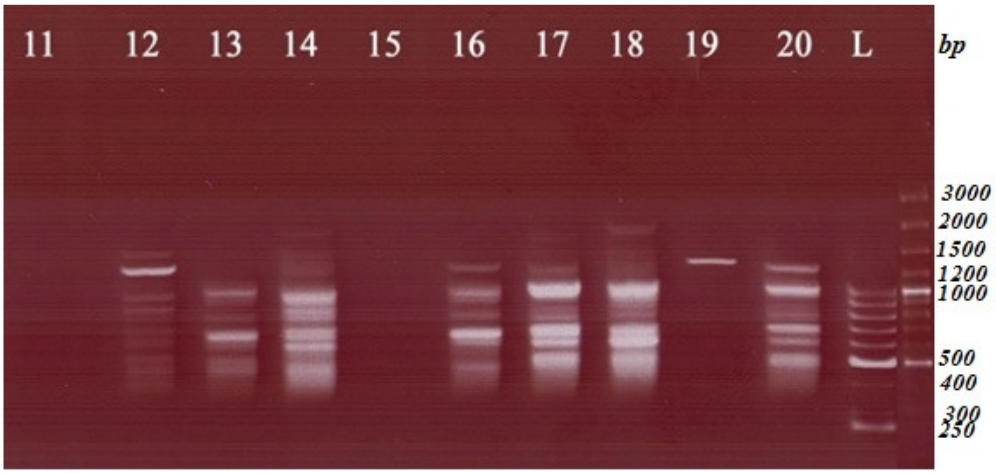
شکل ۳- ۱۰ (d). محصولات PCR آغازگر ISSR- C در جمعیت *G. corticata* به ترتیب از چپ به راست نمونه ۳۱ الی ٤١ منطقه لیپار ،. L : Ladder 50 , 100 bp

۳-۳-۳- محصولات PCR آغازگر ISSR- AB.

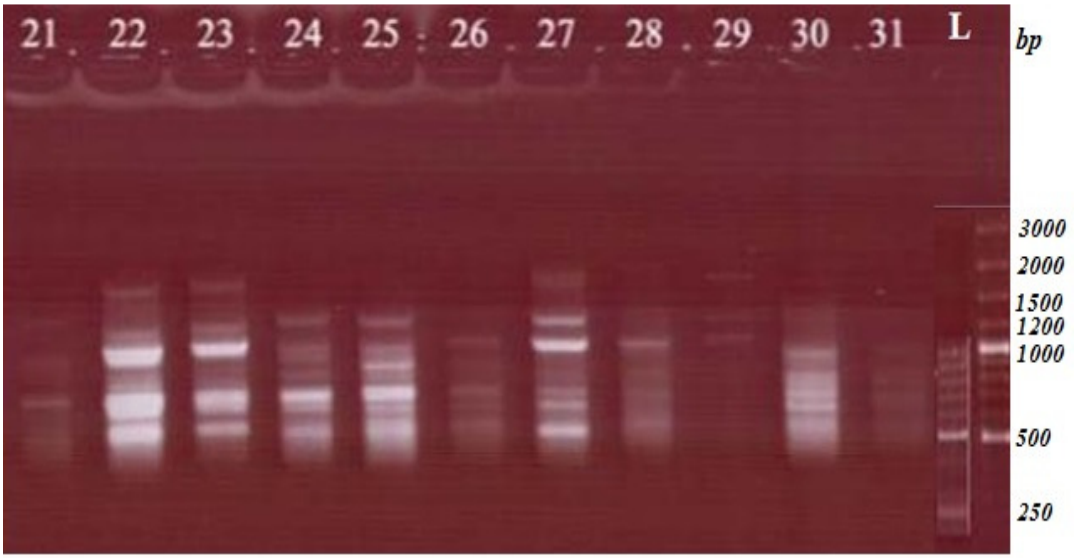
این آغاز گر در کل ۲۱ باند در محدوده bp ۳۰۰۰-۴۰۰ تکثیر نمودکه از بین آنها قطعه (باند) bp ۹۹۰ ویژه نـر و قطعه bp ۵۲۰ ویژه ماده ایجاد کرد. باندهای bp ۱۶۰۰ و bp ۱۹۰۰ قطعـات ویـژه تتراسـپورفیت ایجـاد کـرد (۳-۱۱(a) تا ۳- ۱۱(d))



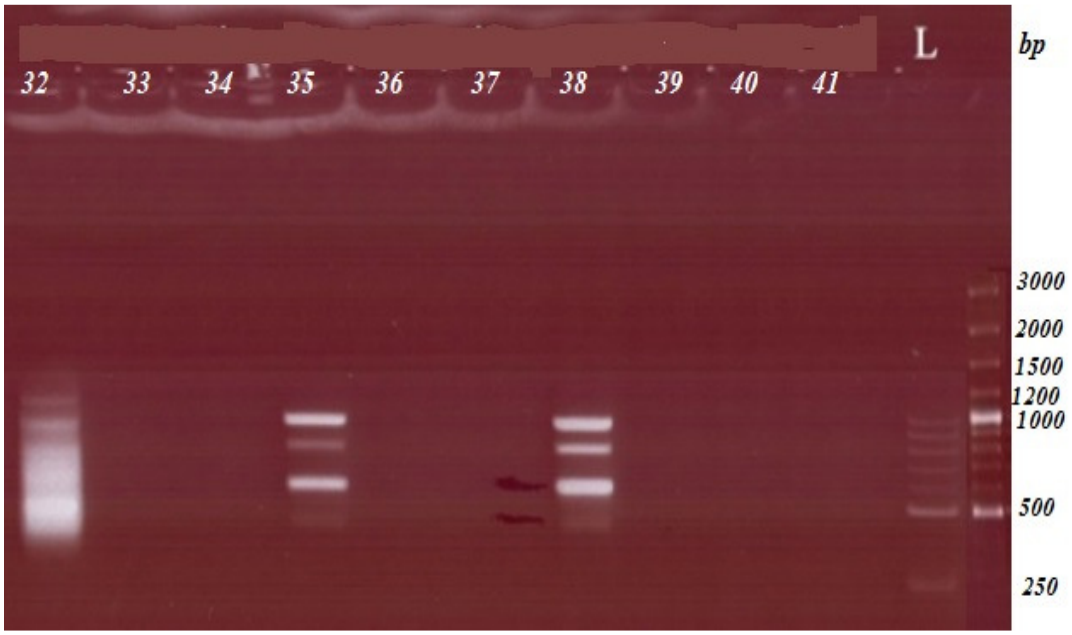
شکل ۳- ۱۱(a). محصولات PCR آغازگر ISSR- AB در جمعیت *G. corticata* به ترتیب از چپ به راست نمونه ۱ الی ۱۰ مربوط به بستانه. L : Ladder 50 , 100 bp



شکل ۳ – ۱۱(b). محصولات PCR آغازگر ISSR- AB در جمعیت *G. corticata* به ترتیب از چپ به راست نمونه ۱۱ مربوط به بستانه و نمونه ۱۲ تا ۲۰ مربوط به لیپار .L : Ladder 50 , 100 bp



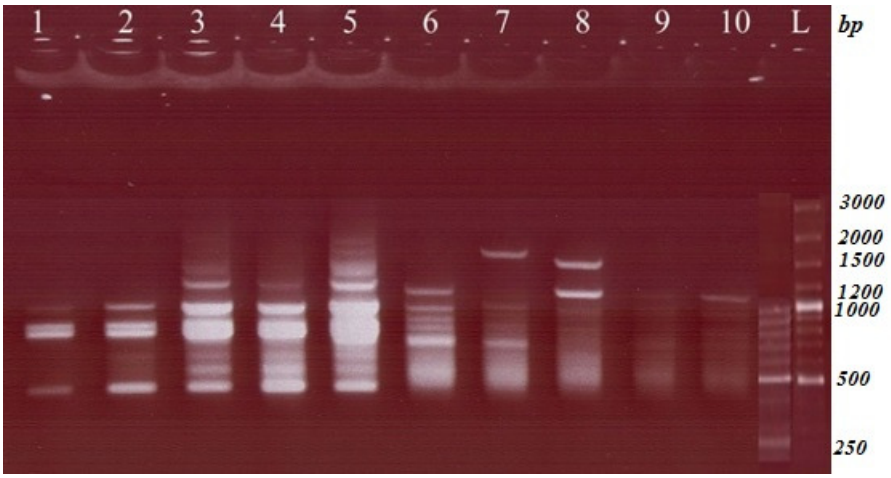
شکل ۳ – ۱۱(c). محصولات PCR آغازگر ISSR- AB در جمعیت ۲۱ تا ۳۱ *G. corticata* مربوط به نمونه های لیپار .L : Ladder 50 , 100 bp



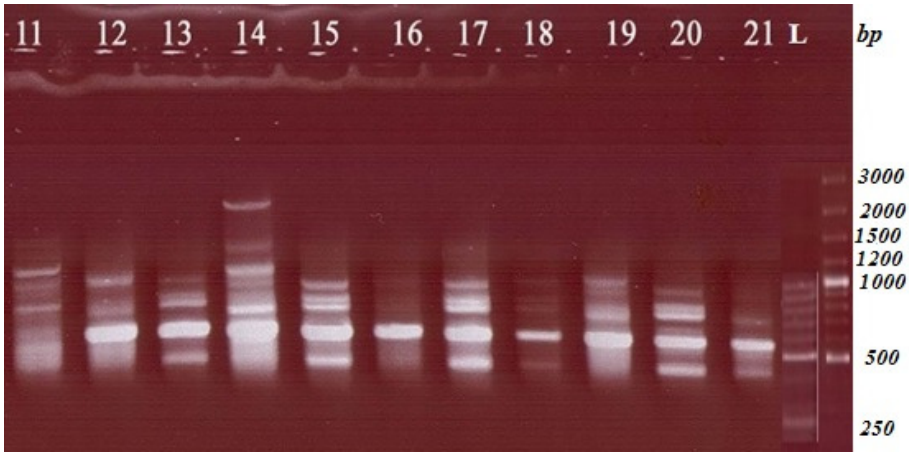
شکل ۳ – ۱۱(d). محصولات PCR آغازگر ISSR- AB در جمعیت *G. corticata* به ترتیب از چپ بـه راسـت نمونه ۳۲ الی ٤١ مربوط به نمونه ها ی لیپار . L : Ladder 50 , 100 bp

٤-۳-۳- محصولات PCR آغازگر ISSR- ABC 1

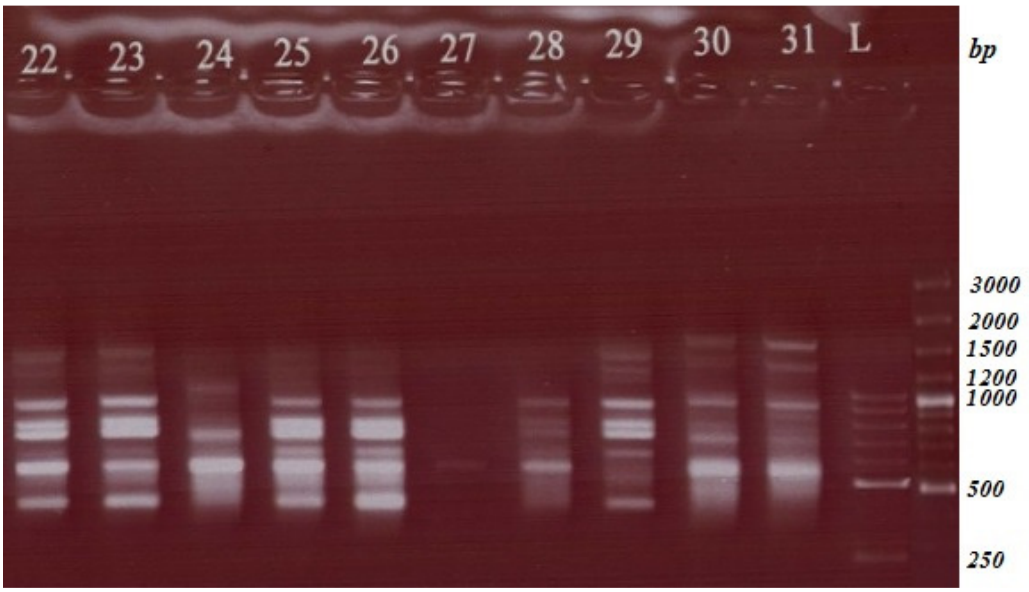
این آغاز گر در کل ۱۶ باند در محدوده ۳۰۰۰-۳۰۰ bp تکثیر نمودکه از بین آنها قطعه (باند) ۱۱۰۰ bp ویژه نر و قطعه ۵۰۰ bp ویژه ماده ایجاد کرد. تتراسـپوروفیت هـا ی دیپلوئیـد دو بانـد ۱۲۰۰ bp و ۱۵۰۰ bpتولیـد کـرد (۳-۱۲(a) تا ۳- ۱۲(d)).



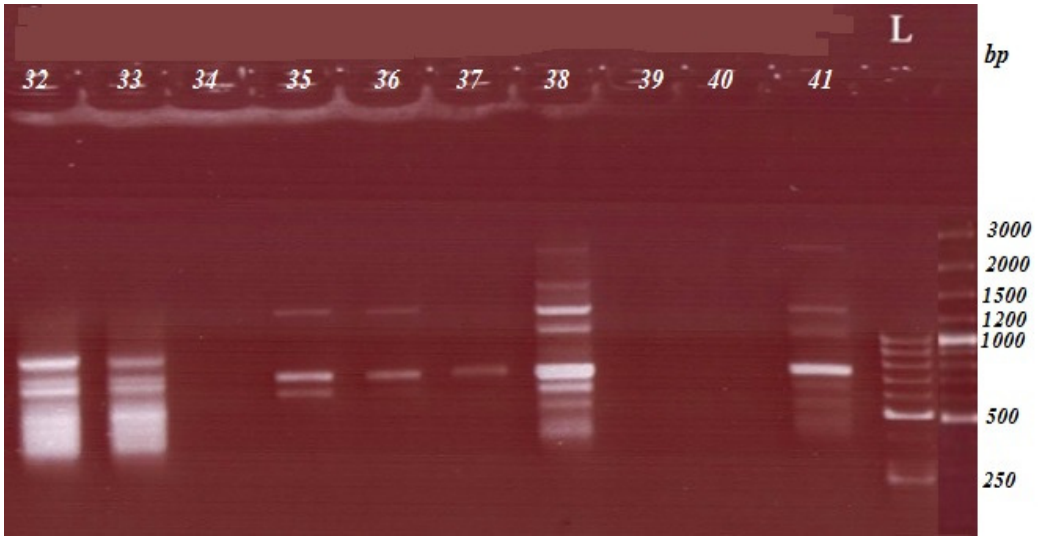
شکل ۳- ۱۲(a). محصولات PCR آغازگر ISSR- ABC 1 در جمعیت *G. corticata* از چپ به راست نمونه هـای ۱ الی ۱۰ مربوط به منطقه ی بستانه . L : Ladder 50 , 100 bp



شکل ۳- ۱۲(b). محصولات PCR آغازگر ISSR- ABC 1 در جمعیت *G. corticata* به ترتیب از چپ به راست نمونه ۱۱ مربوط به بستانه و ۱۲ تا ۲۱ مربوط به لیپار .L : Ladder 50 , 100 bp



شکل ۳- ۱۲(c). محصولات PCR آغازگر ISSR- ABC 1 در نمونه ۲۲ تا ۳۱ *G. corticata* لیپار ،
L : Ladder 50 , 100 bp



شکل ۳- ۱۲(d). محصولات PCR آغازگر ISSR- ABC 1 در نمونه های ۳۲ الـی ٤١ *G. corticata* مربـوط بـه منطقه لیپار ،. L : Ladder 50 , 100 bp

٤-۳ -تخمین سطح تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR

سطح تنوع ژنتیکی در این بررسی با استفاده از ۲۰ آغازگر ISSR، ۴۱ نمونـه از جلبـک قرمـز *G. corticata* در دو منطقه بستانه و لیپار بررسی گردید. از این تعداد ، ۴ آغازگر باند های پلی مورفیسمی صـد در صـد ایجـاد کـرد. (جدول ۳-۴). این ۴ پرایمر کلاً ۷۵ باند با میانگین ۱۸/۷۵ باند برای هر پرایمر ایجاد کرد و دامنه باند های ایجـاد شده بین. ۲۵۰ تا bp ۳۰۰۰ بود. بیشترین تعداد باندهای تشکیل شده مربوط به آغازگر AB بـا ۲۱ نـوار و کمتـرین نوار تشکیل شده مربوط به آغازگر ABC1 با ۱۶ نوار بود. بیشترین درصد چند شـکلی توسـط آغـاز گرهـا ۱۰۰ ٪ بود . دامنه مقدار عددی PIC برای این آغازگرها بین ۰/۲۸ و ۰/۳۳ با میانگین ۰/۳۰ بود. و پرایمر هـا بـا مجمـوع ۷۵ باند تکثیر شده، صد درصد پلی مورفیسم نشان دادند(جدول ۳-۴).

جدول ۳-٤- تعداد باندهای تولید شده و شاخص های محتوای اطلاعات پلی مرفیسمی و شاخص مـارکری و شاخص شانون توسط آغاز گرها پرایمر ISSR در تکثیر DNA جلبک *G.corticata*

کد آغازگر	توالی(´۳-´۵)	تعداد کل باندها	دامنه باندهای تولید شده(bp)	تعداد باندهای پلی مورفیسم	درصد پلی مورفیسم	PIC	MI	I
A	5'-(AG)$_8$C-3'	۲۰	۳۰۰ -۲۷۰۰	۲۰	٪ ۱۰۰	۰/۲۸	۵/۶۰	۰/۴۳
C	5'-(AG)$_8$T-3'	۱۸	۲۵۰ -۱۵۰۰	۱۸	٪ ۱۰۰	۰/۳۳	۵/۹۴	۰/۴۸
AB	5'-(GA)$_6$CC-3'	۲۱	۴۰۰-۳۰۰۰	۲۱	٪ ۱۰۰	۰/۳۱	۶/۵۱	۰/۴۷
ABC$_1$	5'-(GA)$_6$GG-3'	۱۶	۳۰۰-۳۰۰۰	۱۶	٪ ۱۰۰	۰/۲۸	۴/۴۸	۰/۴۴
مجموع	---	۷۵	۲۵۰-۳۰۰۰	۷۵	٪ ۱۰۰	---	---	---
میانگین	---	۱۸/۷۵	---	۱۸/۷۵	٪ ۱۰۰	۰/۳۰	۵/۶۳	۰/۴۶

بر اساس شاخص PIC و MI درصد تفکیک پلی مورفیسم پرایمر AB و C نسبت به سایر پرایمرها بیشتر بود که نشاندهنده بالاتر بودن قدرت تفکیک جمعیت این پرایمرها نسبت به سایر پرایمرها می باشد.

۱-٤-۳- محتوای اطلاعات چند شکلی[3]

محتوای اطلاعات چند شکلی با استفاده از فراوانی اللی برای هر آغازگر بطور جداگانه محاسبه گردید . بالاترین مقدار PIC مربوط به آغازگر C برابر ۰/۳۳ بود (جدول ۳-۴).و بعد از آن آغازگر AB با ۰/۳۱ مقام دوم و سپس آغاز گرهای A و ABC1 با مقدار PIC معادل ۰/۲۸ کمترین مقدار را به خود اختصاص دادند. PIC اکثر آغاز گرها عدد بزرگی بود که نشان دهنده انتخاب صحیح و کارایی بالای این آغازگرها در این بررسی می باشد.

۲-٤-۳- شاخص نشانگری[4]

شاخص نشانگری یک معیار کارا در تخمین پلی مورفیسمی یک آغاز گر می باشد. بطور کلی MI می تواند به عنوان یک معیار کلی برای ارزیابی نشانگر در یک ژرم پلاسم استفاده گردد.بر این اساس شاخص نشانگری برای تمام آغازگرها محاسبه گردید و این شاخص در این بررسی بین ۴/۴۸ تا ۶/۵۱ متغییر است (جدول ۳-۴) . آغازگرهای AB ، C و A به ترتیب با مقدار عددی ۶/۵۱ و ۵/۹۴ و ۵/۶۰ نسبت به نشانگر ABC1 با میزان ۴/۴۸ بالاترین مقدار را به خود اختصاص دادند.بنابر این می توانند به عنوان مارکر ISSR در مطالعات ژرم پلاسم جلبک استفاده گردد.

۳-٤-۳- آنالیز تنوع ژنتیکی نی[5]

آنالیز تنوع ژنتیکی برای هر یک از باندهای تولید شده توسط هر آغاز گر برای ۴۱ نمونه جلبک *G.corticata* در جدول ۱ پیوست نشان داده شده است. در این جدول تعداد نمونه ها برای هر لوکوس ۴۱ عدد و تعداد الل های مشاهده شده (na) در هر لوکوس به تعداد ۲ می باشد. بیشترین تعداد آلل های مؤثر (۱/۹۹۸۸)، مربوط به مکان ژنی آغازگرهای ABC1-7 ، AB1-18، A1-7 به ترتیب در مکان ژنی ۷ ، ۱۸ و ۷ می باشد و کمترین آن (۱/۰۵۰۰) در آغازگرهای A1-1 ،A1-8، A1-16 ، C1-5 ، C1- 18 و AB1- 21 به ترتیب در مکان ژنی ۱، ۸ ، ۱۶ ، ۵ ،۱۸ و ۱ مشاهده شده است. بیشترین مقدار تنوع ژنتیکی نی (۰/۴۹۹۷) در پرایمرهای A1 -7 ، AB1-18 و ABC1-7 و کمترین آن (۰/۰۴۷۶) در پرایمر های A1-1 ،A1-8، A1-16، C1-5، C1-18 و AB1-21 مشاهده گردید. بیشترین مقدار شاخص اطلاعاتی شانون (۰/۶۹۲۸) مربوط به مکان ژنی آغازگرهای ABC_1-7 ، AB_1-18، A_1-7 و کمترین آنها نیز (۰/۱۱۴۷)مربوط به آغازگر AB_1-21، C_1-18، C_1-5 ، A_1-16 ، A_1-8 و A_1-1 مشاهده شد.

---

[3] . PIC: Polymorphism information content
[4]. MI : Marker index
[5] . Nei

هتروزیگوسی کل (Ht)در مکان های ژنی آغاز گرهای A_1-7، AB_1-18 و ABC_1-7 با مقدار بیشینه ۰/۴۹۹۷ وکمترین آن (۰/۰۴۷۶) متعلق به مکان های ژنی A_1-1، A_1-8، A_1-16، C_1-5، C_1 -18 و AB_1-21 مشاهده گردید.

میانگین آلل های موثر(ne) ۱/۴۸۹۸، تنوع ژنتیکی نی(h) ۰/۲۹۸۹ و شاخص اطلاعاتی شانون (I) ۰/۴۵۶۲ و هتروزیگوسی کل (Ht) ۰/۲۹۶۸ برآورد گردید.

بررسی تجزیه و تحلیل آماری اختلاف ژنتیکی در جایگاه های ژنی بر اساس مقایسه جمعیت جلبک *G. corticata* در مناطق بستانه و لیپارتوسط نرم افزار POPGEN انجام شد و ۵۱ جایگاه چندشکلی در جمعیت بستانه با ۶۸ ٪ پلی مورفیسمی و ۶۹ جایگاه چندشکل با ۹۲ ٪ پلی مورفیسمی در منطقه لیپار مقایسه گردید.

تعداد آلل های مشاهده شده (na)در این دو منطقه به ترتیب۰/۴۶۹۶ ± ۱/۶۸۰۰ و ۰/۲۷۳۱ ± ۱/۹۲۰۰ با میانگین آللی ۲/۰ برآورد گردید که تعداد آلل های موثر(ne) آن در این دو منطقه به ترتیب ۰/۳۶۳۶ ±۱/۳۴۴۵ و و ۰/۲۸۹۲ ± ۱/۳۱۵۰ بود.اختلاف میانگین تنوع ژنی Nei در این دو منطقه ، ۰/۵۰۰۰ و میانگین شاخص شانون نیز به ترتیب ۰/۲۶۸۷ ±۰/۳۱۵۴ و ۰/۲۱۳۴ ± ۰/۳۳۴۰برآورد گردیدجدول (۳–۵) و (۳–۶)

جدول ۳ – ۵ - تجزیه و تحلیل آماری اختلاف ژنتیکی در جایگاه های ژنی بر اساس دو جمعیت منطقه بستانه (۱۱ تکرار)و جمعیت منطقه لیپار(۳۰ تکرار)توسط نرم افزار POPGEN

جمعیت جلبک	لوکوس های پلی مورفیسم		حجم نمونه	na*		ne*		h*		I*	
	تعداد	%		میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار
بستانه	۵۱	۶۸	۱۱	۱/۶۸۰۰	۰/۴۶۹۶	۱/۳۴۴۵	۰/۳۶۳۶	۰/۲۰۵۸	۰/۱۹۱۴	۰/۳۱۵۴	۰/۲۶۸۷
لیپار	۶۹	۹۲	۳۰	۱/۹۲۰۰	۰/۲۷۳۱	۱/۳۱۵۰	۰/۲۸۹۲	۰/۲۰۶۳	۰/۱۵۵۶	۰/۳۳۴۰	۰/۲۱۳۴

na * : تعداد آلل های مشاهده شده

*ne : تعداد آلل های موثر

*h : تنوع ژنی Ne i

*I : شاخص شانون

جدول ۳ – ٦ - تجزیه و تحلیل آماری اختلاف ژنتیکی در جایگاه های ژنی بر اساس مجموع دو جمعیت منطقه بستانه (۱۱ تکرار) و جمعیت منطقه لیپار(۳۰ تکرار)توسط نرم افزار POPGEN

جمعیت بستانه و لیپار	na*	میانگین	۲/۰۰۰۰
		انحراف معیار	۰/۰۰۰۰
	ne*	میانگین	۱/۳۳۱۹
		انحراف معیار	۰/۲۸۵۹
	h*	میانگین	۰/۲۱۸۶
		انحراف معیار	۰/۱۴۷۵
	I*	میانگین	۰/۳۵۵۹
		انحراف معیار	۰/۱۹۴۹
	Ht	میانگین	۰/۲۲۱۸
		انحراف معیار	۰/۰۲۳۲
	Hs	میانگین	۰/۲۰۶۱
		انحراف معیار	۰/۰۲۰۱
	Gst	میانگین	۰/۰۷۱۰
	Nm*	میانگین	۰/۵۴۷۲

Ht : هتروزیگوتی کل جمعیت

Hs : هتروزیگوتی قابل انتظاردرون جمعیت

Gst : نسبتی از کل تنوع ژنتیکی است که در تمایز زیر جمعیت ها قابل استفاده است

*Nm : تخمین جریان ژنی

تخمین جریان ژنی (Nm) مهاجرت تدریجی ژنها از یک جمعیت به جمعیت دیگر توسط عوامل مختلف می باشد که سبب تغییر فراوانی ژنی در جمعیت می گردد. بنابراین Nm میانگین تعداد مهاجرت ها در هر نسل برای هر لوکوس است. تخمین جریان ژنی در این بررسی برای تمامی لوکوس ها ۰/۵۴۷۲ برآورد گردید که نشانگر فراوانی ژن در این جلبک می باشد.

سنجش منشاء Nei شباهت و فاصله ژنتیکی جمعیت جلبک *G. corticata* را در مناطق بستانه و لیپار نشان می دهد و بر اساس این شاخص جمعیت های جلبک در این دو منطقه ۹۶ ٪ شباهت ژنتیکی دارند و از یک گونه محسوب می شوند.جدول ۳-۷

جدول ۳-۷- سنجش منشاء Nei شباهت و فاصله ژنتیکی جمعیت جلبک *G. corticata* در مناطق بستانه و لیپار بر اساس داده های نرمال شده[6]

شباهت جمعیت	۱	۲
۱	****	۰/۹۶۸۵
۲	۰/۰۳۲۰	****

**** مقادیر شباهت ژنتیکی Nei در بالای قطر و فاصله ژنتیکی در پایین قطر مشخص شده اند.

۳-۵- تجزیه واریانس مولکولی

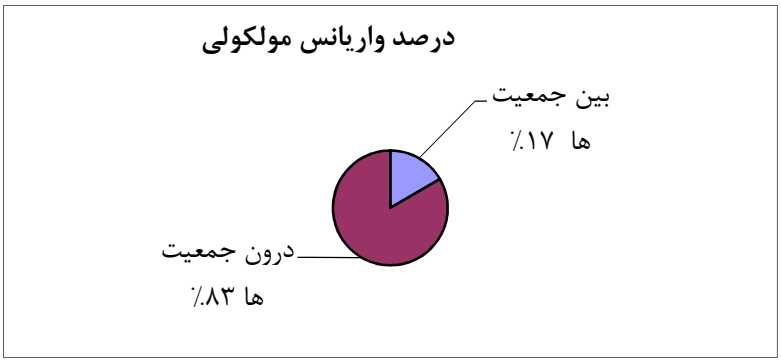
به منظور بررسی تنوع ژنتیکی بین و درون جمعیت های مورد مطالعه از تجزیه واریانس مولکولی استفاده شد. نتایج تجزیه واریانس مولکولی نشان دادکه تنوع ژنتیکی بین و درون جمعیت های مورد مطالعه در سطح احتمال ۱ ٪ معنی دار است (جدول ۳-۸). ۸۳ ٪ از تنوع کل ، مربوط به تنوع درون جمعیت ها و ۱۷ ٪ از تنوع کل ، مربوط به تنوع بین جمعیت ها می باشد(شکل ۳-۱۳). درصد بالایی از تنوع کل ، مربوط به تنوع درون جمعیتهاست.

جدول۳-۸ تجزیه واریانس مولکولی برای ٤١ نمونه گونه *G. corticata* بر اساس داده های مولکولی نشانگر ISSR با استفاده از نرم افزار GENALEX

منابع تغییر	درجه آزادی (df)	مجموع مربعات انحرافات(SSD)	میانگین مربعات(MS)	اجزاء واریانس	درصد واریانس	مقدار
بین جمعیت ها	۱	۴۴/۴۹۶	۴۴/۴۹۶	۲/۱۰۸	٪ ۱۷	۰/۱۶۶
درون جمعیت ها	۳۹	۴۱۱/۸۹۴	۱۰/۵۶۱	۱۰/۵۶۱	٪ ۸۳	
کل	۴۰	۴۵۶/۳۹۰		۱۲/۶۶۹	٪ ۱۰۰	

**معنی دار در سطح احتمال ۱ ٪ ($P < 0.01$)

[6] . Unbiased



شکل ۳-۱۳- نمایش درصد واریانس مولکولی درون و بین جمعیت

۶-۳- برآورد تنوع ژنتیکی بین جمعیت های جلبک مورد مطالعه

بر اساس شاخص تنوع ژنی نی[۷]، تنوع ژنتیکی در بین جمعیت ها بر آورد شد(جدول ۲ پیوست) و در بین آن ها نمونه ۳ با ۳۳ نوار بیشترین باند و نمونه ۴۰ با یک نوار کمترین باند را نشان داد. نمونه های ۱ تا ۳۳ ،استخراج DNA آن ها با استفاده از روش CTAB حداکثر تعداد باند(۳۵) و حداقل تعداد باند(۵) به ترتیب توسط نمونه های ۵ و ۱۰ حاصل شد. میانگین باندهای تولیدشده آن ۵/۹۲ ±۲۱/۰۶ بود.

نمونه های ۳۴ تا ۴۱ ،استخراج DNA آن ها با استفاده از روش SDS حداکثر تعداد باند(۲۲) و حداقل تعداد باند(۱) به ترتیب توسط نمونه های ۳۸ و ۴۰ حاصل شد. میانگین باندهای تولیدشده آن ۷/۳۸ ±۱۰/۵۰ بود.که علی ر غم اینکه از استخراج DNA توسط SDS باند های واضحی نسبت به روش CTAB ایجاد می شود ولی محصول PCR آن باند های کمتری تولید می کند.

نمونه های ۱، ۹ ، ۱۱ ، ۱۴ ، ۲۴ و ۳۰ دارای یک باند اختصاصی می باشد. از باند اختصاصی می توان برای اهداف کاربردی نضیر شناسایی ، تعیین خلوص و بررسی اختلاط جمعیت ها استفاده نمود . سطوح تنوع جمعیتها و اطلاعات تکمیلی در جدول۲پیوست و شکل ۱ پیوست نمایش داده شده است.

---

[7]. Nei

۷-۳- برآورد فاصله و شباهت ژنتیکی بین جمعیت های جلبک قرمز *G. corticata*

تجزیه وتحلیل شباهت ژنتیکی و فاصله ژنتیکی برای ۴۱ نمونه ازجلبک قرمز *G. corticata* از مناطق بستانه و لیپار بررسی گردید و میزان شباهت ژنتیکی و میانگین فاصله ژنتیکی نی بر اساس داده های نرمال شده(غیر اریب) درون جمعیت با استفاده از مارکر ISSR بکمک نرم افزار POPGEN انجام گرفت (جدول ۳پیوست).

فاصله ژنتیکی بین جمعیت های جلبک مورد بررسی از ۰/۰۰۰۰ تا ۰/۷۹۱۱ متغیر بود . کمترین فاصله ژنتیکی(صفر) مربوط به نمونه های ۲۲ و۲۳ از منطقه لیپار بود و این نمونه ها با داشتن کمترین فاصله ژنتیکی ، بیشترین شباهت ژنتیکی را نشان دادند به طوری که در جدول شباهت ژنتیکی با شباهت ژنتیکی (یک) دارای بیشترین شباهت می باشد. .

بیشترین فاصله ژنتیکی(۰/۷۹۱۱)بین نمونه های ۵ و۳۵می باشد که این دو به ترتیب متعلق به منطقه بستانه و لیپار می باشد. و این امر بیانگر وجود تنوع بین این دو نمونه می باشد. لذا این نمونه ها با داشتن بیشترین فاصله ژنتیکی کمترین شباهت ژنتیکی را نسبت به هم دارند.بنابراین می توان این نمونه ها را در صورت منطبق بودن صفات مورد اصلاح به عنوان والد در برنامه های دورگ گیری برای اصلاح گونه های جنس جلبکی و بدست آوردن حداکثر هتروزیس در جهت سازگاری با شرایط محیطی استفاده نمود.

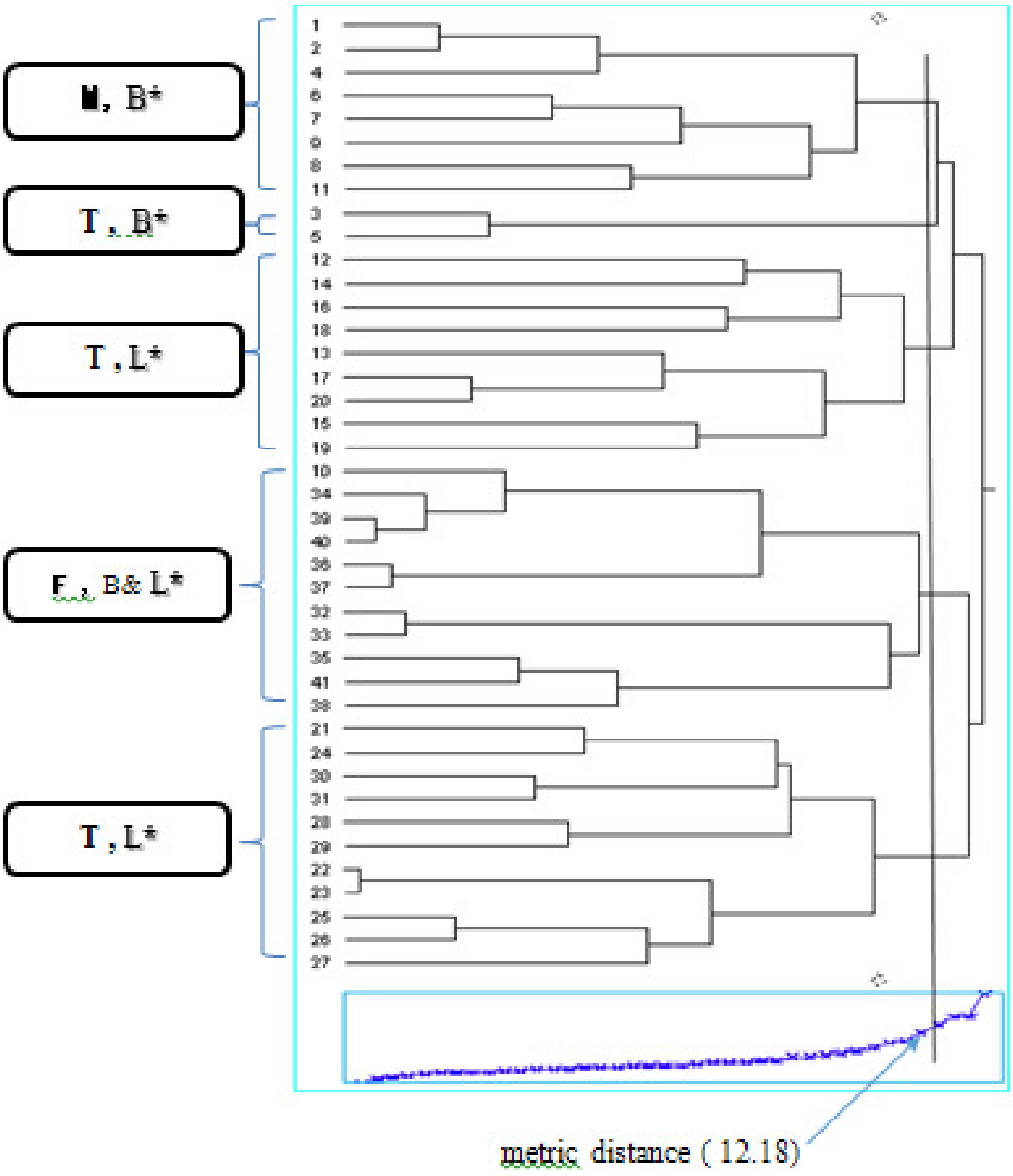
دراین جدول نمونه های ۲ با ۳، ۲ با ۴، ۹ با ۳۹، ۱۳ با ۱۵، ۲۱ با ۲۴، ۲۲ با۲۵ همگی فاصله ژنتیکی ۰/۱۷۴۴ نشان دادند. همچنین نمونه های ۷ با ۹، ۲۱ با ۲۵ و۲۲ با ۲۶ نیز همگی دارای فاصله ژنتیکی ۰/۱۵۸۹ می باشند.از نظر تشابه ژنتیکی نمونه های ۳۹ با ۴۰، ۳۶ با ۴۱ و ۳۷ با ۴۱ همگی ۰/۹۳۳۳ بودند. تشابه و فاصله ژنتیکی نمونه های تتراسپوروفیت ۳ با ۵ به ترتیب ۰/۸۹۳۳ و ۰/۱۱۲۸ برآورد گردید و نمونه های گامتوفیت نر ۸ با ۱۱ تشابه ژنتیکی ۰/۷۸۶۷ و فاصله ژنتیکی ۰/۲۴۰۰ نشان داد.تشابه و فا صله ژنتیکی گامتوفیت های ماده ۳۲ و ۳۳ نیز به ترتیب ۰/۹۳۳۳ و ۰/۰۶۹۰ برآورد گردید.

۸-۳- تجزیه خوشه ای حاصل از داده های ISSR به روش وارد[8]:

تجزیه و تحلیل خوشه ای برای ۴۱ نمونه ازجلبک قرمز *G. corticata* از مناطق بستانه و لیپار توسط روش Ward انجام گرفت (شکل ۳-۱۵ و جدول ۴پیوست)). دندروگرام بر اساس فاصله ژنتیکی با استفاده از نرم افزار popgen برای هر سه فاز زندگی *G.corticata* انجام گردید.در تجزیه کلاستر با برش دندروگرام ، ۴۱ نمونه در فاصله متریک ۱۲/۱۸ به پنج گروه مجزا دسته بندی شدند. در گروه اول نمونه های ۱، ۲، ۴، ۶، ۷، ۹، ۸، ۱۱ قرار گرفته است که با توجه به بررسی های آناتومیکی ،جمعیت جلبک های نر منطقه بستانه را تشکیل می دهند.گروه دوم نمونه ۳ و ۵ که طبق مشاهدات آناتومیکی جمعیت جلبک تتراسپوروفیت در این منطقه می باشد. گروه سوم نمونه جلبک های تتراسپوروفیت از منطقه لیپار بوده و نمونه های ۱۲، ۱۴ ، ۱۶، ۱۸، ۱۳، ۱۷، ۲۰، ۱۵و ۱۹ را شامل می شود.گروه چهارم نمونه های شماره ، ۳۴ ، ۳۹ ، ۴۰ ، ۳۶ ، ۳۷ ، ۳۲ ، ۳۳ ، ۳۵، ۴۱ و ۳۸ مربوط به جلبک های ماده در منطقه لیپار و نمونه ۱۰ از منطقه بستانه می باشد. گروه پنجم شامل جلبک های تتراسپوروفیت نمونه های شماره ۲۱، ۲۴، ۳۰، ۳۱، ۲۸، ۲۹، ۲۲، ۲۳، ۲۵، ۲۶ و ۲۷ می باشد.

---

[8]. Ward



شکل ۳-۱۵ – دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه ای ۴۱ نمونه *G. corticata* بر اساس فاصله متریک به روش ward در مناطق مورد بررسی.B . بستانه؛L .لیپار؛T.تراسپوروفیت؛ M.گامتوفیت نر؛F.گامتوفیت ماده

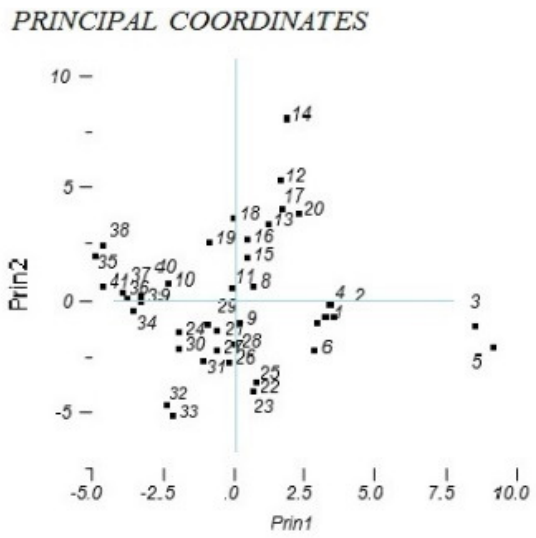
۹-۳- تحلیل داده ها بر اساس تجزیه به مولفه های اصلی[9]:

داده های حاصل از مطالعات مولکولی ۴۱ نمونه جلبک مورد بررسی بر اساس روش PCA نیز مورد بررسی و تحلیل قرار گرفت. نتایج حاصل از این آنالیز تائید کننده نتایج حاصل از آنالیز خوشه ای می باشد(شکل ۳- ۱۶) تجزیه به مولفه های اصلی بر اساس ۸۹ ٪ از اطلاعات به دست آمده از نشانگر ها ترسیم می گردد در حالی که دندروگرام براساس ۱۰۰ ٪ اطلاعات نشانگرها انجام می شود. بنابراین تفاوت جزئی بین دندروگرام و تجزیه به مولفه های اصلی ناشی از این مورد است. نتایج نشان دادکه دو مولفه اصلی اول مجموعاً ۲۳/۶۹ ٪ از تغییرات داده ها را در بر می گیرد . مولفه اول ۱۲/۸۵ ٪ و مولفه دوم ۱۰/۸ درصد از تنوع کل را تعیین نمود و برای اینکه ۸۹ ٪ تغییرات را شامل شود ۲۰ مولفه برای تغییرات کل آنها لازم است. این موضوع نشان دهنده این است که پرایمرهای انتخاب شده با بخش های مختلف ژنوم توانسته اند بیشترین تنوع ژنتیکی را نشان دهند که در نتیجه بیشترین پلی مورفیسمی ایجاد شد . نمایش دو بعدی جمعیت ها بر اساس دو مولفه اصلی ، گروه بندی حاصل از تجزیه خوشه ای را با تفاوت جزئی تایید نمود و توانست جمعیت های مورد بررسی را مانند تجزیه خوشه ای از هم تفکیک نماید (شکل ۳-۱۶) و (جدول ۳- ۹) .

جدول ۳- ۹ - درصد تجمعی و تغییرات جمعیت ها با استفاده از مولفه های مختلف

مولفه	۱	۲	۳	٤	۲۰	۲٦	۳٤
درصد واریانس	۱۲/۸۵	۱۰/۸۴	۸/۸۰	۷/۳۰	۱/۵۴	۰/۸۷	**۰/۲۸**
درصد تجمعی واریانس	۱۲/۸۵	۲۳/۶۹	۳۲/۴۹	۳۹/۸۰	۸۸/۸۷	۹۵/۱۵	**۹۹/۲۲**

[9]. PCA(Principal Component Analysis)



شکل ۳-۱۶- دیاگرام حاصل از جمعیت جلبک مورد بررسی بر اساس آنالیز مولفه اصلی (PCA)

٤-بحث و نتیجه گیری

٤-١- تفسیر داده های ریخت شناسی و آناتومی

در گونه *G. corticata* اغلب بدلیل تنوع در ریخت شناسی گیاه ممکن است با جلبک هایی نظیر *G. foliifera* و *G millardetii*. اشتباه گرفته شود(Iyer *et al.,* 2004) بطوریکه این گونه تا سال ۲۰۰۴ در آفریقای جنوبی گزارش نگردیده بود که احتمالاً بدلیل ظاهر متغییر آن می باشد که مشکلات متعددی را در شناسایی این گونه ایجاد می کند(Iyer *et al.,* 2004).و بر اساس مطالعات فیلوژنی نشان داده شد که در آبهای هند *G.foliifera* به گونه *G. corticata* نزدیک تر است در حالی که *G. salicornia* و *G. foliifera* از اجداد مشترک سرجشمه گرفته اند.(Pareek *et al.,* 2010).

G. foliifera در آبهای استان های هرمزگان(هرمز، لارک و قشم) و سیستان و بلوجستان (بریس و گوردیم) در فصول زمستان تا اوایل بهار گزارش شده است و از نظر ریخت شناسی اگر چه رنگ آن همانند *G. corticata* قرمز متمایل به ارغوانی تا قهوه ای یا سبز و ریسه های آن نواری و کشیده است ولی انشعابات آن با تقسیمات دوتایی منظم و متوالی بوده و انتهای انشعابات دو شاخه ای با رئوس تیز است و پهنای انشعابات اصلی آن باریکتر از *G. corticata* بوده و ارتفاع آن به ۲۰-۱۰ سانتیمتر می رسد. (قرنجیک و روحانی، ۱۳۸۹).

از نظر شکل ظاهری بین نمونه های نابالغ در اردیبهشت و خرداد منطقه بستانه اختلافی مشاهده نشد ولی ۴۰ ٪ نمونه های سری دوم بستانه بالغ بودند که تنها بالغین ماده با سیستوکارپ نیمه کروی برجسته بر روی ریسه ها با چشم غیر مسلح از نابالغین تمیز داده می شد و تتراسپوروفیت های بالغ و گامتوفیت های نر بالغ در مناطق بستانه و لیپار تنها به کمک میکروسکوپ قابل تشخیص از نابالغین بودند.

تشخیص جنسیت بر اساس ساختار آناتومی تنها در جلبک هایی با بلوغ کامل مشاهده شد. از مجموع نمونه های جمع آوری شده از منطقه بستانه در نوبت اول همگی نابالغ بوده و هیچیک از مراحل جنسیتی از طریق خصوصیات ریخت شناسی قابل تشخیص نبود. ولی نمونه هایی که از نظر زمانی به ترتیب با ۱ و ۳ ماه فاصله زمانی در ماههای خرداد و مرداد نمونه برداری شده بود ۴۰٪ و ۱۰۰٪ قابل تشخیص بود.

در بررسی که توسط Iyer و همکاران (۲۰۰۴) در آفریقای جنوبی بر روی *G. corticata* انجام شد هیچکدام از مراحل سیستوکارپ گیاه ماده، تتراسپوروفیت و اسپرماتانژیال کانسپتاکل گیاه نر مشاهده نشد که این موضوع احتمالا، بدلیل عدم رسیدگی جنسی در نمونه های مذکور می باشد .

در تشریح گیاه با استفاده از رنگ آمیزی آبی متیل و کالمن سلول های لایه قشری پوست و سلول های پارانشیمی که در بر گیرنده لایه مغزی است مشاهده گردید.از نظر رنگ آمیزی رنگ آبی متیل به تنهایی کفایت دارد و نیازی به استفاده از رنگ کالمن نمی باشد.در منابع دیگر از رنگ های سافرانین وآبی تولوئیدین. نیز توصیه گردید (Marín-Salgado and Peña-Salamanca, 2011) که نتایج مشابهی با روش فوق داشت.

در بررسی ریسه گیاه گراسیلاریا، تال رویشی شامل دو قسمت پوست و استوانه مرکزی است . سلول های

پوست کوچکتر هستند و از یک یا دو لایه تشکیل شده است و سلول های بیرونی دارای رنگدانه می باشند. استوانه مرکزی از سلول های بزرگ پارانشیمی تشکیل شده است. وضعیت لایه های خارجی ، اندازه و تعداد سلول های استوانه مرکزی و تغییر شکل سلول ها از ناحیه پوست به ناحیه مرکزی در تشخیص گونه های گراسیلاریا موثر می باشد(حسینی، ۱۳۸۳).بطوریکه در مقطع ریسه رویشی سلول های برجسته مغزی در ناحیه میانی توسط سلول های پارانشیمی و قشری احاطه می گردد(Marín-Salgado and Peña-Salamanca, 2011)

گامتوفیت ماده با مشاهده زوائد سیستوکارپ نیمه کروی با جشم غیر مسلح قابل تشخیص می باشد. سیستوکارپ بالغ پس از لقاح گامتوفیت نر(اسپرماتانژیا)با گامتوفیت ماده(کارپوگونیا) بر روی ریسه ماده بوجود میآید که پس از رسیدگی روزنه کوچک بر روی آن ایجاد شده که از قسمت انتهایی آن کارپوسپورها خارج می گردند. تشخیص ریسه ماده با استفاده ازمطالعات آناتومیکی در تحقیق فوق مقدور نبود که این موضوع در مطالعات سایر محققین نیز عنوان شده است بطوریکه تشخیص ماده بالغ قبل از لقاح بسیار مشکل بوده و پس از تخریب بافت توسط میکروسکوپ تشریحی قابل تشخیص است.ولی بعد از لقاح با گسترش cystocarp بر روی تالوس ماده ها قابل تشخیص با چشم غیر مسلح می باشند(Martinez *et al*., 1999).سیستوکارپ به صورت اجزاء کروی شکل در قسمت سطحی ساقه پراکنده شده و ممکن است به چهار بخش پریکارب ، گونیموبلاست، کارپوسپورانژ و فیلامنتهای جذب کننده که از بافت گونیموبلاست تا لایه پریکارپ امتداد داشته و فقط در برخی گونه ها مشاهده می شود(حسینی، ۱۳۸۳). پریکارب: شامل تعدادی لایه سلولی است که اغلب لایه ها بهم فشرده ودارای پیگمانهای رنگی می باشند. گونیموبلاست: واقع در مرکز سیستوکارپ و شامل سلولهای پارانشیمی است. کارپوسپورانژ: در بالای گونیموبلاست قرار گرفته است و به اشکال دایره ای یا تخم مرغی دیده می شود.(حسینی، ۱۳۸۳).

کاپوسپور ها [۱۰] از طریق یک روزنه کوچک یا دهانه در بالای سیستوکارپ[۱۱] آزاد می شوند و به تالوس های تتراسپوروفیت [۱۲] یا چهار هاگی[۱۳] جوانه می زنند. در مقطع عرضی تتراسپوروفیت برجسته صلیبی در بخش قشری ریسه جلبک با استفاده از رنگ آمیزی آبی متیل مشاهده گردید و در سطح اپیدرمی ریسه نیز بطور متراکم دیده می شود.تتراسپوروفیت بالغ تتراسپورونژیا را ایجاد می کند که عموماً در پوسته تالوس رخ می دهد.تتراسپورانژیوم بطور چلیپایی تقسیم می شود و ۴ اسپور یا تتراسپور که به ۴ تالوس گامتوفیت جوانه می زند که دو تا نر و دو تا تالوس ماده می باشند(Lewmanomont, 1996). در جنس نر *G. corticata* اسپرماتانژهادر داخل کنسپتاکل های عمیق تر بیضوی شکل مشاهده گردید. اسپرماتانژها به شکل کروی یا بیضوی و بطور پراکنده در

10. Carpospore
11. cystocarp
12. tetrasporophytes
13. tetrasporic

سطح تال دیده می شود. طرز قرارگرفتن کنسپتاکل اسپرماتانژها عامل مهم شناسایی گونه های گراسیلاریا از یکدیگر می باشد (حسینی، ۱۳۸۳).

۲-٤- تفسیر داده های استخراج و جدا سازی DNA

به دست آوردن DNA خالص از گیاه و ماکروجلبک ها[۱۴] معمولا فرایند دشوار می باشد.بایستی نسبت به تمیز کردن ریسه های جلبکی نمونه برداری شده اقدام و تمام مواد انگلی و اپی فیت [۱۵] حذف شود. بافت های مطلوب بخش های در حال رشد فعال و یا بخش های تولید گامت یا اسپور می باشد (Nishiguchi *et al.,* 2005). مرحله نخست در بیولوژی مولکولی جداسازی و خالص سازی با کیفیت بالا و مناسب از DNA می باشد. متاسفانه روش های جداسازی اسید نوکلئیک قابل اجرا برای گونه گیاهی معین، شاید برای گونه دیگر مناسب نباشد (Yee,1999). کیفیت DNA عامل مهمی در واکنش زنجیر پلی مراز است ،و DNA با کیفیت پایین منجر به تکثیر ضعیف می شود (Wang *et al* ., 2007). جداسازی DNA از جلبک قرمز به دلیل فعالیت بالای آنزیم های هسته ای (Shivji *et al.,* 1992)و مقادیر زیاد پلی ساکاریدها، که از فعالیت DNA پلیمراز ممانعت می نماید (Jin *et al.,* 1997)بسیار دشوار است(Chesnick and Cattolico 1993).همچنین استخراج DNA بدلیل جداسازی همزمان هیدروکلئوتید ها (آگار و کاراژینان) مشکل است.(Sosa and Oliveira,1992; Chesnick and Cattolico, 1993) . این ترکیبات محلولهایی با ویسکوزیته بالایی تولید می کنند که از فعالیت اندونوکلئازها و DNA پلی مرازها ممانعت بعمل می آورند(Jin *et al.,*1997). پلی ساکاریدها به طور موثری با استفاده از غلظت Cs Cl تحت اولترا سانتریفوژ ، و خالص سازی توسط الکتروفروز ژل آگارز و یا خالص سازی تحت ستون هیدروکسی آپاتیت [۱۶] حذف می گردد. (Watfier *et al*., 2000). اگر چه پروتکل هایی با این مراحل DNA با کیفیت بالا تولید می نمایند ولی آنها علاوه بر وقت گیر بودن به مقادیر زیادی از مواد نیازمند است(Watfier *et al*., 2000). مشکلاتی نظیر مقادیر کم DNA با استفاده از تکنیک شیب آنها ، صرف وقت و گران بودن روش(لی[۱۷]، ۱۹۹۷) منجر به توسعه روشهای جدید از قبیل استفاده ستون چرخش سفاروز[۱۸] روش های خالص سازی شامل پروتکل CTAB و ستون وابستگیQiagen گردید (Yee., 1999). روش CTAB و فنل کلروفرم بهترین عملکرد از نظر کیفیت و کمیت DNA دارد و برای نمونه با اتدازه بزرگتر مانند *G. changii* مناسب است *(*Sim *et al*.,2007**).** متاسفانه استخراج DNA از جلبک های دریایی بدلیل حضور پلی ساکارید های سولفاته پیچیده می باشد. خرد کردن و سائیدن نمونه با استفاده از نیتروژن مایع بطور معمول پلی ساکارید های محلول چسبناک متصل به DNA را آزاد می سازد. (Yee,1999).

---

14. macroalgal
15. epiphytic
16 . Hydroxyapatite
17 . Lee
18 . sepharose spin

بسیاری از روش های منتشر شده برای استخراج DNA از جلبک سبز ، جلبک قرمز و جلبک قهوه ای نیاز به بافت های خرد شده در نیتروژن مایع دارد.پلی ساکارید محلول چسبناک که به بافت جلبکی خرد شده در نیتروژن مایع متصل است جدا سازی آنها را از DNA مشکل می سازد ، بنابراین استیل تری متیل آمونیوم برمید در رفع این مشکل بکار می رود . بازده در محدوده ۶-۱۰ میکروگرمDNA از ۱ گرم از بافت تازه[19] بود(Varela-A´lvarez., *et al* 2006). روش CTAB بطور گسترده ای برای جداسازی DNA گیاهان عالی و جلبک ها بکار برده می شود زیرا CTAB در ترکیب با DNA ، فعالیت رسوبی خواهد داشت (Murray and Thompson,1980; Stewart and Via, 1993; Ho *et al.,* 1995; Milligan, 1998).

CTAB می تواند در حضور NaCl به اسید نوکلوئیک متصل شود و اسید نوکلوئیک-CTAB وقتی که غلظت NaCl از ۰/۷ به ۰/۳۵ کاهش می یابد رسوب می کند (Murray and Thompson, 1980).

در استخراج DNA عمل تکان دادن [20] از تجمع مواد می کاهد و آزادسازی DNA را افزایش می دهد(Watfier *et al.*, 2000) . مقادیر زیادی از پلی ساکارید ها و پروتئین ها به عنوان کمپلکس نمک رسوب می کند و عمل تکان دادن توسط ۳ بار واژگونی[21] آرام تیوپ ها می تواند رسوب را افزایش دهد (Watfier *et al*., 2000). جداسازی DNA از جلبک قرمز *G. corticata* با استفاده از پروتوکل CTAB و SDS با تغییراتی انجام گردید. میانگین غلظت DNA از نمونه ها در منطقه بستانه و لیپار به ترتیب ۳۱/۳۶ ng/μl با دامنه ای از ۵ تا ۱۳۰ نانوگرم بر میکرولیتر و۶۵/۵۰ ng/μl با دامنه ای از ۱۰ تا ۲۴۰ نانوگرم بر میکرولیتر بود و میانگین دامنه خلوص DNA بدست آمده بر اساس چگالی نوری نسبت طول موجهای ۲۶۰ به ۲۸۰ ($P=\lambda_{260/280}$) به ترتیب در این مناطق از ۱/۳۳(۱ تا ۱/۷) و و ۱/۵۶ (۱ تا ۲) تعیین گردید.

استخراج DNA از جلبک قرمز *Gracilaria change* نمونه برداری شده از سواحل مالزی ، جزیره کاری و تایلند با استفاده از روش CTAB ۱۰ تا ۵۲۸ نانوگرم بر میکرولیتر و نسبت طول موجهای $_{260/280}$ آن ۱ تا ۲/۴۵۲ گزارش گردید(Yee, 1999).

کمیت DNA جداسازی شده از جلبک مورد بررسی در مناطق مورد بررسی به روش CTAB با میانگین ۴۹/۱۷ و دامنه ای از ۵ تا ۲۴۰ نانوگرم بر میکرولیتر و میانگین آن به روش SDS ، ۷۰/۹۵ و دامنه ای از ۲۰ تا ۱۴۵ نانوگرم بر میکرولیترتعیین گردید و کیفیت آن ها نیز ۱/۴۵(۱- ۲) به روش CTAB و ۱/۵۹(۱/۲ تا ۱/۸) به روش SDS برآورد شد.

در مجموع دامنه خلوص DNA بدست آمده بر اساس نسبت طول موجهای $_{260/280}$ ، از ۱/۰۰ الی ۲/۰۰بود در حالی که محصول DNA در دامنه $^{ng}/_{\mu l}$۵ الی $^{ng}/_{\mu l}$۲۴۰ می باشد.

---

[19] . Fresh blades
[20] . shaking
[21] . inverting

پروتئین K و SDS در استخراج DNA استفاده می گردد(Saunders, 1993). اما ترکیبات فنلی به آسانی باندهای مولکول DNA را اکسید می کند. اگر غلظت بتا – مرکاپتواتانول[۲۲] به ۲ تا ۵ ٪ ($^{V}/_{V}$) افزایش یابد از اکسید اسیون فنل بطور موثری ممانعت می شود (Hu and Zhou, 2001).

تحت چنبن شرایطی در استخراج DNA، باند های واضحی بر ژل آگارز بدست می آید ولی DNA حاصل در تکثیر PCR مناسب نیست که بدلیل وجود پلی ساکارید ها می باشد.(Hu and Zhou, 2001).

در استخراج DNA به روش SDS با مقادیر کم نمونه (۱۰ میلی گرم وزن خشک گیاه)، حدود ۵ میکروگرم DNA با وزن مولکولی بالا می توان دست یافت (Watfier *et al.*, 2000).در این روش دمای ۳۷ °C برای لیز سلولی، استخراج پلی ساکارید ها را کاهش می دهد(Yee, 1999). افزایش درجه حرارت انکوباسیون به ۶۵ °C و یا دوبرابر کردن زمان انکوباسیون افزایش معنی داری در محصول DNA نخواهد داشت ولی بطور وسیعی مقدار استخراج همزمان پلی ساکارید ها را افزایش می دهد (Watfier *et al.*, 2000).سانتریفوژ بعد از مرحله لیز در ۳۷ °C (Patwary and van der Meer, 1994) و سرد کردن رسوب نمک (Dellaporta *et al.*, 1983) کمک به حذف پلی ساکارید ها با وزن مولکولی بالا می گردد(Watfier *et al.*, 2000).

در این بررسی اگرچه کنترل کیفی DNA استخراج شده به روش SDS نسبت به روش CTAB برروی ژل آگارز از باندهای نسبتاً واضح تری برخوردار بود ولی در محصول PCR آن باندهای کمتر و در نتیجه پلی مورفیسمی کمتری مشاهده گردید. در بررسی های قبلی نیز روش CTAB اصلاح شده بالاترین محصول DNA و نسبت طول موج 260/280 را تولید و در PCR–RAPD موفقیت آمیز بود.(Wang *et al* ., 2007).

نمونه DNA به دست آمده با استفاده از روش SDS (Watfier *et al.*, 2000) با سطوح بالایی از پروتئین ها و پلی ساکاریدهای آلوده بودند و نسبت 260/280 و 260/230 را کم نشان داد (۱/۲۵ و ۱/۱۲) و مناسب برای PCR نبود بنابراین، روش CTAB اصلاح شده برای جدا کردن DNA از نمونه Gracilaria مناسب ترین بود Wang *et al.*, (2007).

۳-٤- تفسیر داده های مولکولی ISSR

در این تحقیق با استفاده از ۲۰ پرایمر مختلف بر اساس نشانگر مولکولی ISSR، تنوع جنسیتی و ژنتیکی جلبک *G.corticata* بررسی گردید و با توجه به قابلیت پرایمرها در نشان دادن پلی مورفیسمی در نهایت از چهار پرایمر جهت بررسی تنوع جنسیتی و ژنتیکی استفاده شد. این نشانگر توانست بخوبی جنس های ایزومرفیک این گونه را از یکدیگر تفکیک نماید و پلی مورفیسم درون گونه ای بالایی را نشان دهد و ۸۳٪ از تنوع کل ، مربوط به تنوع درون جمعیت ها و ۱۷٪ از تنوع کل ، مربوط به تنوع بین جمعیت ها می باشد .

[22] - B – mercaptoethanol

شباهت ژنتیکی جمعیت جلبک *G. corticata* بر اساس شاخص سنجش منشاء نی[۲۳] در مناطق بستانه و لیپار با وجود فاصله جغرافیایی بسیار زیاد ۹۶ ٪ شباهت ژنتیکی دارند و از یک گونه محسوب می شوند. تورپ (۱۹۸۲) پیشنهاد کرد که مقادیر شباهت بالاتر از ۰/۸۵در جمعیت ها به یکسان بودن گونه دلالت دارد و مقادیر پایین تر از ۰/۴۵ به احتمال زیاد نشان دهنده گونه های جداگانه می باشد. مقادیر بین ۰/۴۵ و ۰/۸۵ نشان دهنده یک" منطقه خاکستری" است که برای شناسایی گونه معیارهای دیگری لازم است.(Thorpe, 1982).

در مطالعات انجام شده برروی *Gracilaria lemaneiformis* با استفاده از روش RAPD در چینگدائو ، شباهت درون جمعیت بیش از ۰/۹۶ و گزارش گردید و تشابه بین جمعیت وحشی جلبک *Gracilaria lemaneiformis* با جنسیت هاپلوئید نامعلوم و جمعیت وحشی با جنسیت هاپلوئید ماده از منطقه چینگدائو که با توجه به تفاوت مورفولوژیکی ۲ جمعیت مجزا در نظر گرفته شده بود با استفاده از روش RAPD ۰/۶۰۶ برآورد گردید Wang *et al* ., 2007).

آنالیز واریانس مولکولی داده های مولکولی به روش رپید جلبک قرمز *Mazzaella laminarioides* در ناحیه مرکزی شیلی در ایستگاههایی (کمتر از ۳۰ متر) اختلاف معنی داری نداشت در مقابل در مقیاس های فاصله ای بزرگتر (در میان ایستگاههای از ۵ تا ۶۰ کیلومتر)، افزایش فواصل جغرافیایی به نظر می رسد باعث افزایش جدایی بین جمعیت ها شود بطوریکه وجود موانع طبیعی از قبیل سواحل شنی یا دهانه رودخانه ها ممکن است نقشی در چنین جدایی ایفا کند. از این گذشته تمایز ژنتیکی قوی میان مکان هایی که با حداقل ۶۰ کیلومتر از هم فاصله دارند روی می دهد و این تمایز اجازه می دهد که افراد هر جمعیت با منشاء اصلی از طریق آنالیز متعارفی[۲۴] از همدیگر جدا شوند.این رویکرد، مهاجران بالقوه از یک جمعیت به جمعیت دیگر را امکان شناسایی داده است.(Faugeron *et al*., 2001) .

بررسی تنوع ژنتیکی بین و درون جمعیت های مورد مطالعه با استفاده از تجزیه واریانس مولکولی در سطح احتمال ۱ ٪ اختلاف معنی داری را نشان داد بطوری که ۸۳ ٪ از تنوع کل مربوط به تنوع درون جمعیت و ۱۷ ٪ نیز مربوط به تنوع بین جمعیت ها می باشد. درصد بالایی از تنوع کل ، مربوط به تنوع درون جمعیت ها است بنابراین در این بررسی اهمیت روی افراد بیشتر از جمعیت ها می باشد و این بدان معنی است که هر فرد در یک جمعیت به دلیل داشتن ویژگی های خاص از لحاظ مورفولوژیکی و سایر صفات باید به طور مجزا بررسی شود. بخش زیادی از تنوع درون جمعیت ها ناشی از بیشترین فاصله ژنتیکی (۰/۷۹۱۱۵) بین جمعیت های ۵ (تتراسپوروفیت)و ۳۵ (گامتوفیت ماده) به ترتیب از مناطق بستانه و لیپار می باشد. این امر بیانگر وجود تنوع بین جنسیت های این دو جمعیت می باشد. بنابر این از آن می توان در برنامه های اصلاح نژاد و افزایش هتروزیس

---

[23] . Nei

[24] - canonical discriminant

بهره جست. یکی از دلایل وجود فاصله ژنتیکی زیاد بین جمعیت های ۵ و ۳۵ وجود تفاوت درتعداد آلل های آن دو می باشد . این تفاوت ممکن است بیانگر وجود آلل های منحصر به فرد در یک گونه باشد.

نتایج حاصل از خوشه بندی وارد با استفاده از داده های مولکولی ISSR نشان داد ، ۴۱ جمعیت مورد بررسی بر اساس شباهت های جنسیتی و فاصله متریک (۱۲/۱۸) به ۵ گروه تقسیم می شوند.

گروه اول شامل جمعیت های ۱، ۲ ، ۴ ، ۶ ، ۷ ، ۸ ، ۹ و ۱۱ می باشد و شامل گامتوفیت نر از منطقه بستانه می باشند.

گروه دوم شامل جمعیت های ۳ و ۵ تتراسپوروفیت از منطقه بستانه بوده و گروه سوم شامل جمعیت های تتراسپوروفیت ۱۲ ،۱۳ ،۱۴ ، ۱۵ ،۱۶ ، ۱۷ ، ۱۸ ، ۱۹ و ۲۰ از منطقه لیپار می باشد.

گروه چهارم شامل جمعیت شماره ۱۰ مربوط به گامتوفیت ماده از منطقه بستانه و جمعیتهای شماره ۳۲ ،۳۳ ، ۳۴ ،۳۵ ،۳۶ ،۳۷ ، ۳۸ ، ۳۹ و ۴۰ مربوط به گامتوفیتهای ماده منطقه لیپار می باشند.

گروه پنجم شامل جمعیت های تتراسپوروفیت ۲۱ ،۲۲ ،۲۳ ،۲۴ ، ،۲۵ ،۲۶ ، ۲۷ ، ۲۸ ، ۲۹ ، ۳۰ و ۳۱ از منطقه لیپار می باشند.

دندروگرام حاصل از داده ها با توجه به اینکه ۴۱ جمعیت همگی متعلق به یک گونه می باشند و با توجه به طراحی پرایمر برای تعیین جنسیت ،دسته بندی جمعیت ها در گروه های مختلف می تواند ناشی از وجود جنسیت های مختلف در این دسته جات باشد بطوری که جمعیت ۳ و ۵ که جلبک تتراسپوروفیت از منطقه بستانه با شباهت ژنتیکی درون جمعیت ۰/۸۹۳۳ می باشد ، در یک شاخه نزدیک به هم قرار گرفته اند.از طرفی جمعیت ۲۴ و ۲۷ که هردو متعلق به جنسیت تتراسپوروفیت منطقه لیپار می باشند با شباهت ژنتیکی و فاصله ژنتیکی درون جمعیت به ترتیب ۰/۷۷۳۳ ، ۰/۲۵۷۰ با وجودی که در یک گروه قرار گرفته اند ولی در شاخه های جدا گانه ای واقع می باشند که این نشان دهنده تنوع درون گونه ای ناشی از تفاوت ژنتیکی و احتمالاً تفاوت در ترکیبات حاصل از بیان ژن های آنها می باشد.

کمترین فاصله ژنتیکی(صفر) مربوط به نمونه های ۲۲ و۲۳ از منطقه لیپار بود و این جمعیت ها با داشتن کمترین فاصله ژنتیکی ، بیشترین شباهت ژنتیکی را نشان دادند به طوری که در جدول شباهت ژنتیکی با شباهت ژنتیکی (یک) دارای بیشترین شباهت می باشد. . وجود شباهت بین این دو جمعیت یکی از ویژگی مهمی است که می توان از آن در برنامه تلاقی و تولید صفات جدید استفاده نمود.

در چین ژنتیک و اصلاح نباتات در کشت صنعتی *Laminaria japonica* بکار گرفته شده است و از واریته های جدید ٪۴۰-۸ محصول بیشتری تولید گردید و مقدار ید به میزان ٪۵۸-۲۰ بیشتر از گیاهان معمولی حاصل شد (Wu and Lin, 1987). استفاده تجاری از جلبک دریایی و افزون بر آن توسعه کشت گراسیلاریا و تولید صنعتی آگار نیازمند شناسایی صحیح آن می باشد.و نهال مناسب ،افزایش نرخ رشد و اصلاح ژنتیکی راه هایی جهت بهینه سازی بهره برداری تجارتی از جلبک های دریایی می باشند (Michele *et al.*, 2002) .

بر اساس شاخص تنوع ژنی نی ، تنوع ژنتیکی در بین جمعیت هایی که استخراج DNA آنها به روش CTAB انجام پذیرفته است برآورد شد. در این میان جمعیت ۵ و ۳ دارای بیشترین تعداد باند (۳۵ و ۳۳ باند) است سپس جمعیتهای ۱۲ ،۱۴ و ۱۷ با ۲۷ باند در رتبه بعدی قرار گرفته اند درحالی که در جمعیت ۱۰ (با ۵ باند) ،جمعیت های ۹ و ۲۹ (با ۱۳ باند) و جمعیت ۲۸ (با ۱۵ باند) به ترتیب کمترین باندها را تشکیل داده اند.

جمعیت های ۳ ، ۵ ، ۱۲ ، ۱۴ و ۱۷ همگی تتراسپوروفیت بوده و جمعیت ۹ گامتوفیت نر و جمعیت ۱۰ گامتوفیت ماده می باشد.

میزان هتروزیگوسیتی قابل انتظار[۲۵] بیانگر میزان تنوع اللی ناشی از وجود الل های جدید در هر جمعیت می باشد که یکی از عوامل بروز آن موتاسیون است یعنی تا زمانی که موتاسیون رخ ندهد الل های جدید ظاهر نمی شوند. و بطوری که مشاهده می شود در جمعیت جلبکی مورد بررسی میانگین هتروزیگوسیتی قابل انتظار در ۴۱ جمعیت ۰/۲ بود که نشان دهنده تنوع ژنی کم در دو جمعیت مناطق بستانه و لیپار می باشد و این امر بیانگر تنوع اللی ناشی از وجود الل های جدید در هر جمعیت می باشد.یکی از عوامل بروز این نوع الل ها ، موتاسیون است که بواسطه آن الل های جدید ظاهر می شوند.

گیل مین و همکاران در سال ۲۰۰۴ تعداد ۶ مارکر میکروساتلایت پلی مورفیک از کتابخانه DNA غنی شده از *Gracilaria chilensis* جدا کرد. تنوع ژنتیکی در ۲ جمعیت ارزیابی شد و نسبتاً میزان پایینی از هتروزیگوتی با دامنه ای از ۰/۰۰ تا ۰/۵۱معلوم گردید (Guillemin *et al*.,۲۰۰۴).

پارامترهای ،هتروزیگوسیتی مورد انتظار و نرخ مولتی پلکس به عنوان پارامترهای شاخص نشانگر می باشند و برای ارزیابی کل سیستم نشانگر استفاده می شود (Powell, 1996).

ضریب تنوع بین جمعیت ها[۲۶] نسبتی از کل تنوع ژنتیکی است که در تفکیک و تمایز زیرجمعیت ها قابل استفاده است . و چنانچه Hs بزرگتر از صفر باشد Gst کمتر از یک خواهد بود (کاملی، ۱۳۹۱).

در این بررسی میزان Gst برای هر لوکوس مورد بررسی کمتر از یک است که نشان دهنده میزان بالای تفکیک و تمایز برای هر دو جمعیت بستانه و لیپار می باشد.

تخمین جریان ژنی [۲۷] مهاجرت تدریجی ژنها از یک جمعیت به جمعیت دیگر توسط عوامل مختلف می باشد که سبب تغییر فراوانی ژنی در جمعیت می گردد. بنابراین Nm میانگین تعداد مهاجرت ها در هر نسل برای هر لوکوس است. میزان تخمین جریان ژنی در این بررسی در دو جمعیت لیپار و بستانه ۰/۵۴۷۲ می باشد که بیانگر وجود فراوانی ژن در یک لوکوس خاص از جمعیت ها نسبت به یکدیگر می باشند

---

[25] . Hs

[۲۶] Gst: نسبتی از کل تنوع ژنتیکی است که در تمایز زیر جمعیت ها قابل استفاده است

[27] . Nm

بیشترین مقدار هتروزیگوسیتی کل [۲۸] برای آغازگر های A ،C، AB1 و ABC1 به ترتیب ۰/۴۹۹۷، ۰/۴۹۲۶، ۰/۴۹۹۷، و ۰/۴۹۹۷ در مکان های ژنی ۷-۱ A ، ۶-۱ C ، ۱۸-۱ AB و ۷-۱ ABC می باشد و کمترین مقدار هتروزیگوسیتی کل برای آغازگر A ، ۰/۰۴۷۶در مکان های ژنی ۱-۱ A، ۸-۱ A، ۱۶-۱ A و برای آغازگر C ، ۰/۰۴۷۶در مکان ژنی ۱۸-۱ C و برای آغازگر AB1 ، ۰/۰۴۷۶در مکان ژنی ۲۱-۱ AB و برای آغازگر ABC1 ، ۰/۰۹۲۸در مکان های ژنی ۱-۱ ABC ، ۲-۱ ABC، ۸-۱ ABC و ۱۶-۱ ABC می باشد.همچنین میانگین هتروزیگوسیتی کل۰/۱۹۲۶ ± ۰/۲۹۶۸ برآورد گردید.

به منظور تعیین روابط ژنتیکی بین ۴۱ جمعیت مورد بررسی و نیز مشاهده فواصل بین جمعیت ها تجزیه به مولفه های هماهنگ اصلی[۲۹] به عنوان روشی مکمل برای تجزیه خوشه ای انجام گرفت و نتایج حاصل از این آنالیز تائید کننده نتایج حاصل از آنالیز خوشه ای می باشد . نتایج نشان دادکه دو مولفه اصلی اول مجموعاً ۲۳/۴۹ ٪ از تغییرات داده ها را توجیه کردند. مولفه اول ۱۲/۸۵ ٪ از تنوع کل را تعیین نمود و از این مقدار برای مولفه دوم ۱۰/۸ درصد بود. در آنالیز PCA هر چه مولفه های اصلی درصد تغییرات کمتری را توجیه کنند بیانگر این است که توزیع مناسبی در سطح ژنوم دارند . به همین دلیل برای بررسی تنوع ژنتیکی بهتر می باشند. اگر نشانگر از بخش های مختلف ژنوم انتخاب شده باشد همبستگی بین آنها کم خواهد بود و در نتیجه تعداد بیشتری مولفه برای تغییرات کل آنها لازم است. در این بررسی دو مولفه اصلی ۲۳/۷ ٪ تغییرات را در بر می گیرد و برای اینکه ۸۹ ٪ تغییرات را شامل شود ۲۰ مولفه برای تغییرات کل آنها لازم است. این موضوع نشان دهنده این است که پرایمرهای انتخاب شده با بخش های مختلف ژنوم توانسته اند بیشترین تنوع ژنتیکی را نشان دهند. و نمایش دو بعدی جمعیت ها بر اساس دو مولفه اصلی ، گروه بندی حاصل از تجزیه خوشه ای را با تفاوت جزئی تایید نمود و توانست جمعیت های مورد بررسی را مانند تجزیه خوشه ای از هم تفکیک نماید.

بالاترین مقدار محتوای اطلاعات چند شکلی [۳۰] با استفاده از فراوانی اللی مربوط به آغازگر C برابر ۰/۳۳ بود و بعد از آن آغازگر AB با ۰/۳۱ مقام دوم و سپس آغازگرهای A و ABC1 با مقدار PIC معادل ۰/۲۸ کمترین مقدار را به خود اختصاص دادند. PIC اکثر آغاز گرها عدد بزرگی بود که نشان دهنده انتخاب صحیح و کارایی بالای این آغازگرها در این بررسی می باشد.

دامنه مقدار عددی PIC برای این آغازگرها بین ۰/۲۸ و ۰/۳۳ با میانگین ۰/۳۰ بود. و پرایمر ها با مجموع ۷۵ باند تکثیر شده، صد درصد پلی مورفیسم نشان دادند.این مقادیر در جنس *G. dura* با استفاده از نشانگرISSR در سواحل غربی هند دامنه ای از ۰/۰۵ الی ۰/۸۵ با میانگین ۰/۳۱محاسبه گردید (Gupta *et al.*, 2011).

متوسط تنوع ژنی جلبک قرمز *Mazzaella laminarioides* در ناحیه مرکزی Chilean به روش رپید (RAPD) دارای دامنه ای از ۰/۲۱۰ تا ۰/۲۴۹ گزارش گردید (Faugeron *et al* .,2001)

---

[28] . Ht
[29] . PCA
[30]. PIC :Polymorphism information content

شاخص نشانگری[31] یک معیار کارا در تخمین پلی مورفیسمی یک آغاز گر می باشد و در این بررسی بین ۴/۴۸ تا ۶/۵۱ برآورد گردید. آغازگرهای AB ، C و A به ترتیب با مقدار عددی ۶/۵۱ و ۵/۹۴ و ۵/۶۰ نسبت به نشانگر ABC1 با میزان ۴/۴۸ بالاترین مقدار را به خود اختصاص دادند که نشاندهنده بالاتر بودن قدرت تفکیک جمعیت این پرایمرها نسبت به سایر پرایمرها می باشد. بنابر این می توانند به عنوان مارکر ISSR در مطالعات ژرم پلاسم جلبک استفاده گردد. این شاخص در گونه *G. dura* با استفاده از نشانگرISSR در سواحل غربی هند ۲/۹۹ محاسبه گردید (Gupta *et al.,* 2011).

مقدار PIC تخمینی از قدرت تشخیص دهندگی یک مارکر را بوسیله تعداد آلل ها در هر لوکوس و فراوانی نسبی آنها را بیان می کند. با توجه به اینکه مقادیر PIC از صفر تا یک متغییر است و هر چه این عدد بزرگتر باشد بیانگر فراوانی بیشتر پلی مورفیسم برای آن جایگاه در جمعیت تحت مطالعه است. ولی مارکر MI بدلیل اینکه تعداد کل باند ها در محاسبه آن منظور می شود به عنوان شاخص مارکری در نظر گرفته می شود.

در مجموع این آغاز گرها توانستند فاصله ژنتیکی ژنوتیپ ها را مشخص کنند بنابراین می توان از این آغازگرها ی ISSR به خوبی برای آنالیز مجموعه ژرم پلاسم های دیگرجلبک ها نیز بهره گرفت.

نتایج تجزیه و تحلیل آماری اختلاف ژنتیکی در جایگاه های ژنی بر اساس مقایسه جمعیت جلبک *G. corticata* در مناطق بستانه و لیپار، ۵۱ جایگاه چندشکلی در جمعیت بستانه با ۶۸٪ پلی مورفیسمی و ۶۹ جایگاه چندشکل با ۹۲ ٪ پلی مورفیسمی در منطقه لیپار نشان داد.

آنالیز تنوع ژنتیکی با استفاده از آغازگر ISSR ، باندهای پلی مورفیسم ۲۷/۰ تا ۵۵/۸ درصد در جلبک قرمز *Chondrus crispus* نشان داد(Wang *et al., 2008*).

تعداد آلل های مشاهده شده (na)در این دو منطقه به ترتیب۰/۴۶۹۶ ±۱/۶۸۰۰ و ۰/۲۷۳۱ ±۱/۹۲۰۰ با میانگین آللی ۲/۰ برآورد گردید که تعداد آلل های موثر(ne) آن در این دو منطقه به ترتیب ۰/۳۶۳۶ ±۰/۳۴۴۵ و و ۰/۲۸۹۲ ±۱/۳۱۵۰ بود.اختلاف میانگین تنوع ژنی Nei در این دو منطقه ، ۰/۵۰۰۰ و میانگین شاخص شانون نیز به ترتیب ۰/۲۶۸۷ ±۰/۳۱۵۴ و ۰/۲۱۳۴ ±۰/۳۳۴۰برآورد گردید

شاخص شانون توسط آغاز گرها ی A ، C ، AB و ABC1 به ترتیب ۰/۴۳ ، ۰/۴۸ ، ۰/۴۷ و ۰/۴۴ با میانگین ۰/۴۶ برآورد گردید. این شاخص در گونه *G. dura* با استفاده از نشانگرISSR در سواحل غربی هند ۰/۳۳ محاسبه گردید (Gupta *et al.,* 2011) و در بررسی دیگر آنالیز تنوع ژنتیکی با استفاده از آغازگر ISSR ، شاخص شانن[32] ۰/۱۶ تا ۰/۳۰ در جلبک قرمز *Chondrus crispus* نشان داد(Wang *et al., 2008*)

31. MI : Marker index
32. Shannon's index

بطور کلی با استفاده از آغازگرهای ISSR ، ۷۵ لوکوس در محدوده بین bp ۳۰۰۰ – ۲۵۰ مشاهده گردید. در مطالعات انجام شده با استفاده از نشانگر ISSR بر روی جنس *G.dura* اندازه قطعات تکثیر شده در محدوده ۱۶۰۰bp– ۱۵۰ گزارش شده است (Gupta *et al.*, 2011).

محصولات PCR آغازگر ISSR- A در کل ۲۰ باند در محدوده bp ۳۰۰۰–۳۰۰ تکثیر نمودکه از بین آنها قطعه (باند) تتراسپوروفیت ها ی دیپلوئید دو باند bp ۱۲۰۰ و bp ۱۷۰۰ تولید کرد و قطعه (باند) bp ۳۰۰ ویژه نر ایجاد کرد. این پرایمر باندهای واضحی برای گامتوفیت ماده ایجاد نکرد.

محصولات PCR آغازگر ISSR- C در کل ۱۸ باند در محدوده bp ۱۵۰۰–۲۵۰ تکثیر نمود.و از بین آنها دو باند bp ۸۲۰ و bp ۹۰۰ ویژه تتراسپوروفیت ها ی دیپلوئید تولید کرد و قطعه (باند) bp ۵۰۰ نیز ویژه گامتوفیت ماده ایجاد کرد. ولی باندهای ویژه ای برای تشخیص مراحل گامتوفیت های نر تشکیل نگردید.

محصولات PCR آغازگر ISSR- AB در کل ۲۱ باند در محدوده bp ۳۰۰۰–۴۰۰ تکثیر نمودکه از بین آنها قطعه (باند) bp ۹۹۰ ویژه نر و قطعه bp ۵۲۰ ویژه ماده ایجاد کرد. باندهای bp ۱۶۰۰ و bp ۱۹۰۰ قطعات ویژه تتراسپورفیت ایجاد کرد .

محصولات PCR آغازگر ISSR- ABC $_1$ این آغاز گر در کل ۱۶ باند در محدوده bp ۳۰۰۰–۳۰۰ تکثیر نمودکه از بین آنها قطعه (باند) bp ۱۱۰۰ ویژه نر و قطعه bp ۵۰۰ ویژه ماده ایجاد کرد. تتراسپوروفیت ها ی دیپلوئید دو باند bp ۱۲۰۰ و bp ۱۵۰۰تولید کرد .

در مطالعات دیکر ، روش RAPD به منظور شناسایی جنسیتی جلبک دوپایه *Gracilaria gracilis* استفاده گردید. ۶۹ پرایمر الیگو نوکلئوتید دکامر بر روی ۲ گروه (۲ توده) از DNA آزمایش گردید که شامل ۵ نر هاپلوییید و دیگری از ۵ ماده هاپلوئید بود . یکی از این پرایمرها با توالی TCGTCACCCC ، یک بخش خاص bp ۴۳۰ برای نرها و نیز یک بخش خاص bp ۶۲۰ برای ماده ها ایجاد نمود. افراد دیپلوئید (تترا اسپوروفیت ها) ، وقوع مشترک این ۲ بخش را نشان دادند (Martinez *et al.*, 1999).

باندهای ویژه جنسیت در *Gracilaria lemaneiformis* در سواحل چینگ دائو[۳۳] و خلیج ژان شان[۳۴] چین ,به روش RAPD و با استفاده از پرایمر CGACCAGAGC باند kb ۱/۴ در گامتوفیت ماده و تترا اسپوروفیت مشاهده شد و توسط پرایمر CCGGCCTTAG باند kb ۰/۶ در گامتوفیت نر و تترا اسپوروفیت ظاهر شد. پرایمر TTCCCCGCGC باند kb ۰/۷۶ را در گامتوفیت نر و تترا اسپوروفیت پدیدار کرد و همچنین این پرایمر(TTCCCCGCGC) باند kb ۰/۷۲ را نیز در گامتوفیت ماده و تترا اسپوروفیت ظاهر کرد و پرایمر TTCCCCGACC باند kb ۰/۳۷ را تنها در گامتوفیت نر نمایان کرد (Xiangfeng *et al.*, 1998).

تمایز جنسیتی در جلبک دریایی در پرورش آنها جهت انتخاب نژاد برای اصلاح کیفیت مقادیر بیشتر محصولات

[33] . Qindgdao
[34] . Zhanshan Bay

آنها سودمند است. (Whyte, 1981). به اینترتیب توسعه یک روش مولکولی مناسب و قابل اعتماد برای شناسایی و نمایش مرحله زندگی ایزومورفیک از آگاروفیت انگیزه ای جهت پرورش صنعتی آگاروفیت می باشد که منجر به بهبود محصول خواهد گردید. نشانگرهای مولکولی ابزار ارزشمندی برای شناسایی و بررسی تنوع ژنتیکی درون گونه ای و بین گونه ای از جمعیت های هم نژاد[۳۵] بوده است. علاوه بر این بکارگیری نشانگر مولکولی برای تشخیص مراحل جنسی ابزاری برای تمایز در مراحل زندگی گونه ها ، حتی در مرحله نابالغی[۳۶] می باشد که بطور معمول نیازمند صرف زمان طولانی برای توسعه و شناسایی اندام های تولید مثلی آنها است (Xiangfeng, 1998; Martinez *et al.,* 1999; Sim, 2007).

[35] . inbreeding
[36] . juvenile

پیشنهادها

تمایز جنسیتی در جلبک دریایی در پرورش آنها جهت انتخاب نژاد برای اصلاح کیفیت مقادیر بیشتر محصولات آنها سودمند است. به اینترتیب توسعه یک روش مولکولی مناسب و قابل اعتماد برای شناسایی و نمایش مرحله زندگی ایزومورفیک منجر به بهبود محصول در پرورش صنعتی آن خواهد گردید.

تشخیص مراحل ایزومورفیک جلبک موررد بررسی توسط تشریح ساختار آناتومی و بکمک میکروسکوپ تنها در مورد بالغین این گونه کاربرد دارد لذا با توجه به نتایج حاصل از این پروژه مشخص گردید مارکر مولکولی ISSR ابزار مناسبی در تمایز جنسی مراحل اولیه زندگی این گونه می باشد . در نتیجه با بکارگیری این مارکر می توان اقدام به تهیه نهال مناسب در برنامه های پرورشی نمود و با توجه به اینکه کیفیت آگار در جنس های نر ، ماده و تتراسپوروفیت متفاوت بوده می توان با تهیه ریسه های مناسب از این جلبک اقدام به پرورش و تکثیرآن در مقیاس های وسیع اقدام گردد.لذا موارد زیر جهت ادامه کار پیشنهاد می گردد.

- بررسی کیفیت و کمیت آگار در نسل های ایزومورفیک جلبک قرمز *G. corticata* و سایر گونه های جلبک قرمز
- بررسی تنوع جنسیتی جمعیت های مختلف سایر گونه های جلبک قرمزگراسیلاریا با استفاده از مارکر مولکولی ISSR
- بررسی صفات مختلف جلبک قرمز گراسیلاریا و شناسایی و تعیین توالی ژنهای مربوطه
- بررسی امکان دورگه گیری از جلبک های قرمز جهت اصلاح کیفیت مقادیر بیشتر محصولات.

تشکر و قدر دانی

بدین وسیله از ریاست محترم موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور و معاونین محترم موسسه به ویژه جناب آقای دکتر شریف روحانی ،مدیر محترم امور اداری جناب آقای مهندس توکل، مدیر محترم دفتر خدمات پژوهشی جناب آقای مهندس بابایی و کلیه عزیزانی که در مسیر انجام تحقیق از مساعدت آنها برخوردار بودیم از جمله جناب آقای دکتر کیمرام رئیس بخش بیولوژی و ارزیابی ذخایر موسسه تحقیقات تشکر و قدردانی می گردد.

همچنین از ریاست و معاونین محترم موسسه تحقیقات جنگل ها و مراتع کشور و اساتید و کارشناسان آزمایشگاه ژنتیک مولکولی و آناتومی این موسسه بویژه سرکار خانم عباس عظیمی و سرکار خانم مهندس جبلی که در انجام این تحقیق نهایت همکاری و مساعدت نمودند ، سپاسگزارم .از کلیه عزیزانی که در امر نمونه برداری جلبک از سواحل خلیج فارس و دریای عمان همکاری نمودند بویژه آقایان مهندس رامشی ، مهندس شوقی و مهندس آژنگ قدردانی می گردد.

منابع

- تایز، ل. و زایگر، ا.، ۱۳۷۸. فیزیولوژی گیاهی(جلد ۱). (ترجمه کافی،محمد، و لاهوتی،مهرداد، و زند، اسکندر، و شریفی،حمید رضا، و گلدانی،مرتضی)، مشهد : انتشارات جهاد دانشگاهی. صفحه ۳۴.
- حسینی، م. ر.، ۱۳۸۳ . دستورالعمل پرورش گیاه گراسیلاریا (*Gracilaria*) و فرآورده های علفهای دریایی در چین. انتشارات موسسه تحقیقات شیلات ایران. صفحات ۱ تا ۱۴.
- سهرابی پور،ج. و ربیعی،ر.، ۱۳۸۴. مطالعه تشریحی و ریخت شناسی گونه *Gracilariopsis Ingissima* از جلبک های قرمز آگاروفیت خلیج فارس در جنوب ایران
- طالب زاده، س. ع.، ۱۳۷۴. بررسی بیولوژیک هشت گونه از آبزیان کفزی (بندر لنگه تا جگین).مجله علمی شیلات ایران.شماره ۴. سال چهارم. زمستان ۱۳۷۴
- فرشادفر ،ع.، ۱۳۸۰. اصول و روش های آماری چند متغیره . انتشارات طاق بستان کرمانشاه . ۸۰۷ ص.
- قهرمان، ا.، ۱۳۸۹. گیاه شناسی پایه (جلد ۱). انتشارات دانشگاه تهران.صفحات ۳۵۸-۳۵۷.
- قرنجیک، ب. م. و روحانی ،ک.، ۱۳۸۹. اطلس جلبک های دریایی سواحل خلیج فارس و دریای عمان.۱۷۰ صفحه.
- کاملی، م.، ۱۳۹۱. بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت های مختلف سه گونه مرزه *Satureja* spp با استفاده از مارکر مولکولی ISSR در ایران ،دامغان:دانشگاه آزاد اسلامی، پایان نامه کارشناسی ارشد علوم گیاهی
- Andriamanantoanina, H., Chambat, G. and Rinaudo, M., 2007. Fractionation of extracted Madagascan *Gracilaria corticata* polysaccharides: structure and properties. Carbohydr Polym 68:77–88
- Ateweberhan, M. and Prud'homme van Reine, W.F., 2005. A taxonomic survey of seaweeds from Eritrea. *Blumea* 50: 65-111.
- Barsanti, L. and Gualtieri, P., 2006. Algae Anatomy, Biochemistry and Biotechnology.
- Beaumont, M.A., Ibrahim, K.M., Boursot, P. and Bruford, M.W., 1998. Measuring genetic distance.p. 315-325. In A. Karp et al. (ed.) Molecular tools for screening biodiversity. Chapman and Hall, London.
- Bolton, J.J., Oyieke, H.A. and Gwanda, P., 2007. The seaweeds of Kenya: checklist, history of seaweed study, coastal environment, and analysis of seaweed diversity and biogeography. *South African Journal of Botany* 73: 76-88.
- Børgesen, F., 1943. Some marine algae from Mauritius. III. Rhodophyceae. Part 2. Gelidiales, Cryptonemiales, Gigartinales. *Kongelige Danske Videnskabernes Selskab, Biologiske Meddelelser* 19(1): 1-85, 42 figs, 1 plate.
- Byrne, K., Zuccarello, G.C., West, J., Liao, M. and Kraft, G.T., 2002. *Gracilaria* species (Gracilariaceae, Rhodophyta) from southeastern Australia, including a new species, *Gracilaria perplexa* sp. nov: morphology, molecular relationships and agar content. Phycology 50:295–311
- Chesnick, J.M. and Cattolico, R.A., 1993. Isolation of DNA from eucaryotic algae. Methods Enzymol 224: 168-176.
- Danilova, T.V. and Karlov, G.I., 2006. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism for detection of sex-specific molecular markers in hop (*Humulus lupulus* L.). Euphytica 151:15–21
- De Clerck, O., Tronchin, E.M. and Schils, T., 2005. Red algae. Rhodophyceae. Guide to the seaweeds of KwaZulu-Natal. *Scripta Botanica Belgica* 33: 131-267.
- Dellaporta, S.L., Wood, V.P. and Hicks, J.B., 1983. A plant DNA mini-preparation: version II. Plant Mol Biol Reptr 1: 19-21.

- Destombe, C. and Valero, M., 2001. Population dynamics and stage structure in a haploid diploid red seaweed, *Gracilaria gracilis.*Journal of Ecology 2001. 89. 436-450.
- Dice, L. R ., 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. Ecology 26:297-302
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L., 1990. Isolation of plants DNA From fresh tissue. Focus12(1) :13-15
- Excoffier, L., Smouse, P.E. and Quattro, J.M., 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: applications to human mitochondrial DNA restriction data , Genetics 131:479 – 491
- Faugeron, S., Valero, M., Destombe, C., Martinez, E.A. and Correa, J.A., 2001. Hierarchicalspatial structure and discriminant analysis of genetic diversity in the red alga Mazzaellalaminarioides (Gigartinales , Rhodophyta).J.Phycol. 37,705-716(2001).
- Fujita, Y. and Migita, S., 1987. Fusion of protoplasts from thalli of two different colour types in *Porphyra yezoensis and development of fusion products. Japan J. Phycol. 35 :201-208*
- Geng, Y., Tang, S., Tashi, T., Song, Z., Zhang, G., Zeng, L., Zhao, J., Wang, L., Shi, J., Chen, J.and Zhong, Y ., 2009. Fine-and landscape-scale spatial genetic structure of cushion rockjasmine, Androsace tapete (Primulaceae), across southern Qinghai-Tibetan Plateau.Genetica 135:419–427
- Gordon , A.D., 1981. Classification. Chapman and Hall, London.
- Gower, J. C., 1971. Ageneral coefficient of similarity and some of its properties. Biometrics. 27: 857-872.
- Guillemin, M.L., Destombe, C., Faugeron, S., Correa, J.A. and Valero, M., 2004.Development of microsatellites DNA markers in the cultivated seaweed,*Gracilaria hilensis(*Gracilariales,Rhodophyta)
- Guillemin, M. L., Faugeron, S., Destombe, C., Viard, F., Correa, J A.and Valero, M., 2008.Genetic variation in wild and cultivated populations of the haploid diploid red alga *Gracilaria chilensis*: how farming practices favora sexual reproduction and heterozygosit doi : 10.1111/j.1558-5646.2008.00373.x
- Gupta, V., Baghel, R.S., Kumar, M., Kumari, P., Mantri, V.A., Reddy, C. R. K. and Jha, B., 2011. Growth and agarose characteristics of isomorphic gametophyte (male and female) and sporophyte of Gracilaria dura and their marker assisted selection. AQUA-629736; pp. 8.
- Hagopian, J.C., Reis, M., Kitajima, G.O., Bhattacharya, D. and Oliveira, M., 2004.Comparative Analysis of the Complete Plastid Genome Sequence of the Red Alga *Gracilaria tenuistipitata* var. liui Provides Insights into the Evolution of Rhodoplasts and Their Relationship to Other Plastids Journal of Molecular Evolution (2004) 59:464–477.
- Hallmann, A., 2007. Algal Transgenics and Biotechnology. Transgenic Plant Journal 2007 Global Science Books
- Ho, C.L., Phang, S.M. and Pang, T., 1995. Molecular characterization of *Sargassum polycystum* and *S. siliquosum* (Phaeophyta) by polymerase chain reaction (PCR) using random amplified polymorphic DNA (RAPD) primers. J. appl. Phycol. 7: 33–41.
- Hu, Y.J. and Zhou, Z.G., 2001. Extraction of RAPD-friendly DNA from *Laminaria japonica* (Phaeophyta) after enzymatic dissociation of the frozen sporophyte tissues. *J. Phycol. 13*: 415–422.
- Iyer, R., Clerck, O.D., Boltan, J.J. and Coyne, V.E., 2004. Morphological and taxonomic studies and Gracilariopsis species(Gracilariales, Rhodophyta) from South Africa. South African Journal of Botany 2004, 70(4): 521–539.
- Iyer, R., Tronchin, E.M., Bolton, J.J. and Coyne, V.E, 2005. Molecular systematics of the Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyta) with emphasis on Southern Africa. *Journal of Phycology* 41: 672-684.
- Jaccard, P., 1908. Nouvelles researches sur la distribution florale. Bull. Soc. Vaudoise Sci. Natl. 44: 223-270.
- Jin, H.J., Kim, J-H., Sohn, CH., deWreede, R.E., Choi, T.J., Towers, G.H.N., Hudson, J.B and Hong, Y.K., 1997. Inhibition of *Taq* DNA polymerase by seaweed extracts from British Columbia, Canada and Korea. J Appl Phycol 9: 383-388.
- Kappanna, A.N.and Rao, A.V ., 1963. Preparation and properties of agar–agar from Indian seaweeds. Indian J Technol 1:222–224
- Kim,M.S., Yang, M.Y. and Cho,G.Y., 2010. Applying DNA barcoding to Korean Gracilariaceae (Rhodophyta). Cryptogamie, Algologie, 2010, 31 (4): 387-401
- Korpelainen, H., Bisang, I., Hedenas, L. and Kolehmainen, J ., 2008. The first sex specific molecular marker discovered in the Moss Pseudocalliergon trifarium. J Hered 99(6):581–587

- Kosman, E., and Leonard, K.J., 2005.Similarity coefficients for molecular markers in studies of genetic relationships between individuals for haploid, diploid, and polyploidy species. Molecular Ecology 14:415 – 424.
- Lee, Y. and Kang, S., 2001. *A catalogue of the seaweeds in Korea*. pp. [8], 1-662. Jeju: Cheju National University Press.
- Lee, M.H. and Nicholson, P., 1997. Isolation of genomic DNA from plant tissues Nature Biotechnology 15:805-806
- Lewmanomont, K., 1996. Report on a Regional Study and Workshop on the Taxonomy, Ecology and Processing of Economically Important Red Seaweeds (GCP/INT/FRA) (FAO)
- Li, W. H., 1976. Effect of migration on genetic distance. Am. Nat. 110:841- 847
- Li, J.M. and Jin Z.X., 2008.Genetic structure of endangered *Emmenopterys henryi Oliv* based on ISSR polymorphism and implications for its conservation. Genetica 133:227–234
- Liu, X.W. and Gordon, M.E, 1987. Tissue and cell culture of New Zealand *Pterocladia and Porphyra species. Hydrobiologia 151/152:pp. 147- 154*.
- Marín-Salgado, H. and Peña-Salamanca, E. J., 2011. Características histológicas de las fases reproductivas del alga roja Gracilaria blodgettii (Gracilariaceae). Rev. Acad. Colomb. Cienc. 35(135): 125-132, 2011. ISSN 0370-3908.
- Martinez, E.A., Destombe, C., Quillet, M.C. and Valero, M., 1999. Identification of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers highly linked to sex determination in the red alga *Gracilaria gracilis*. Mol Ecol 8:1533–1538.
- Medlin, L. K and Kooistra, W. H.C. F., 2010. Methods to Estimate the Diversity in the Marine Photosynthetic Protist Community with Illustrations from Case Studies: A Review.pp 990
- Menkir, A., Goldsbrough, P. and Ejeta, G., 1997.RAPD based assessment of genetic diversity in cultivated races of Sorghum, Crop Sci. 37: 564 – 569.
- McHugh, D.J ., 2003. A guide to the seaweed industry. FAO Fisheries Technical Paper No. 441. FAO, Rome, p 105
- Michele, K., 2002. DNA Isolation Procedures.pp.250-287
- Milligan, B.G ., 1998. Totel DNA isolation. In Hoelzel AR (ed.), Molecular Genetic Analysis of Populations: A Practical Approach. 2nd edn. Oxford University Press, Oxford, pp. 29–64.
- Muñoz, J.and Fotedar, R., 2009. Epiphytism of Gracilaria cliftonii (Withell, Millar & Kraft) from Western Australia. J Appl Phycol.DOI 10.1007/s10811-009-9469-y
- Murray, M.G.and Thompson,W.F., 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res. 8: 4321–4325.
- Narasimha, G.M., 1989. Seasonal growth, phytomass and spore shedding of bangiopsis subsimplex (MONT.) Schmitz. MAHASAGAR Vol. 22, No.3(sept),pp.143-146
- Nei, M., 1973. Analysis of gen diversity in subdivided populations.Proc Natal Acad Sci USA 70: 3321 – 3323.
- Nei, M and Li, W. H ., 1979. Mathematical model for study ing genetic variation in terns restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad.Soc. USA., 76: 5269- 5273
- Nishiguchi, M. K., Doukakis, P., Egan, M., Kizirian, D., Phillips, A., Prendini, L., Rosenbaum, H.C., Torres, E., Wyner, Y., DeSalle, R.and Giribet, G., 2005. DNA Isolation Procedures
- Norton, T.A., Melkonian, M and Andersen, R.A., 1996. Algal biodiversity. Phycologia 35:
- 308-326
- Oliveira, E., Österlund, K. and Mtolera, M.S.P., 2005. *Marine Plants of Tanzania. A field guide to the seaweeds and seagrasses*. pp. 267, Numerous coloured illustrations and line drawings. Stockholm: Botany Department, Stockholm University.
- Olsen, J.L., 1990. Nucleic acid in algae systematics. J. Phycol. 26:209-214
- Pang,Q., Sui, Z., Kang, K.H., Kong, F., and Zhang, X., 2010. Application of SSR and AFLP to the analysis of genetic diversity in *Gracilariopsis lemaneiformis* (Rhodophyta)., J Appl Phycol (2010) 22:607–612
- Pareek, M., Mishra, A. and Jha, B., 2010. Molecular phylogeny of *Gracilaria* species inferred from molecular markers belonging to three different genomes. *Journal of Phycology* 46(6): 1322-1328.
- Patwary, M.U. and van der Meer, J.P., 1994. Application of RAPD markers in an examination of heterosis in *Gelidium vagum.* (Rhodophyta) J Phycol 30: 91-97.
- Peakall, R. and smouse, P.E., 2006. Genalex 6.5: genetic analysis in Excel. Populstion genetic software For Teaching and research, Mol . Ecol. Notes 6 , 288-295.

- Peng, C., Hong-B.O.S., Di, X. and Song, Q., 2009. Progress in Gracilaria biology and developmental utilization: main issues and prospective. Rev Fish Sci 17:494–504.
- Pham, M.N., Tan, H.T.W., Mitrovic, S. & Yeo, H.H.T., 2011. *A checklist of the algae of Singapore*. pp. 1-100. Singpore: Raffles Museum of Biodiversity Research, National University of Singapore.
- Polne-Fuller, M. and Gibor, A., 1987. Callus and callus- like growth in seaweeds:Induction and culture. Hydrobiologia 151/152. pp. 131-138
- Powell, W., Morgante, M.and Andre, C., 1996.The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) marker for germplasm analysis. Mol Breed 2:225–238
- Provan, J ., 2003. Universal plastid primers for Chlorophyta and Rhodophyta.pp.43-50 .
- Provasoli, L., 1968. Media and prospects for the cultivation of marine algae. In A. Watanabe, A Hattori (eds), Cultures and Collections of Algae. Japanese Society Plant Physiology, Hakone: 63-75.
- Qian, W., Ge, S. and Hong, D.Y., 2001. Genetic variation within and among populations of a wild rice *Oryza granulata* from China detected by RAPD and ISSR markers. Theor Appl Genet 102:440–449
- Radner, R.J., 1996. Algal diversity and commercial algal products. BioScience 46: 263-270.
- Ramírez, M.E. and Santelices, B., 1991. Catálogo de las algas marinas bentónicas de la costa temperada del Pacífico de Sudamérica. *Monografías Biológicas* 5: 1-437.
- Sahoo, D., Nivedita and Debasish., 2001. *Seaweeds of Indian coast*. pp. xxi + 283. New Delhi: A.P.H. Publishing.
- Saunders, G.W., 1993. Gel purification of red algal genomic DNA: an inexpensive and rapid method for the isolation of polymerase chain reaction-friendly DNA. J. Phycol. 29: 251–254.
- Shivji, M.S., Rogers, S.O. and Stanhope, M.J., 1992. Rapid isolation of high molecular weight DNA from marine macroalgae. *Mar. Ecol. Prog. Ser. 84*: 197–203.
- Silva, P.C., Basson, P.W. and Moe, R.L., 1996. Catalogue of the benthic marine algae of the Indian Ocean. University of California Publications in Botany 79: 1-1259.
- Sim, M.C, Lim, P.E, Gan, S.Y.and Phang, S.M., 2007. Identification of random amplified polymorphic DNA (RAPD) marker for differentiating male from female and sporophytic thalli of *Gracilaria changii* (Rhodophyta). J Appl Phycol 19:763–769
- Sohrabipour, J. and 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(1): 131-162, Plates (photos).
- Song, Z., Li. X., Wang, H. and Wang, J ., 2010. Genetic diversity and population structure of *Salvia miltiorrhiza* Bge in China revealed by ISSR and SRAP. Genetica 138:241–249
- Sosa, P.A and Oliveira, M.C., 1992. DNA extraction from macroalgae. Appl Phycol Forum 9:7-9.
- Stewart, W.D.P., 1974. Algal physiology and biochemistry.University of California Press. 989 p
- Stewart, C.N. and Via, L.E ., 1993. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. BioTechniques 14: 748–749.
- Subbarangalah, G., 1983. Seasonal Growth Reproduction and Spore shedding in *Gracilaria corticata* J.Agardh of the Visakapatnam Coast.
- Tams, S.H., Melchinger, A.E.and Bauer, E., 2005. Genetic similarity among European winter triticale elite germplasms assessed with AFLP and comparisons with SSR and pedigree data . Plant Breeding 124- 160.
- Thorpe, J.P., 1982. The molecular clock hypothesis: biochemical evaluation, genetic differentiation, and systematics. *Ann. Rev.Ecol. Syst. 13*: 139–168.
- To¨rje´k, O., Bucherna, N., Kiss E.and Homoki, H., 2002. Novel male-specific molecular markers (MADC5, MADC6) in hemp. Euphytica 127:209–218
- Tseng, C.K., 1984. Phycological research in the development of the Chinese seaweed industry. Hydrobiologia 116/117:7-8.
- Unostegui, A.G., Jimenez, P.G., Marian, F., Robledo, D.and Robaina, R., 2002.Polyamines influence maturation in reproductive structures of *Gracilaria cornea*(Gracilariales,Rhodophyta. J.Phycol.98,1169-1173
- Wang, P.R., Yao, H.X.and Chen, Q., 1995. Compositional characteristics of organic oxygen compounds in extract from Yimin Brown Coal. Jianghan Petrol Ins (in Chinese). 17(2):33-37
- Wang, X., Zhao, F., Hu, Z., Critchley, A.T., Morrell, S.L. and Duan, D., 2008. Inter-simple sequence repeat (ISSR) analysis of genetic variation of Chondrus crispus populations from North Atlantic. Aquat Bot 88:154–159

- Wang, H.Z, Wu, Z.X., Lu, J.J., Shi, N.N., Zhao, Y., Zhang, Z.T.and Liu, J.J. M., 2009.Molecular diversity and relationships among Cymbidium goeringii cultivars based on inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. Genetica 136:391–399
- Wang, W.j ., Wang, G .C., Gao, Z.Q., Lin, X.Z and Xu, P., 2007.Characterization of *Gracilaria lemaneiformis* Bory (Gracilariaceae, Rhodophyta) cultivars in China using the total soluble proteins and RAPD analysis. Botanica Marina 50 (2007): 177–184 _ 2007
- Varela-A´lvarez,E., Andreakis, N., Lago-Lesto´n, A., Pearson, G.A., Serra˜o, E.A., Procaccini, G., Duarte, C.M., AND Marba´, N., 2006. Genomic DNA isolstion from Green and Brown algae (Caulerpales and Fucales) for microsatellite library construction . . Phycol. 42, 741–745 (2006).
- Watfier, R.M., Prodohl, P.A and Maggs, C.A., 2000. DNA Isolation Protocol for Red Seaweed (Rhodophyta). Plant Molecular Biology Reporter 18: 275-281, 2000
- Weising, K., Nyborn, H., Wolff, K. and Kahl, G., 2005. DNA Fingerprinting in Plants: Principles, Methods, and Applications Second Edition. Taylor & Francic Group. CRC Press.470p.
- Whyte, J .N.C., Englar, J.R., Saunders, R.G.and Lindsay, J.C ., 1981. Seasonal variations in the biomass, quantity and quality of agar, from the reproductive and vegetative stages of *Gracilaria* (verrucosa type). Botanical Mar 24:493–501
- Wikipedia., 2012.DNA barcoding, retrieved from: http://en.wikipedia.org /wiki/ DNA- barcoding. Time 9.00 date 13.October. 2012
- Winchester, A. M., 1969. Biology and its relation to mankind.Van Nostrand Reinhold Company. fourth edition. pp. 172-173
- Wu, C.Y. and Lin, G.H., 1987. Progress in the genetics and breeding of economic seaweeds in China. Hydrobiologia 151/152.pp. 57-61
- Xiangfeng, L., Zhenghong, S., Xue-cheng, Z., 1998. Application of RAPD in genetic diversity study on*Gracilaria lemaneiformis* III. Phase and sex related markers. Chin J Oceanol Limnol 16:147–151
- Yamamoto, H., 1986. *Congracilaria babae* gen. et sp. nov. (Gracilariaceae),an Adelphoparasite Growing on *Gracilaria salicornia* of Japan. Bullutin Fac. Fish. Hokkaido University.37(4). 281 -290. 1986.
- Yee, G.S., 1999. Molecular taxonomic studies of *Gracilaria changii* from various locations using the random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique. 185 p.
- Younis, R.A.A, Ismail, O.M.and Soliman, S.S ., 2008. Identification of sex-specific DNA markers for date palm (Phoenix dactylifera L.) using RAPD and ISSR techniques. Res J Agric Biol Sci 4(4):278–284
- Yousefi, M.K., Islami, H.R. & Filizadeh, Y., 2013. Effect of extraction process on agar properties of *Gracilaria corticata* (Rhodophyta) collected from the Persian Gulf. *Phycologia* 52(6): 481-487.
- Yuan, X.F., Dai, Z.H., Wang, X.D.and Zhao B ., 2009. Assessment of genetic stability in tissue-cultured products and seedlings of *Saussurea involucrata* by RAPD and ISSR markers. Biotechnol Lett 31:1279–1287
- Zuccarello, G.C., Burger, G., Wales, J.A ., and King, R.J., 1999.A mitochondrial markerfor red algal intraspecific relationships . Molecular Ecology (1999)8, 1443–1447

پیوست

طرز تهیه محیط کشت PES :

۱. به ml ۹۰ آب مقطر ۲ بار تقطیر مواد غنی شده ES طبق دستورالعمل زیر اضافه گردد وحجم محلول با آب مقطر به ml ۱۰۰ رسانده شود. (Provasoli, 1968)

۲. ES-enrichment:

$NaNO_3$	350 mg
Na_2glycerophosphate $\cdot 5 H_2O$	50 mg
Fe-solution	25 mL
PII metal-solution	25 mL
vitamin B_{12}	10 µg
thiamine	0.5 mg
biotin	5 micro;g
Tris buffer (Sigma Co.)	500 mg

۳. ml ۲۰ از محلول فوق به ml ۱۰۰۰ آب دریا فیلتر شده و پاستوریزه شده اضافه شود

۴. Ph محلول در ۷/۸ تنظیم شود و در لوله آزمایش ml ۲۰ توزیع گردد و پس از اتوکلاو در ℃ ۱۰ذخیره شود

۵. جهت نگهداری جلبک ها در محیط کشت PES میزان cc ۲۰ از محلول فوق با cc ۹۸۰ آب دریا اتوکلاو شده مخلوط و استفاده شود و به محیط کشت فوق میزان ۰/۵ گرم پودر اکسید ژرمانیوم (Geo2) اضافه گردید.

تهیه آب دریا توسط نمک دریا

بدلیل محدودیت تهیه آب دریا برای سری سوم نمونه ها از منطقه لیپار از نمک دریا[۳۷] استفاده گردید. برای این منظور ۴۱ گرم از نمک فوق به ۱ لیتر آب مقطر اتوکلاو شده اضافه گردید (شوری آن توسط شوری سنج PPT ۳۷ ثبت گردید).و جهت نگهداری جلبک ها از cc ۷۰۰ محلول فوق با cc ۳۰۰ آب دریا فیلتر شده واتوکلاو شده استفاده گردید.

عناصر تشکیل دهنده نمک دریا شامل یون های CI ،So_4^{-2} ،Na^+ ،$M g^{+2}$ ، Ca^{+2} ، K^+ ، Br ، Sr^+ ، B^{+3} ، F^- می باشد.

طرز تهیه رنگ آبی متیلن:

یک گرم رنگ آبی متیل درCC ۲۰-۱۰ آب مقطر ، بدون حرارت حل کرده و حجم آن را به CC ۱۰۰ می رسانیم و سپس رنگ را از کاغذ صافی عبور داده و مورد استفاده قرار می دهیم(Yamamoto, 1986)

[37] نمک دریا: ساخت آمریکا با مارک SALT BLEND(Neo Marine Bright Well)

جدول ۱- خلاصه آنالیز تنوع ژنتیکی نی (Nei) برای هریک از باندهادر ٤١ نمونه جلبک مورد مطالعه در مناطق بستانه و لیپار

لوکوس	تعداد نمونه	تعداد اللهای مشاهده شده(na)	تعداد اللهای موثر (ne)	شاخص تنوع ژنتیکی نی (h)	شاخص اطلاعات شانون (I)	هتروزیگوسیتی کل (Ht)
A1-1	41	2.0000	1.0500	0.0476	0.1147	0.0476
A1-2	41	2.0000	1.1023	0.0928	0.1949	0.0928
A1-3	41	2.0000	1.1569	0.1356	0.2618	0.1356
A1-4	41	2.0000	1.2137	0.1761	0.3197	0.1761
A1-5	41	2.0000	1.6464	0.3926	0.5816	0.3926
A1-6	41	2.0000	1.1023	0.0928	0.1949	0.0928
A1-7	41	2.0000	1.9988	0.4997	0.6928	0.4997
A1-8	41	2.0000	1.0500	0.0476	0.1147	0.0476
A1-9	41	2.0000	1.8173	0.4497	0.6420	0.4497
A1-10	41	2.0000	1.5844	0.3688	0.5555	0.3688
A1-11	41	2.0000	1.7639	0.4331	0.6246	0.4331
A1-12	41	2.0000	1.7639	0.4331	0.6246	0.4331
A1-13	41	2.0000	1.9434	0.4854	0.6785	0.4854
A1-14	41	2.0000	1.1023	0.0928	0.1949	0.0928
A1-15	41	2.0000	1.2725	0.2142	0.3708	0.2142
A1-16	41	2.0000	1.0500	0.0476	0.1147	0.0476
A1-17	41	2.0000	1.7639	0.4331	0.6246	0.4331
A1-18	41	2.0000	1.9434	0.4854	0.6785	0.4854
A1-19	41	2.0000	1.5213	0.3427	0.5263	0.3427
A1-20	41	2.0000	1.3950	0.2832	0.4570	0.2832
C1-1	41	2.0000	1.3331	0.2499	0.4163	0.2499
C1-2	41	2.0000	1.1023	0.2499	0.1949	0.0928
C1-3	41	2.0000	1.1569	0.1356	0.2618	0.1356
C1-4	41	2.0000	1.5213	0.3427	0.5263	0.3427
C1-5	41	2.0000	1.0500	0.0476	0.1147	0.0476
C1-6	41	2.0000	1.9707	0.4926	0.6857	0.4926
C1-7	41	2.0000	1.9081	0.4759	0.6689	0.4759
C1-8	41	2.0000	1.2725	0.2142	0.3708	0.2142
C1-9	41	2.0000	1.6464	0.3926	0.5816	0.3926
C1-10	41	2.0000	1.5213	0.3427	0.5263	0.3427
C1-11	41	2.0000	1.4579	0.3141	0.4936	0.3141
C1-12	41	2.0000	1.6464	0.3926	0.5816	0.3926
C1-13	41	2.0000	1.9081	0.4759	0.6689	0.4759
C1-14	41	2.0000	1.7066	0.4140	0.6045	0.4140
C1-15	41	2.0000	1.9081	0.4759	0.6689	0.4759
C1-16	41	2.0000	1.7066	0.4140	0.6045	0.4140
C1-17	41	2.0000	1.7639	0.4331	0.6246	0.4331
C1-18	41	2.0000	1.0500	0.0476	0.1147	0.0476
AB1-1	41	2.0000	1.1023	0.0928	0.1949	0.0928
AB1-2	41	2.0000	1.1023	0.0928	0.1949	0.0928
AB1-3	41	2.0000	1.8173	0.4497	0.6420	0.4497
AB1-4	41	2.0000	1.7066	0.4140	0.6045	0.4140
AB1-5	41	2.0000	1.4579	0.3141	0.4936	0.3141
AB1-6	41	2.0000	1.6464	0.3926	0.5816	0.3926
AB1-7	41	2.0000	1.6464	0.3926	0.5816	0.3926

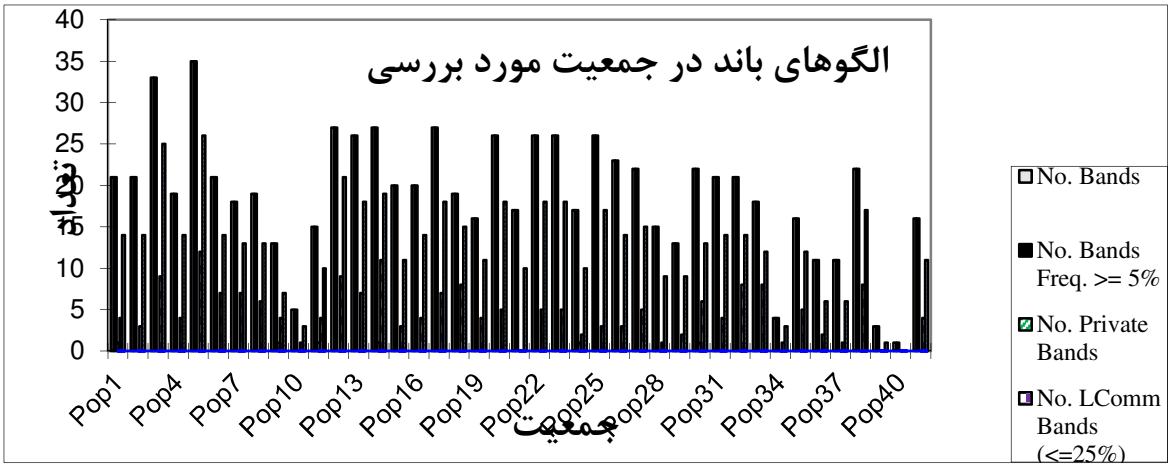
0.2499	0.4163	0.2499	1.3331	2.0000	41	**AB1-8**
0.4759	0.6689	0.4759	1.9081	2.0000	41	**AB1-9**
0.2832	0.4570	0.2832	1.3950	2.0000	41	**AB1-10**
0.3141	0.4936	0.3141	1.4579	2.0000	41	**AB1-11**
0.2499	0.4163	0.2499	1.3331	2.0000	41	**AB1-12**
0.3141	0.4936	0.3141	1.4579	2.0000	41	**AB1-13**
0.4973	0.6905	0.4973	1.9893	2.0000	41	**AB1-14**
0.2499	0.4163	0.2499	1.3331	2.0000	41	**AB1-15**
0.2499	0.4163	0.2499	1.3331	2.0000	41	**AB1-16**
0.2499	0.4163	0.2499	1.3331	2.0000	41	**AB1-17**
0.4997	0.6928	0.4997	1.9988	2.0000	41	**AB1-18**
0.1761	0.3197	0.1761	1.2137	2.0000	41	**AB1-19**
0.4140	0.6045	0.4140	1.7066	2.0000	41	**AB1-20**
0.0476	0.1147	0.0476	1.0500	2.0000	41	**AB1-21**
0.0928	0.1949	0.0928	1.1023	2.0000	41	**ABC1-1**
0.0928	0.1949	0.0928	1.1023	2.0000	41	**ABC1-2**
0.1356	0.2618	0.1356	1.1569	2.0000	41	**ABC1-3**
0.2142	0.3708	0.2142	1.2725	2.0000	41	**ABC1-4**
0.3688	0.5555	0.3688	1.5844	2.0000	41	**ABC1-5**
0.3141	0.4936	0.3141	1.4579	2.0000	41	**ABC1-6**
0.4997	0.6928	0.4997	1.9988	2.0000	41	**ABC1-7**
0.0928	0.1949	0.0928	1.1023	2.0000	41	**ABC1-8**
0.4926	0.6857	0.4926	1.9707	2.0000	41	**ABC1-9**
0.4331	0.6246	0.4331	1.7639	2.0000	41	**ABC1-10**
0.2142	0.3708	0.2142	1.2725	2.0000	41	**ABC1-11**
0.4140	0.6045	0.4140	1.7066	2.0000	41	**ABC1-12**
0.4497	0.6420	0.4497	1.8173	2.0000	41	**ABC1-13**
0.1356	0.2618	0.1356	1.1569	2.0000	41	**ABC1-14**
0.4926	0.6857	0.4926	1.9707	2.0000	41	**ABC1-15**
0.0928	0.1949	0.0928	1.1023	2.0000	41	**ABC1-16**
0.2968	0.4562	0.2989	1.4898	2.0000	41	**Mean**
0.0235	0.1926	0.1514	0.3189	0.0000		**St. Dev**

جدول ۲- الگوی باندی داده ها برای ٤١ جمعیت *G.corticata*

نمونه ها	Pop1	Pop2	Pop3	Pop4	Pop5	Pop6	Pop7	Pop8	Pop9	Pop10
تعداد باند ها	21	21	33	19	35	21	18	19	13	5
تعداد باندها با فراوانی ≤٪۵	21	21	33	19	35	21	18	19	13	5
تعداد باندهای اختصاصی	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
تعداد باندها با فراوانی ≤٪۲۵	4	3	9	4	12	7	7	6	4	1
تعداد باندها با فراوانی ≤٪۵۰	14	14	25	14	26	14	13	13	7	3
نمونه ها	**Pop11**	**Pop12**	**Pop13**	**Pop14**	**Pop15**	**Pop16**	**Pop17**	**Pop18**	**Pop19**	**Pop20**
تعداد باند ها	15	27	26	27	20	20	27	19	16	26
تعداد باندها با فراوانی ≤٪۵	15	27	26	27	20	20	27	19	16	26
تعداد باندهای اختصاصی	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
تعداد باندها با فراوانی ≤٪۲۵	4	9	7	11	3	4	7	8	4	5
تعداد باندها با فراوانی ≤٪۵۰	10	21	18	19	11	14	18	15	11	18

ادامه جدول ۲

نمونه ها	Pop21	Pop22	Pop23	Pop24	Pop25	Pop26	Pop27	Pop28	Pop29	Pop30	
تعداد باند ها	17	26	26	17	26	23	22	15	13	22	
تعداد باندها با فراوانی ≥۵٪	17	26	26	17	26	23	22	15	13	22	
تعداد باندهای اختصاصی	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	
تعداد باندها با فراوانی ≥۲۵٪	0	5	5	2	3	3	5	1	2	6	
تعداد باندها با فراوانی ≥۵۰٪	10	18	18	10	17	14	15	9	9	13	
نمونه ها	**Pop31**	**Pop32**	**Pop33**	**Pop34**	**Pop35**	**Pop36**	**Pop37**	**Pop38**	**Pop39**	**Pop40**	**Pop41**
تعداد باند ها	21	21	18	4	16	11	11	22	3	1	16
تعداد باندها با فراوانی ≥۵٪	21	21	18	4	16	11	11	22	3	1	16
تعداد باندهای اختصاصی	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
تعداد باندها با فراوانی ≥۲۵٪	4	8	8	1	5	2	1	8	0	0	4
تعداد باندها با فراوانی ≥۵۰٪	14	14	12	3	12	6	6	17	1	0	11



شکل ۱- نمودار تعداد باندها- باند های اختصاصی- باندهایی با فراوانی مساوی و یا بیشتر از ۵ ٪ ، ۲۵ ٪ ، ۵۰ ٪ در جمعیت مورد برسی

جدول ۳- میزان شباهت ژنتیکی و فاصله ژنتیکی نی بر اساس داده های نرمال شده(غیر اریب) درون جمعیت جلبک *G. corticata* با استفاده از مارکر ISSR از مناطق بستانه و لیپارتوسط نرم افزار POPGEN

pop ID	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1	****	0.9200	0.7600	0.7867	0.7067	0.7067	0.7467	0.7067	0.7333	0.6800	0.7867	0.6267	0.6667	0.5467	0.7467	0.6133	0.7067	0.6800	0.6933	0.7467	0.7333
2	0.0834	****	0.8400	0.8400	0.7867	0.7867	0.7733	0.7067	0.7333	0.7067	0.7600	0.6267	0.7200	0.6000	0.8000	0.6667	0.7067	0.6533	0.7467	0.7733	0.7600
3	0.2744	0.1744	****	0.7600	0.8933	0.7333	0.6933	0.6267	0.6267	0.5733	0.6267	0.5733	0.6400	0.5733	0.6667	0.6133	0.6533	0.5733	0.5867	0.6933	0.6267
4	0.2400	0.1744	0.2744	****	0.7067	0.7600	0.8267	0.7067	0.7867	0.7333	0.7067	0.6267	0.7200	0.6000	0.7200	0.7200	0.6800	0.6800	0.7467	0.7200	0.7600
5	0.3472	0.2400	0.1128	0.3472	****	0.7333	0.7200	0.6000	0.6000	0.5467	0.6000	0.5200	0.5867	0.5467	0.6400	0.5867	0.6000	0.5467	0.5600	0.6400	0.6267
6	0.3472	0.2400	0.3102	0.2744	0.3102	****	0.8267	0.7600	0.7600	0.7333	0.6800	0.6000	0.6667	0.5733	0.7200	0.6667	0.6533	0.5733	0.6667	0.6400	0.7067
7	0.2921	0.2570	0.3662	0.1904	0.3285	0.1904	****	0.8000	0.8533	0.7467	0.6933	0.6667	0.6533	0.5867	0.6800	0.7067	0.6133	0.6400	0.7067	0.6533	0.7467
8	0.3472	0.3472	0.4673	0.3472	0.5108	0.2744	0.2231	****	0.7600	0.7867	0.7867	0.7067	0.6667	0.6267	0.6933	0.7200	0.6533	0.6800	0.6933	0.7200	0.7067
9	0.3102	0.3102	0.4673	0.2400	0.5108	0.2744	0.1586	0.2744	****	0.7867	0.7333	0.6533	0.6667	0.5733	0.6933	0.7467	0.6000	0.6800	0.6933	0.6400	0.7867
10	0.3857	0.3472	0.5563	0.3102	0.6039	0.3102	0.2921	0.2400	0.2400	****	0.7867	0.6533	0.6667	0.7067	0.7467	0.7733	0.6267	0.6800	0.7733	0.6400	0.7600
11	0.2400	0.2744	0.4673	0.3472	0.5108	0.3857	0.3662	0.2400	0.3102	0.2400	****	0.6267	0.6400	0.6000	0.6933	0.6400	0.6000	0.6800	0.7467	0.6933	0.6800
12	0.4673	0.4673	0.5563	0.4673	0.6539	0.5108	0.4055	0.3472	0.4257	0.4257	0.4673	****	0.7200	0.7067	0.7467	0.6933	0.7333	0.7333	0.7200	0.7200	0.6800
13	0.4055	0.3285	0.4463	0.3285	0.5333	0.4055	0.4257	0.4055	0.4055	0.4055	0.4463	0.3285	****	0.6933	0.8400	0.7333	0.7733	0.6667	0.7333	0.8133	0.7200
14	0.6039	0.5108	0.5563	0.5108	0.6039	0.5563	0.5333	0.4673	0.5563	0.3472	0.5108	0.3472	0.3662	****	0.7200	0.7467	0.7067	0.6533	0.7200	0.7200	0.6000
15	0.2921	0.2231	0.4055	0.3285	0.4463	0.3285	0.3857	0.3662	0.3662	0.2921	0.3662	0.2921	0.1744	0.3285	****	0.7067	0.8000	0.6400	0.7867	0.8133	0.7733
16	0.4888	0.4055	0.4888	0.3285	0.5333	0.4055	0.3472	0.3285	0.2921	0.2570	0.4463	0.3662	0.3102	0.2921	0.3472	****	0.7200	0.7200	0.7067	0.7333	0.7200
17	0.3472	0.3472	0.4257	0.3857	0.5108	0.4257	0.4888	0.4257	0.5108	0.4673	0.5108	0.3102	0.2570	0.3472	0.2231	0.3285	****	0.8133	0.6933	0.9067	0.6800
18	0.3857	0.4257	0.5563	0.3857	0.6039	0.5563	0.4463	0.3857	0.3857	0.3857	0.3857	0.3102	0.4055	0.4257	0.4463	0.3285	0.2066	****	0.7200	0.8000	0.6800
19	0.3662	0.2921	0.5333	0.2921	0.5798	0.4055	0.3472	0.3662	0.3662	0.2570	0.2921	0.3285	0.3102	0.3285	0.2400	0.3472	0.3662	0.3285	****	0.7333	0.7467
20	0.2921	0.2570	0.3662	0.3285	0.4463	0.4463	0.4257	0.3285	0.4463	0.4463	0.3662	0.3285	0.2066	0.3285	0.2066	0.3102	0.0980	0.2231	0.3102	****	0.7200
21	0.3102	0.2744	0.4673	0.2744	0.4673	0.3472	0.2921	0.3472	0.2400	0.2744	0.3857	0.3857	0.3285	0.5108	0.2570	0.3285	0.3857	0.3857	0.2921	0.3285	****
22	0.3662	0.3662	0.4055	0.4055	0.4463	0.3662	0.4257	0.3662	0.4463	0.4463	0.4888	0.5798	0.4673	0.6286	0.3472	0.5108	0.3285	0.4888	0.4673	0.3472	0.2231
23	0.3662	0.3662	0.4055	0.4055	0.4463	0.3662	0.4257	0.3662	0.4463	0.4463	0.4888	0.5798	0.4673	0.6286	0.3472	0.5108	0.3285	0.4888	0.4673	0.3472	0.2231
24	0.3472	0.3472	0.5563	0.4257	0.6039	0.3472	0.4055	0.3472	0.3102	0.2400	0.3102	0.4257	0.4888	0.5108	0.3285	0.4463	0.4257	0.4257	0.3285	0.4055	0.1744
25	0.3285	0.2921	0.3662	0.3285	0.3662	0.3285	0.4257	0.4463	0.3662	0.4463	0.4463	0.4888	0.3857	0.6799	0.2744	0.5108	0.3662	0.4888	0.4257	0.3857	0.1586
26	0.3472	0.3102	0.3857	0.3472	0.4257	0.3857	0.4463	0.4257	0.3857	0.3857	0.3857	0.4673	0.3662	0.6039	0.2570	0.4463	0.2744	0.3857	0.4055	0.3285	0.2400
27	0.4463	0.4055	0.4888	0.4055	0.5333	0.4055	0.4257	0.4888	0.3285	0.3662	0.5333	0.4055	0.3857	0.6286	0.3472	0.3472	0.3662	0.4055	0.5108	0.3857	0.1904
28	0.3102	0.2744	0.3472	0.2744	0.4257	0.2744	0.3285	0.3857	0.2744	0.2400	0.3857	0.4257	0.3662	0.4673	0.2921	0.3285	0.3102	0.3857	0.3662	0.3662	0.2400
29	0.3472	0.3102	0.4257	0.2400	0.4673	0.2744	0.3662	0.4257	0.3102	0.2400	0.3857	0.5563	0.4055	0.4257	0.2921	0.3285	0.3472	0.3857	0.3662	0.4055	0.3472
30	0.4463	0.4055	0.6286	0.4463	0.6286	0.3662	0.4673	0.3662	0.4055	0.3662	0.4463	0.4888	0.3857	0.5333	0.2400	0.4673	0.3662	0.5333	0.3102	0.3857	0.3662
31	0.4673	0.3857	0.5108	0.3472	0.5108	0.3102	0.3662	0.3857	0.3102	0.3472	0.4673	0.4673	0.4055	0.5563	0.3285	0.3662	0.4257	0.5108	0.3285	0.4055	0.2066
32	0.5108	0.4673	0.6039	0.5563	0.6039	0.3857	0.4463	0.5108	0.3472	0.3857	0.4673	0.6039	0.4463	0.6539	0.4463	0.4055	0.5563	0.4673	0.4888	0.5798	0.3472
33	0.4888	0.4463	0.6286	0.4888	0.5333	0.4055	0.4257	0.4888	0.3662	0.3285	0.4888	0.6799	0.5563	0.6286	0.4257	0.4257	0.5798	0.4463	0.4673	0.6039	0.3662
34	0.3662	0.3662	0.5798	0.3662	0.6799	0.3662	0.3472	0.3662	0.2570	0.0980	0.2921	0.4888	0.4257	0.4463	0.3102	0.3472	0.4463	0.3662	0.2744	0.4673	0.2921
35	0.4888	0.4463	0.6799	0.4888	0.7911	0.5333	0.5108	0.4463	0.4055	0.2921	0.4055	0.4463	0.3857	0.4463	0.3857	0.4257	0.4055	0.4055	0.3472	0.4257	0.3285
36	0.3472	0.3472	0.5563	0.4257	0.6039	0.4257	0.4055	0.3472	0.3102	0.2400	0.2744	0.4257	0.3662	0.4257	0.2570	0.4463	0.3857	0.3857	0.2570	0.3662	0.2400
37	0.3472	0.3472	0.5563	0.4257	0.6039	0.4257	0.4055	0.3472	0.2744	0.2400	0.2744	0.4257	0.3662	0.4257	0.2570	0.3662	0.4257	0.3857	0.2231	0.4055	0.2400
38	0.5333	0.4888	0.6799	0.5333	0.7340	0.5798	0.5563	0.4463	0.4888	0.3662	0.4463	0.5333	0.4257	0.4463	0.4257	0.4673	0.4888	0.4463	0.3857	0.5108	0.3662
39	0.3472	0.3472	0.6039	0.3102	0.6039	0.3472	0.2921	0.3102	0.1744	0.1128	0.2744	0.4257	0.4055	0.4257	0.2921	0.2570	0.4257	0.2744	0.2231	0.4055	0.2400
40	0.3472	0.3472	0.6039	0.3102	0.6039	0.3472	0.2921	0.3102	0.2066	0.0834	0.2400	0.4257	0.4055	0.4257	0.2921	0.2921	0.4257	0.2744	0.2231	0.4055	0.2400
41	0.4055	0.4055	0.6286	0.4888	0.6799	0.4888	0.5108	0.4055	0.3662	0.2921	0.3285	0.4888	0.4257	0.4463	0.2744	0.4673	0.4463	0.4463	0.3102	0.4257	0.2570

ادامه جدول ۳-

popID	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41
1	0.6933	0.6933	0.7067	0.7200	0.7067	0.6400	0.7333	0.7067	0.6400	0.6267	0.6000	0.6133	0.6933	0.6133	0.7067	0.7067	0.5867	0.7067	0.7067	0.6667
2	0.6933	0.6933	0.7067	0.7467	0.7333	0.6667	0.7600	0.7333	0.6667	0.6800	0.6267	0.6400	0.6933	0.6400	0.7067	0.7067	0.6133	0.7067	0.7067	0.6667
3	0.6667	0.6667	0.5733	0.6933	0.6800	0.6133	0.7067	0.6533	0.5333	0.6000	0.5467	0.5333	0.5600	0.5067	0.5733	0.5733	0.5067	0.5467	0.5467	0.5333
4	0.6667	0.6667	0.6533	0.7200	0.7067	0.6667	0.7600	0.7867	0.6400	0.7067	0.5733	0.6133	0.6933	0.6133	0.6533	0.6533	0.5867	0.7333	0.7333	0.6133
5	0.6400	0.6400	0.5467	0.6933	0.6533	0.5867	0.6533	0.6267	0.5333	0.6000	0.5467	0.5867	0.5067	0.4533	0.5467	0.5467	0.4800	0.5467	0.5467	0.5067
6	0.6933	0.6933	0.7067	0.7200	0.6800	0.6667	0.7600	0.7600	0.6933	0.7333	0.6800	0.6667	0.6933	0.5867	0.6533	0.6533	0.5600	0.7067	0.7067	0.6133
7	0.6533	0.6533	0.6667	0.6533	0.6400	0.6533	0.7200	0.6933	0.6267	0.6933	0.6400	0.6533	0.7067	0.6000	0.6667	0.6667	0.5733	0.7467	0.7467	0.6000
8	0.6933	0.6933	0.7067	0.6400	0.6533	0.6133	0.6800	0.6533	0.6933	0.6800	0.6000	0.6133	0.6933	0.6400	0.7067	0.7067	0.6400	0.7333	0.7333	0.6667
9	0.6400	0.6400	0.7333	0.6933	0.6800	0.7200	0.7600	0.7333	0.6667	0.7333	0.7067	0.6933	0.7733	0.6667	0.7333	0.7600	0.6133	0.8400	0.8133	0.6933
10	0.6400	0.6400	0.7867	0.6400	0.6800	0.6933	0.7867	0.7867	0.6933	0.7067	0.6800	0.7200	0.9067	0.7467	0.7867	0.7867	0.6933	0.8933	0.9200	0.7467
11	0.6133	0.6133	0.7333	0.6400	0.6800	0.5867	0.6800	0.6800	0.6400	0.6267	0.6267	0.6133	0.7467	0.6667	0.7600	0.7600	0.6400	0.7600	0.7867	0.7200
12	0.5600	0.5600	0.6533	0.6133	0.6267	0.6667	0.6533	0.5733	0.6133	0.6267	0.5467	0.5067	0.6133	0.6400	0.6533	0.6533	0.5867	0.6533	0.6533	0.6133
13	0.6267	0.6267	0.6133	0.6800	0.6933	0.6800	0.6933	0.6667	0.6800	0.6667	0.6400	0.5733	0.6533	0.6800	0.6933	0.6933	0.6533	0.6667	0.6667	0.6533
14	0.5333	0.5333	0.6000	0.5067	0.5467	0.5333	0.6267	0.6533	0.5867	0.5733	0.5200	0.5333	0.6400	0.6400	0.6533	0.6533	0.6400	0.6533	0.6533	0.6400
15	0.7067	0.7067	0.7200	0.7600	0.7733	0.7067	0.7467	0.7467	0.7867	0.7200	0.6400	0.6533	0.7333	0.6800	0.7733	0.7733	0.6533	0.7467	0.7467	0.7600
16	0.6000	0.6000	0.6400	0.6000	0.6400	0.7067	0.7200	0.7200	0.6267	0.6933	0.6667	0.6533	0.7067	0.6533	0.6400	0.6933	0.6267	0.7733	0.7467	0.6267
17	0.7200	0.7200	0.6533	0.6933	0.7600	0.6933	0.7333	0.7067	0.6933	0.6533	0.5733	0.5600	0.6400	0.6667	0.6800	0.6533	0.6133	0.6533	0.6533	0.6400
18	0.6133	0.6133	0.6533	0.6133	0.6800	0.6667	0.6800	0.6800	0.5867	0.6000	0.6267	0.6400	0.6933	0.6667	0.6800	0.6800	0.6400	0.7600	0.7600	0.6400
19	0.6267	0.6267	0.7200	0.6533	0.6667	0.6000	0.6933	0.6933	0.7333	0.7200	0.6133	0.6267	0.7600	0.7067	0.7733	0.8000	0.6800	0.8000	0.8000	0.7333
20	0.7067	0.7067	0.6667	0.6800	0.7200	0.6800	0.6933	0.6667	0.6800	0.6667	0.5600	0.5467	0.6267	0.6533	0.6933	0.6667	0.6000	0.6667	0.6667	0.6533
21	0.8000	0.8000	0.8400	0.8533	0.7867	0.8267	0.7867	0.7067	0.6933	0.8133	0.7067	0.6933	0.7467	0.7200	0.7867	0.7867	0.6933	0.7867	0.7867	0.7733
22	****	1.0000	0.7200	0.8400	0.8533	0.7867	0.8000	0.7200	0.7867	0.8000	0.6400	0.6267	0.6533	0.6267	0.7200	0.6667	0.6000	0.6667	0.6667	0.6800
23	0.0000	****	0.7200	0.8400	0.8533	0.7867	0.8000	0.7200	0.7867	0.8000	0.6400	0.6267	0.6533	0.6267	0.7200	0.6667	0.6000	0.6667	0.6667	0.6800
24	0.3285	0.3285	****	0.8267	0.7600	0.7733	0.7600	0.7067	0.7467	0.7867	0.6800	0.6667	0.8000	0.6933	0.7867	0.7867	0.6667	0.7600	0.7600	0.7733
25	0.1744	0.1744	0.1904	****	0.9067	0.8133	0.7733	0.7200	0.7600	0.7733	0.7200	0.7067	0.6800	0.6267	0.7200	0.7200	0.6267	0.6667	0.6667	0.7067
26	0.1586	0.1586	0.2744	0.0980	****	0.8267	0.7867	0.7600	0.8000	0.7600	0.7600	0.7467	0.7200	0.6933	0.7600	0.7333	0.6667	0.7067	0.7067	0.7200
27	0.2400	0.2400	0.2570	0.2066	0.1904	****	0.8267	0.6933	0.7067	0.8000	0.7467	0.7067	0.7333	0.6533	0.7200	0.6933	0.5733	0.7200	0.7200	0.6533
28	0.2231	0.2231	0.2744	0.2570	0.2400	0.1904	****	0.8400	0.7467	0.7867	0.7333	0.7200	0.7733	0.6933	0.7333	0.7600	0.6400	0.8133	0.7867	0.6933
29	0.3285	0.3285	0.3472	0.3285	0.2744	0.3662	0.1744	****	0.7467	0.7600	0.7067	0.7467	0.8267	0.7200	0.7600	0.7600	0.6933	0.8400	0.8133	0.7467
30	0.2400	0.2400	0.2921	0.2744	0.2231	0.3472	0.2921	0.2921	****	0.8533	0.6933	0.7067	0.7333	0.7067	0.7733	0.7467	0.6267	0.7467	0.7200	0.7333
31	0.2231	0.2231	0.2400	0.2570	0.2744	0.2231	0.2400	0.2744	0.1586	****	0.7067	0.6933	0.7467	0.6933	0.7600	0.7333	0.6133	0.7600	0.7333	0.7200
32	0.4463	0.4463	0.3857	0.3285	0.2744	0.2921	0.3102	0.3472	0.3662	0.3472	****	0.9333	0.7467	0.6933	0.7067	0.7333	0.6400	0.7600	0.7333	0.6667
33	0.4673	0.4673	0.4053	0.3472	0.2921	0.3472	0.3285	0.2921	0.3472	0.3662	0.0690	****	0.7867	0.6800	0.7200	0.7467	0.6267	0.8000	0.7733	0.6800
34	0.4237	0.4237	0.2231	0.3857	0.3285	0.3102	0.2570	0.1904	0.3102	0.2921	0.2921	0.2400	****	0.7867	0.8533	0.8533	0.7067	0.9067	0.9333	0.7867
35	0.4673	0.4673	0.3662	0.4673	0.3662	0.4237	0.3662	0.3285	0.3472	0.3662	0.3662	0.3857	0.2400	****	0.8800	0.8533	0.8933	0.8000	0.8000	0.8400
36	0.3285	0.3285	0.2400	0.3285	0.2744	0.3285	0.3102	0.2744	0.2570	0.2744	0.3472	0.3285	0.1586	0.1278	****	0.9467	0.8267	0.8667	0.8667	0.9333
37	0.4053	0.4053	0.2400	0.3285	0.3102	0.3662	0.2744	0.2744	0.2921	0.3102	0.3102	0.2921	0.1586	0.1586	0.0548	****	0.8533	0.8933	0.8667	0.9333
38	0.3108	0.3108	0.4053	0.4673	0.4053	0.3563	0.4463	0.3662	0.4673	0.4888	0.4463	0.4673	0.3472	0.1128	0.1904	0.1586	****	0.7467	0.7200	0.8933
39	0.4053	0.4053	0.2744	0.4053	0.3472	0.3285	0.2066	0.1744	0.2921	0.2744	0.2744	0.2231	0.0980	0.2231	0.1431	0.1128	0.2921	****	0.9733	0.8267
40	0.4053	0.4053	0.2744	0.4053	0.3472	0.3285	0.2400	0.2066	0.3285	0.3102	0.3102	0.2570	0.0690	0.2231	0.1431	0.1431	0.3285	0.0270	****	0.8000
41	0.3857	0.3857	0.2570	0.3472	0.3285	0.4237	0.3662	0.2921	0.3102	0.3285	0.4053	0.3857	0.2400	0.1744	0.0690	0.0690	0.1128	0.1904	0.2231	****

**** اعداد بالای قطر جدول شباهت ژنتیکی را نشان می دهند و اعداد پایین جدول معرف فاصله ژنتیکی می باشند

جدول ٤- خوشه بندی سلسله مراتبی[38] وارد

Number of Clusters	Distance	Leader	Joiner	Number of Clusters	Distance	Leader	Joiner
20	3.81698	6	9	**40**	0	22	23
19	4.065856	15	19	**39**	0.80439	39	40
18	4.306695	22	25	**38**	1.238546	36	37
17	4.376379	16	18	**37**	1.605103	32	33
16	4.459206	12	14	**36**	2.015854	34	39
15	4.748249	10	36	**35**	2.128935	1	2
14	4.828287	21	30	**34**	2.160254	25	26
13	5.543857	21	28	**33**	2.174418	17	20
12	5.593817	6	8	**32**	2.316352	3	5
11	5.951915	13	15	**31**	2.472935	10	34
10	6.036989	12	16	**30**	2.513495	35	41
9	6.419205	1	6	**29**	2.811702	30	31
8	7.114796	21	22	**28**	2.947224	6	7
7	8.104431	32	35	**27**	2.956782	28	29
6	8.529309	12	13	**26**	3.235522	21	24
5	10.30157	10	32	**25**	3.445519	1	4
4	12.18027	1	3	**24**	3.501132	35	38
3	13.88223	1	12	**23**	3.566953	8	11
2	13.9757	10	21	**22**	3.693494	25	27
1	18.91295	1	10	**21**	3.773756	13	17

[38] - Hierarchical Clustering, Method

Abstract:
In conformity with the sex determination of *Gracilaria corticata* in the Persian Gulf and Oman Sea, a total of 41 samples were collected from two stations of Bostaneh region (northern Persian Gulf, 54° 38´ E / 26° 30´ N) and Lipar regions (northern Oman Sea, 60° 49´ E / 25° 15´ N). The specimens were cultured in PES media for observing the different life stages. The anatomical structures of thallus were taken into consideration. The diploid tetrasporophytes and spermatangia in thallus of male's gametophytes; and Carpospore and cystocarps of female were determined. Due to DNA extraction, the parasites and epiphytes were cleaned and then the under growing sections were sectioned using liquid nitrogen. After extraction of DNA, by using 20 different primers according to ISSR molecular indicator, the sex diversity and genetic diversity of populations were studied; and four primers were selected ultimately . The obtained results were analyzed by GenAlex and PopGen softwares. In total, 74 bands, all polymorphisms, were propagated. According to PIC index, polymorphism separation of primer C (0.33) was higher than other primers. The Marker Index was measured between 4.48 and 6.51 with mean Shannon's index of 0.46. The genetic similarity amongst algae was 96%. The genetic diversity inter and intra populations had significant differences of which 83% of total diversity was related to the intra diversity and 17% was related to inter diversity populations. The highest genetic distance belonged to the specimens 5 (Bostaneh) and 35 (Lipar), and it indicated the inter populations diversity in addition to intra population. As an overall conclusion, these populations can be considered as broodstocks for hybrid production for further species breeding and also to attain the maximum heterosis in adaptation with environment. In Ward clustering analysis, the dendrograms showed 5 different clusters in genetic distance of 12.18 of isomorphic phases. The PCA analysis as a complementally method was used for attest the findings. In this research, the ISSR primers could determine the male and female gametophytes and diploid tetrasporophytes in which the primer A (bands of 1200 & 1700 bp) specific for diploid tetrasporophyte and band of 300 bp specific for male were produced. The primer C showed the bands of 820 & 900 bp for diploid tetrasporophyte, and 500 bp for female gametophyte. The primer AB (990 bp) for male, 520 bp for female and 1600 & 1900 bp for diploid tetrasporophyte were specified. The primer ABC showed the specific band of 1100 bp for male; 500 bp for female; and 1200 & 1500 bp for diploid tetrasporophytes.

Keywords:
Sexual diversity, ISSR, red algae**,** *Gracilaria corticata*, Persian Gulf , Oman Sea

Ministry of Jihad – e – Agriculture
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
IRANIAN FISHERIES SCIENCE RESEARCH INSTITUTE

Project Title : Sexual diversity of red algae using isomorphic generations of *Gracilaria corticata* in the northern Persian Gulf and Oman Sea
Approved Number: 2-12-12-92103
Author: Seyed Abbas Talebzadeh
Project Researcher : Seyed Abbas Talebzadeh
Collaborator(s) *:* Seyed Mohsen Hesamzadeh Hejazi, Tooraj Valinassab, Sohrab Rezvani, Yazdan Moradi, Ahmad Ghoroghi, Hossain Rameshi,Bizhan Azhang, Iraj Rajabi, Kiumars Rohani, Eissa Kamali, Yusef Aftabsavar, Sossan Shahrokhi, Farzin Sheikhhasani
Advisor(s): -
Supervisor: -
Location of execution : Tehran province
Date of Beginning : 2013
Period of execution :1 Year and 6 Months
Publisher : *Iranian Fisheries Science Research Institute*
Date of publishing : 2016
All Right Reserved . No Part of this Publication May be Reproduced or Transmitted without indicating the Original Reference

MINISTRY OF JIHAD - E - AGRICULTURE
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
IRANIAN FISHERIES SCIENCE RESEARCH INSTITUTE

Project Title :

Sexual diversity of red algae using isomorphic generations of *Gracilaria corticata* in the northern Persian Gulf and Oman Sea

Project Researcher :
Seyed Abbas Talebzadeh

Register NO.

46539