

DOI: 10.22092/BOTANY.2022.358594.1306

انگشت‌نگاری و فیلوژنی مولکولی برخی از سیانوباکتری‌های هتروسیت‌دار با استفاده از مناطق ITS، 16S rRNA و پالیندروم‌های به شدت تکراری به عنوان مارکرهای مولکولی*

دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۱۶ / پذیرش: ۱۴۰۱/۰۴/۲۸

بهاره نوروزی✉: استادیار زیست‌شناسی مولکولی سیانوباکتری‌ها، گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران (bahareh.nowruzi@srbiau.ac.ir)

حسین فهیمی: استادیار گروه ژنتیک، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران، ایران

چکیده

هدف از این مطالعه، یافتن روابط فیلوژنتیک سیانوباکتری‌ها براساس ژن‌های 16S rRNA و ITS و توالی‌های پالیندرومی HIP، ERIC و STRR بوده است. به این منظور، نمونه‌برداری از پنج چشمه از قنات‌های کم‌عمق روستاهای گنبدکاووس (استان گلستان) انجام شد و در محیط کشت Z8 خالص‌سازی گردید. پس از استخراج DNA، ژن‌های 16S rRNA و ITS تکثیر و توالی‌یابی شدند. درخت فیلوژنتیک با استفاده از روش Likelihood Maximum و مدل مناسب به کمک وب سرور برخط Iqtree server ساخته شد. ساختار ثانویه ITS، در بخش‌های مختلف مارپیچ D1-D1'، D2، D3، tRNAIle، tRNAAla، BOX B، BOX A و V3 به کمک برنامه Mfold رسم شد. سپس، آنالیز فیلوژنتیک انگشت‌نگاری‌ها به کمک حضور و عدم حضور باندهای مجزا و قابل تکثیر در هر الگوی انگشت‌نگاری DNA تولید شده با پروفایل‌های HIP، ERIC، STRR، به اطلاعات دوتایی تبدیل برای ساختن دندروگرام مرکب، استفاده شد. نتایج نشان داد که سویه‌های مورد بررسی متعلق به چهار تیره به اسامی *Nostocaceae*، *Aphanizomenonaceae*، *Hapalosiphonaceae* و *Calotrichaceae* از زیربخش راسته *Nostocales* بودند. نتایج کلاسترهای دندروگرام‌های رسم شده حاصل از تکثیر توالی‌های پالیندرومی تاییدکننده کلاستر بندی‌های درخت‌های فیلوژنتیکی بود. به هر حال، نتایج حاصل از بخش‌های متغیر در بخش‌های D1-D1' و Box-B ژن ITS، ساختارهای ثانویه منحصر به فردی یافت گردید که الگوی مشابهی با سویه‌های نزدیک به خود را نداشتند. نتایج کلی نشان داد که داده‌های حاصل از انگشت‌نگاری‌های ژنومیک، آنالیزهای درون‌رایانه‌ای و فیلوژنتیکی، برای تمایز سویه‌های نزدیک به هم سیانوباکتری‌ها بسیار مفید می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: آنالیزهای درون رایانه‌ای، *Nostocaceae*، *Hapalosiphonaceae*، *Calotrichaceae*، *Aphanizomenonaceae*

Fingerprinting and molecular phylogeny of some heterocystous cyanobacteria using 16S rRNA, ITS regions and highly iterated palindromes as molecular markers

Received: 06.05.2022 / Accepted: 19.07.2022

Bahareh Nowruzi✉: Assistant Prof., Department of Biotechnology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran (bahareh.nowruzi@srbiau.ac.ir)

Hossein Fahimi: Assistant Prof., Department of Genetics, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Summary

This study aimed to investigate phylogenetic relationships of cyanobacteria based on the 16S rRNA, ITS genes and palindromic sequences of HIP, ERIC, and STRR. The use of Internal Transcribed Spacer (ITS) region secondary structures has been proposed for phylogenetic reconstructions. Sampling was done from five Ghanats of shallow aqueducts located at Gonbad Kavous villages (Golestan province, NE of Iran), and purified in Z8 culture medium. After DNA extraction, 16S rRNA and ITS genes were amplified and sequenced. The phylogenetic tree was created using the Likelihood Maximum method and the appropriate model with the help of Iqtree online web server. The secondary structure of ITS was drawn in different parts of helix D1-D1', D2, D3, tRNAIle, tRNAAla, BOX B, BOX A, and V3 using Mfold program. Then, phylogenetic analysis of fingerprints was converted to binary information with the presence and absence of separate, and reproducible bands in each DNA fingerprint pattern generated by PCR profiles of HIP, ERIC and STRR, and binary information was used to construct a composite dendrograms. The results showed that, the studied strains belonged to four families viz. *Aphanizomenonaceae*, *Nostocaceae*, *Hapalosiphonaceae*, and *Calotrichaceae* of subsections of order *Nostocales*. The results of the dendrograms clusters drawn from the proliferation of palindrome sequences confirmed the clustering of phylogenetic trees. However, the results of the variable sections found in sections D1-D1' and Box-B of the ITS gene revealed unique secondary structures that did not have a similar pattern to their close counterparts. The overall results showed that, the data obtained from genomic fingerprints, in silico and phylogenetic analysis are very useful for distinguishing closely related strains of cyanobacteria.

Keywords: *Aphanizomenonaceae*، *Calotrichaceae*، *Hapalosiphonaceae*، in silico analysis، *Nostocaceae*

مقدمه

سیانوباکتری‌ها به دلیل دارا بودن کلروفیل و انجام فرآیند فتوسنتز اکسیژنی توسط دو فتوسیستم که در جلبک‌ها و دیگر گیاهان آلی است، به جلبک‌های سبز-آبی نیز مشهورند. در بسیاری موارد، از سیستم کد بین‌المللی گیاه‌شناسی برای تاکسونومی آن‌ها استفاده می‌شود که تنها براساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی آن‌ها است. با این حال، مطالعات فراساختاری نشان می‌دهد که سیانوباکتری‌ها (پروکاریوت‌ها)، فاقد هسته سازمان‌یافته و دیگر اندامک‌ها بوده و دارای دیواره پپتیدوگلیکانی هستند که مشخصه یوباکتری‌های گرم منفی است. به علاوه، مشخصه‌های دیگری نیز مانند دستگاه فتوسنتزی و تولید اکسیژن که آن‌ها را از دیگر باکتری‌ها متمایز می‌سازد وجود دارند (Liu et al. 2014).

رده‌بندی سیانوباکتری‌های ریشه‌ای هتروسیت‌دار که از ریخت‌شناسی متنوع و همچنین ویژگی‌های فیزیولوژیکی آن‌ها منشا می‌گیرد، مشکلات بسیاری را برای تاکسونومیست‌ها ایجاد کرده، چراکه تنوع در ریخت‌شناسی، موجب شناسایی‌های نادرست گردیده و شباهت‌های فیزیولوژیکی و ریخت‌شناختی نباید بین سویه‌های مختلف سیانوباکتریایی، معیاری برای انعکاس ارتباطات ژنتیکی بین سویه‌ها در نظر گرفته شود. لذا همین امر منجر به گسترش روش‌های نوین و قابل‌اعتمادی برای رده‌بندی تاکسونومیکی سیانوباکتری‌ها (سیانوپروکاریوت‌ها) گردیده است؛ روش‌هایی مانند مطالعات مقایسه‌ای ترکیب بازهای DNA، ارزیابی براساس هیبریداسیون DNA، توالی‌یابی ژن‌ها و استراتژی‌های انگشت‌نگاری DNA (Komárek et al. 2014, 2016).

امروزه استفاده از مارکرهای مولکولی شامل توالی‌های پالیندرومی به شدت تکراری (Highly Iterated) HIP (Palindromes)، توالی‌های تکراری کوتاه پشت‌سرهم تکرارشونده (Short Tandemly Repeated Repetitive) STRR، توالی تکراری درون ژنی توافقی اینتروباکتریوم (ERIC Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) و پالیندروم‌های تکراری خارج ژنی (Repetitive Extragenic Palindrome) REP شامل تکنیک‌های بر محور PCR هستند و rep-PCR نامیده می‌شود، در فیلوژنی مولکولی سیانوباکتری‌ها مرسوم هستند. این روش‌ها از توالی‌های تکراری الیگونوکلئوتیدی حاضر در سویه‌های سیانوباکتریایی برای تشخیص اعضای نزدیک متعلق به یک جنس استفاده می‌کند (Shokraei et al. 2019). در واقع، ژنوم پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها، دارای توالی‌های تکراری پراکنده هستند. علی‌رغم عملکرد ناشناخته آن‌ها و فقدان اطلاعات درباره این‌که آن‌ها چگونه حفظ و پراکنده شده‌اند، حضور این توالی‌ها،

پراکنش گسترده آن‌ها و طبیعت محافظت شده آن‌ها، نه تنها از نظر روش‌شناسی برای انگشت‌نگاری DNA، از اهمیت بسیاری برخوردار است که به عنوان روشی جایگزین برای شناسایی گونه‌ها و سویه‌ها در مطالعات گوناگون، معرفی شده است. توالی‌های تکراری DNA، در ابتدا در ژنوم *Calothrix* گزارش و سپس در سویه *Anabaena* sp. PCC 7120 و بعدها در جنس‌های سیانوباکتری‌ها هتروسیت‌دار دیگر نیز یافت شدند (Driscoll et al. 2018). توالی‌های تکراری در ژنوم پروکاریوت‌ها می‌توانند، جایگاه‌های اتصال برای پرایمرهای الیگونوکلئوتیدی در روش انگشت‌نگاری‌های ژنومیک به واسطه واکنش زنجیره‌ای پلیمریز rep-PCR باشد. rep-PCR براساس پرایمرهای الیگونوکلئوتیدی است که با توالی‌های تکراری، مکمل هستند و تکثیر قطعات DNA با اندازه‌های مختلف که بین این عناصر قرار گرفته‌اند را امکان‌پذیر می‌کنند. سپس، امپلیکون‌های چندگانه با اندازه‌های مختلف، به وسیله الکتروفورز جداسازی شده و الگوهای انگشت‌نگاری اختصاصی برای هر سویه به دست می‌آید. به این صورت که تعداد متنوعی از این عناصر تکراری در جنس‌های مختلف سیانوباکتری‌ها، به دست می‌آید. بنابراین، با استفاده از پرایمرهای مختلف می‌توان انگشت‌نگاری DNA مختلفی از میکروارگانیسم‌ها را انجام داد. شناسایی و آنالیز محصولات rep-PCR با اندازه‌های مختلف، توسط معاینه بصری ژل‌های لکه‌گذاری شده با اتیدیوم برماید، انجام می‌شود و سپس شناسایی با کمک کامپیوتر و به کمک اسکن لیزری محصولات تکثیر و لیبل شده با فلورئوفور صورت می‌گیرد. الگوهای انگشت‌نگاری DNA می‌توانند با یکدیگر مقایسه شوند تا بتوان درجه ارتباط شباهت سویه‌های جداسازی شده با یکدیگر را تخمین زد (Moreira et al. 2020).

آنالیز توالی‌های HIP، ERIC و STRR، ابزاری قوی برای مطالعات تاکسونومی معرفی شده‌اند. اختصاصی بودن این توالی‌ها، برای کشت‌های غیراگزینیک سیانوباکتری‌ها را نیز مفید ساخته است. این توالی‌های کوتاه تکراری، نه تنها برای تولید انگشت‌نگاری DNA اختصاصی هر سویه استفاده می‌شوند، بلکه به عنوان پروب‌های الیگونوکلئوتیدی و هم به صورت پرایمرهای برای تولید پروفایل‌های DNA ی تکثیرشده با PCR به کار می‌روند. به علاوه، این توالی‌ها، به طور گسترده‌ای برای تفکیک سویه‌های سیانوباکتری‌ها نیز استفاده شده‌اند (Selvakumar & Gopalaswamy 2008). محققان، سویه‌های سیانوباکتری تولیدکننده سم را با استفاده از توالی‌های STRR شناسایی کردند. آن‌ها با استفاده از توالی‌های STRR، سطح بالاتری از تنوع را مشاهده کردند و کلاستر بندی‌های مشخصی را بین چندین

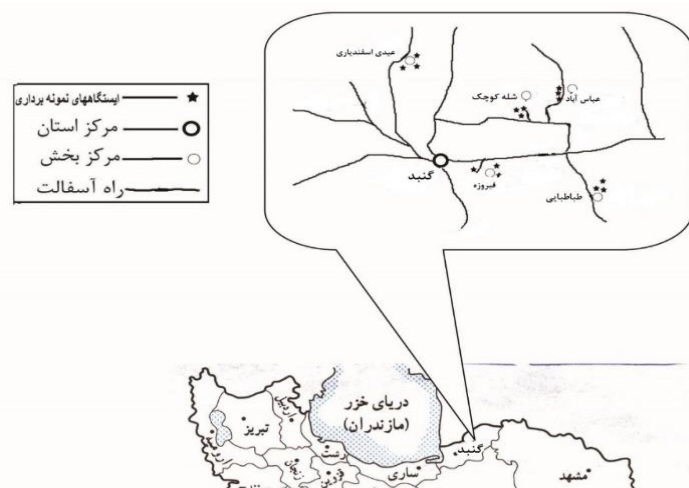
فیلوژنتیک مولکولی و ژنتیک تکاملی آن‌ها کمتر مورد بررسی قرار گرفته و این خود مشکلات زیادی را در معرفی سویه‌های برتر از لحاظ تولید ترکیبات زیست‌فعال به همراه داشته است. همان‌طور که کشف ترکیب‌های شیمیایی جدید در سیانوباکتری‌ها می‌تواند منجر به تکامل صنعت داروسازی شود، معرفی صحیح سویه مورد نظر از لحاظ تاکسونومی نیز از اهمیت زیادی برخوردار است. در این راستا، با توجه به اهمیت بررسی‌های ژنتیک تکاملی و مولکولی در زمینه سویه‌های سیانوباکتری‌ها و با توجه به این که تاکنون بیشتر سیانوباکتری‌های مناطق مختلف ایران ناشناخته‌اند، هدف از این تحقیق، استفاده از رویکرد پلی‌فازیک جهت آنالیزهای درون رایانه‌ای انگشت‌نگاری ژنومیک و فیلوژنی مولکولی سیانو-باکتری‌های موجود در پنج قنات استان گلستان بود.

روش بررسی

- جمع‌آوری، کشت، خالص‌سازی و آنالیزهای فنوتیپیک نمونه‌های آب شرب از تعدادی از قنات‌های کم‌عمق روستاهای شهرستان گنبدکاووس (استان گلستان) به نام‌های شله‌کوچک نزدیک روستای وکیل‌آباد، طباطبایی نزدیک روستای حسین‌آباد تپه‌سر، عباس‌آباد نزدیک روستای حسین‌آباد جلین، عیدی اسفندیاری نزدیک روستای کلوکن و فیروزه نزدیک روستای یساقی [طول جغرافیایی (E) 54°26' 55' و عرض جغرافیایی (N) 36°51' 25'] انجام شد (شکل ۱). جمع‌آوری نمونه‌ها نیز از آب قنات و هم از دیواره‌های قنات صورت گرفت؛ به این ترتیب که از هر چاه، سه نمونه ۵۰۰ میلی‌لیتری از آب و سه نمونه از دیواره‌های چاه با استفاده از کاردک جمع‌آوری شد. نمونه‌ها در محیط کشت جامد Z8 (Kotai 1972) کشت داده شدند و در اتاقک رشد با دمای ۲۸ درجه سلسیوس و روشنایی ممتد لامپ فلورسنت با شدت ۳۰ میکرومول کوانتا انجام شد (Nowruzi 2020).

سیانوباکتری مستقل انجام دادند. توالی‌های STRR، همچنین برای تفکیک سویه *Nostoc* هم‌زیست با *Gunnera magellanica* از *G. tinctoria* استفاده شده‌اند (Negi et al. 2019). همچنین، محققان، روش انگشت‌نگاری براساس توالی‌های STRR و LTRR را برای آشکارسازی ناهمگنی در میان ایزوله‌های هم‌زیست و آزادی گونه‌های *Gunnera* ارایه دادند. نتایج نشان داد که ۲۲ ایزوله *Nostoc* از مجموع ۳۵ ایزوله هم‌زیست با گونه‌های نهان‌دانه *Gunnera* بودند (Anand et al. 2019).

در حالی که رده‌بندی سیانوباکتری‌ها در درجه اول براساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی، است اما همواره این مشکل مطرح است که ریخت‌شناسی میکروپها در کشت‌های آزمایشگاهی، بیشتر اوقات نسبت به ریخت‌شناسی اصلی آنان در طبیعت تغییر پیدا می‌کند. برخی ویژگی‌های شناسایی مانند واکنش گازی یا آکینت‌ها می‌توانند در محیط‌زیست‌های مختلف و شرایط کشت متفاوت، متنوع باشند. یا حتی می‌توانند طی کشت، ناپدید شوند. تکنولوژی PCR این اجازه را داده است که ارزیابی برای شناسایی گوناگونی‌ها در سطح نوکلئوتید انجام گیرد که این امر تأثیر مهمی تقریباً در همه زمینه‌های زیست‌شناسی مدرن داشته است. با پیشرفت‌های صورت گرفته در زیست‌شناسی مولکولی و بیوانفورماتیک، این امر امکان‌پذیر شده است که ژنوم یک ارگانیزم را برای یافتن توالی‌های منحصر به فرد کندوکاو کرد. از این توالی‌های منحصر به فرد می‌توان برای تفکیک یک گروه خاص از میکروارگانیزم‌ها از خویشاوندان نزدیک آن‌ها، استفاده کرد (Nowruzi & Blanco 2019). توالی‌های DNA، امکان استنباط فیلوژنی موجودات را می‌دهد که در واقع توالی‌های DNA در مقایسه با بسیاری از ویژگی‌های ریخت‌شناختی کمتر تأثیرپذیر هستند. تاکسونومی ژنوتیپی براساس ژن‌ها و فرآورده‌های طبیعی است. به‌رغم تولید طیف وسیعی از متابولیت‌های ثانویه توسط سیانوباکتری‌ها و قابلیت رشدپذیری سریع آن‌ها، تاکنون



شکل ۱- ایستگاه‌های نمونه‌برداری در منطقه تحت بررسی.

Fig. 1. Sampling stations in the area under investigation.

قرار دادن روی ژل الکتروفورز و نیز از روش کمی به کمک دستگاه نانودراپ استفاده گردید. قطعات ۱۴۵۴ تا ۱۴۹۴ جفت بازی 16S-23S rRNA ITS به کمک PCR، در حجم ۵۰ میکرولیتر تکثیر گردید.

- ترسیم درخت فیلوژنتیک

جستجوی بلاست نوکلئوتید برای یافتن توالی‌های مشابه ژن 16S rRNA موجود در پایگاه داده‌های GenBank™ در NCBI انجام گردید. هم‌ردیف‌سازی توالی ژن 16S rRNA به دست‌آمده در این بررسی به همراه دیگر توالی‌های مشابه برگرفته از GeneBank با استفاده از برنامه MAFFT (Ver. 7) انجام گردید. پس از انتخاب بهترین مدل، رسم درختان فیلوژنتیک با برنامه Iqtree server و با استفاده از آنالیز Maximum Likelihood صورت گرفت. ویرایش درخت حاصله به کمک برنامه Figtree و Inkscape انجام شد.

- آنالیز ساختار ثانویه منطقه 16S-23S rRNA ITS

به منظور رسم ساختار ثانویه ITS، از وب سرور Mfold (نسخه ۲/۳) استفاده شد (Zuker 2003). مناطق مختلف مارپیچ D1-D1'، مارپیچ D2، D3، ژن tRNA^{Ile}، مارپیچ V2، ژن tRNA^{Ala} و Box B طبق (Iteman et al. 2000) جستجو گردید. به علاوه، برای پیش‌بینی حضور ژن‌های tRNA^{Ile} و tRNA^{Ala} از سامانه tRNAscan-SE استفاده گردید.

- تکثیر توالی‌های پالیندرومی

پروفایل‌های PCR پرایمرهای ERIC، HIP و STRR روی ژل‌های آگارز بارگذاری شدند تا باندهای ضعیف از قوی تفکیک شوند.

به منظور خالص‌سازی سیانوباکتری‌ها از کشت‌های به دست آمده، سه تا پنج بار کشت مجدد تهیه شد تا کاملاً از خالص بودن آن اطمینان حاصل شود. جهت انکوباسیون، بین یک الی چهار هفته زمان در نظر گرفته شد. برای اطمینان از خالص بودن سویه‌ها، از تلقیح در محیط کشت R2ALAB163 (R2A) استفاده گردید. بعد از آماده شدن هر محیط، با سر سرنگ سترون در زیر لومینار فلو، مقداری از نمونه کشت‌های خالص شده به صورت نقطه نقطه دورتادور تشتک‌های پتری تلقیح شد. سعی گردید از تمام سطح کشت خالص شده، نمونه‌برداری انجام شود. سپس تشتک‌های پتری تلقیح شده، در دمای ۲۲ درجه سلسیوس به مدت پنج تا هشت روز و یا در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت سه روز قرار داده شد و پس از رشد، وجود و یا عدم وجود پرگنه در اطراف هر نقطه بررسی گردید. مرحله ریخت‌شناختی سیانوباکتری‌ها به کمک میکروسکوپ نوری مجهز به میکرومتر مدرج انجام گردید و در نهایت، شناسایی‌ها براساس کمارک (Komárek 2020) صورت گرفت.

- شناسایی مولکولی براساس توالی 16S-23S rRNA ITS

سویه‌های سیانوباکتری هتروسیت‌دار پس از خالص‌سازی و اطمینان از اگزینیک بودن محیط کشت، برای بررسی‌های مولکولی مورد آزمایش قرار گرفتند. برای شناسایی جنس مورد نظر از لحاظ مولکولی، پس از استخراج DNA از هورموگونوم‌های جداشده از هر پرگنه (Fiore et al. 2000)، از توالی ژن 16S rRNA و ITS استفاده گردید (Iteman et al. 2000, Taton et al. 2003). استخراج DNA به روش دستی CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) برای تعیین کیفیت DNA از روش کیفی به کمک

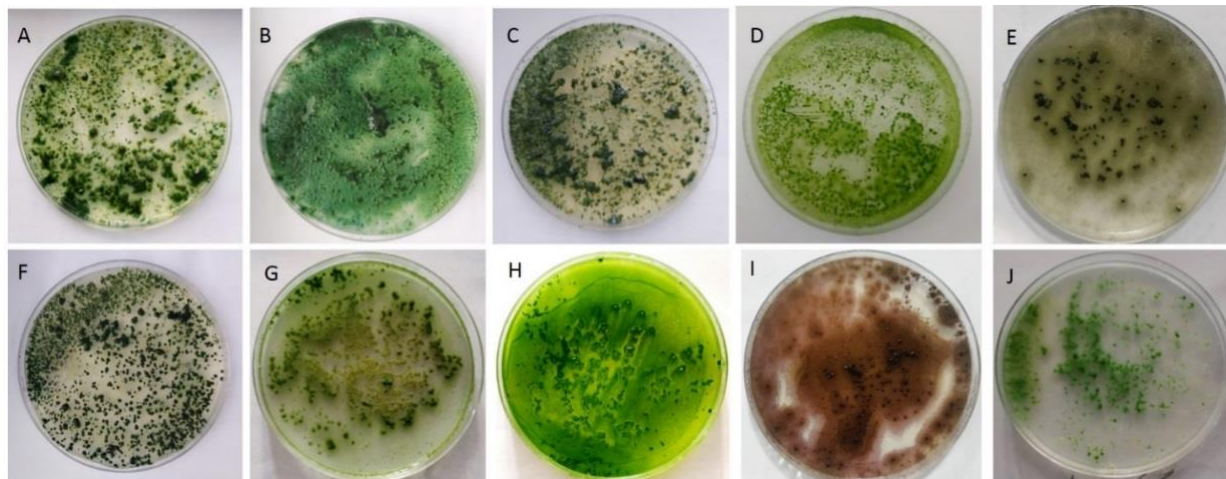
نهایی در چهار درجه سلسیوس برای ۳۰ دقیقه انجام گرفت (Rasmussen & Svenning 1998). برای تکثیر توالی‌های HIP-GC; 5'-HIP-TG; 5'-GCGATCGCTG-3' از پرایمرهای GCGATCGCGC-3' و 5'-HIP-CA; 5'-GCGATCGCCA-3' استفاده گردید و برنامه PCR شامل ۹۵ درجه سلسیوس برای پنج دقیقه، ۳۰ سیکل (۹۵ درجه سلسیوس برای ۳۰ ثانیه، ۳۰ درجه سلسیوس برای ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سلسیوس برای ۶۰ ثانیه)، یک سیکل در ۷۲ درجه سلسیوس برای پنج دقیقه انجام شد (Smith et al. 1998).

نتیجه

- بررسی‌های ریخت‌شناختی

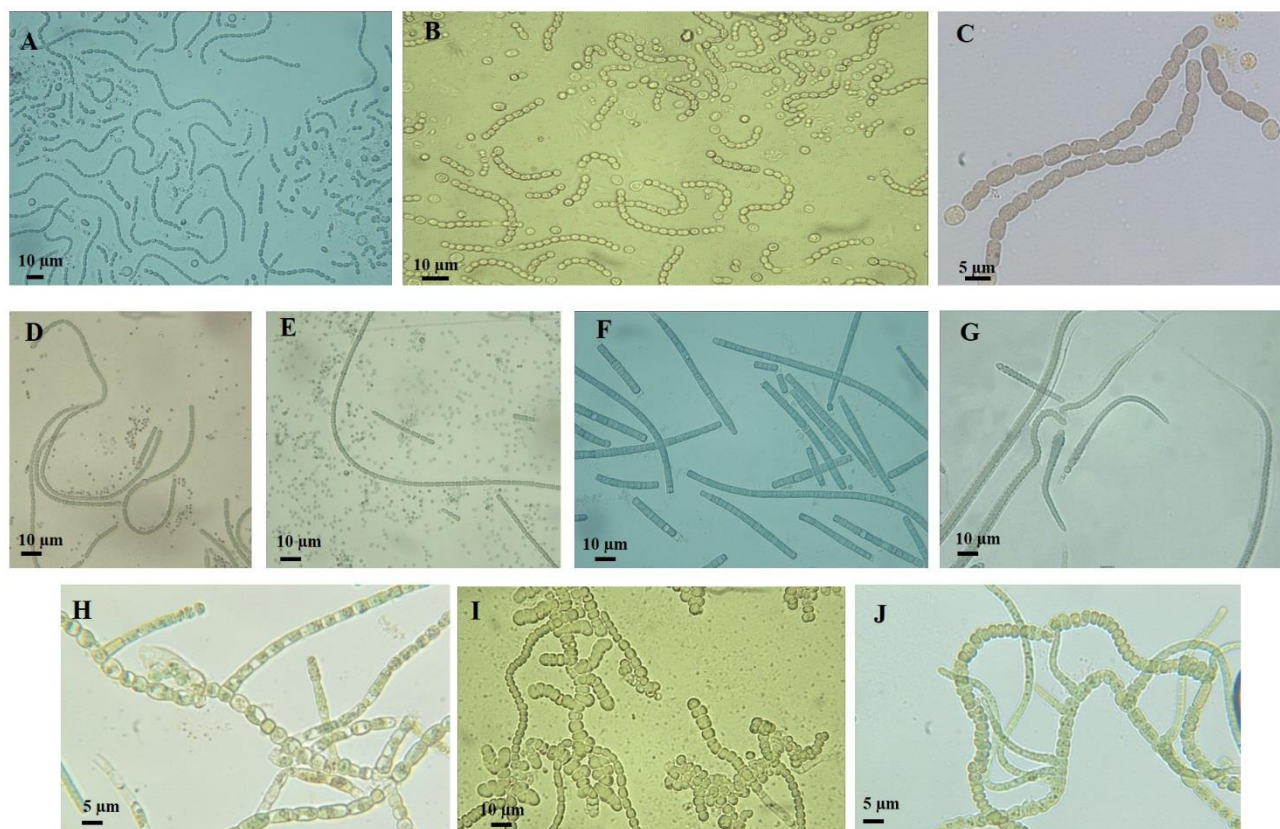
نتایج حاصل از بررسی ریخت‌شناختی سیانوباکتری‌های موجود در پنج قنات شهرستان گنبدکاووس، نشان از حضور ده سویه (جدول ۱) متعلق به چهار تیره *Aphanizomenonaceae*، *Nostocaceae*، *Hapalosiphonaceae* و *Calotrichaceae* تحت راسته *Nostocales* بود. سه سویه مورد بررسی در کلاذ *Neowestiellopsis*، یک سویه در کلاذ *Calothrix*، دو سویه در کلاذ *Anabaena*، یک سویه در کلاذ *Aliinostoc*، یک سویه در کلاذ *Nodularia* و دو سویه در کلاذ *Desmonostoc* جای گرفتند (شکل‌های ۲ و ۳).

حضور و عدم حضور باندهای مجزا و قابل تکثیر در هر الگوی انگشت‌نگاری DNA تولید شده با پروفایل‌های HIP PCR، ERIC و STRR، به اطلاعات دوتایی تبدیل شد و این اطلاعات برای ساختن دندروگرام مرکب، استفاده شد. نرم‌افزار BioDiversity Pro (Ver. 2) برای انجام آنالیز و با آپشن آنالیز کلاستر Jaccard استفاده گردید. برای تکثیر قطعات تکراری DNA، همه واکنش‌ها شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس، نیم میکرولیتر پرایمر، دو میکرولیتر DNA الگو و یک واحد بر میکرولیتر تگ DNA پلیمرز انجام گردید. پرایمرهای مورد استفاده برای توالی‌های ERIC شامل ERIC1A (5'-ERIC1B) و (ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3') و (AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3') بودند. برنامه PCR شامل سیکل اول در ۹۵ درجه سلسیوس برای هفت دقیقه با ۳۰ سیکل (۹۴ درجه سلسیوس برای یک دقیقه، ۵۲ درجه سلسیوس برای یک دقیقه، ۶۵ درجه سلسیوس برای هشت دقیقه) و یک سیکل در ۶۵ درجه سلسیوس برای ۱۶ دقیقه و آنکوباسیون نهایی در چهار درجه سلسیوس برای ۳۰ دقیقه انجام گرفت (Bruijn 1992). تکثیر پرایمر STRR1a (5'-CCARTCCCCARTCCCC-3') برنامه PCR شامل سیکل اول در ۹۵ درجه سلسیوس برای شش دقیقه، ۳۰ سیکل (۹۴ درجه سلسیوس برای یک دقیقه، ۵۶ درجه سلسیوس برای یک دقیقه، ۶۵ درجه سلسیوس برای پنج دقیقه) و یک سیکل ۶۵ درجه سلسیوس برای ۱۶ دقیقه و آنکوباسیون



شکل ۲- پرگنه‌های در حال رشد سیانوباکتری‌ها در محیط کشت جامد Z8 فاقد نیتروژن: A. *Calothrix* sp. Alborz 7، B. *Neowestiellopsis* sp. Alborz 6، C. *Neowestiellopsis* sp. Alborz 8، D. *Neowestiellopsis* sp. Alborz 2، E. *Desmonostoc* sp. Alborz 10، F. *Desmonostoc* sp. Alborz 5، G. *Nodularia* sp. Alborz 9، H. *Aliinostoc* sp. Alborz 1، I. *Anabaena* sp. Alborz 4، J. *Anabaena* sp. Alborz 3

Fig. 2. Grown colonies of cyanobacteria on solid Z8 without nitrogen: A. *Calothrix* sp. Alborz 7، B. *Neowestiellopsis* sp. Alborz 6، C. *Neowestiellopsis* sp. Alborz 8، D. *Neowestiellopsis* sp. Alborz 2، E. *Desmonostoc* sp. Alborz 10، F. *Desmonostoc* sp. Alborz 5، G. *Nodularia* sp. Alborz 9، H. *Aliinostoc* sp. Alborz 1، I. *Anabaena* sp. Alborz 4، J. *Anabaena* sp. Alborz 3.



شکل ۳- میکروگراف‌های نوری سوبه‌های سیانوباکتری‌های مختلف: A. *Desmonostoc* sp. Alborz 10, B. *Desmonostoc* sp. Alborz 5, C. *Aliinostoc* sp. Alborz 1, D. *Anabaena* sp. Alborz 4, E. *Anabaena* sp. Alborz 3, F. *Nodularia* sp. Alborz 9, G. *Calothrix* sp. Alborz 7, H. *Neowestiellopsis* sp. Alborz 6, I. *Neowestiellopsis* sp. Alborz 8, J. *Neowestiellopsis* sp. Alborz 2 (مقیاس = ۵ و ۱۰ میکرومتر).

Fig. 3. Different light micrographs of cyanobacteria strains: A. *Desmonostoc* sp. Alborz 10, B. *Desmonostoc* sp. Alborz 5, C. *Aliinostoc* sp. Alborz 1, D. *Anabaena* sp. Alborz 4, E. *Anabaena* sp. Alborz 3, F. *Nodularia* sp. Alborz 9, G. *Calothrix* sp. Alborz 7, H. *Neowestiellopsis* sp. Alborz 6, I. *Neowestiellopsis* sp. Alborz 8, J. *Neowestiellopsis* sp. Alborz 2 (Bars = 5 and 10 μm).

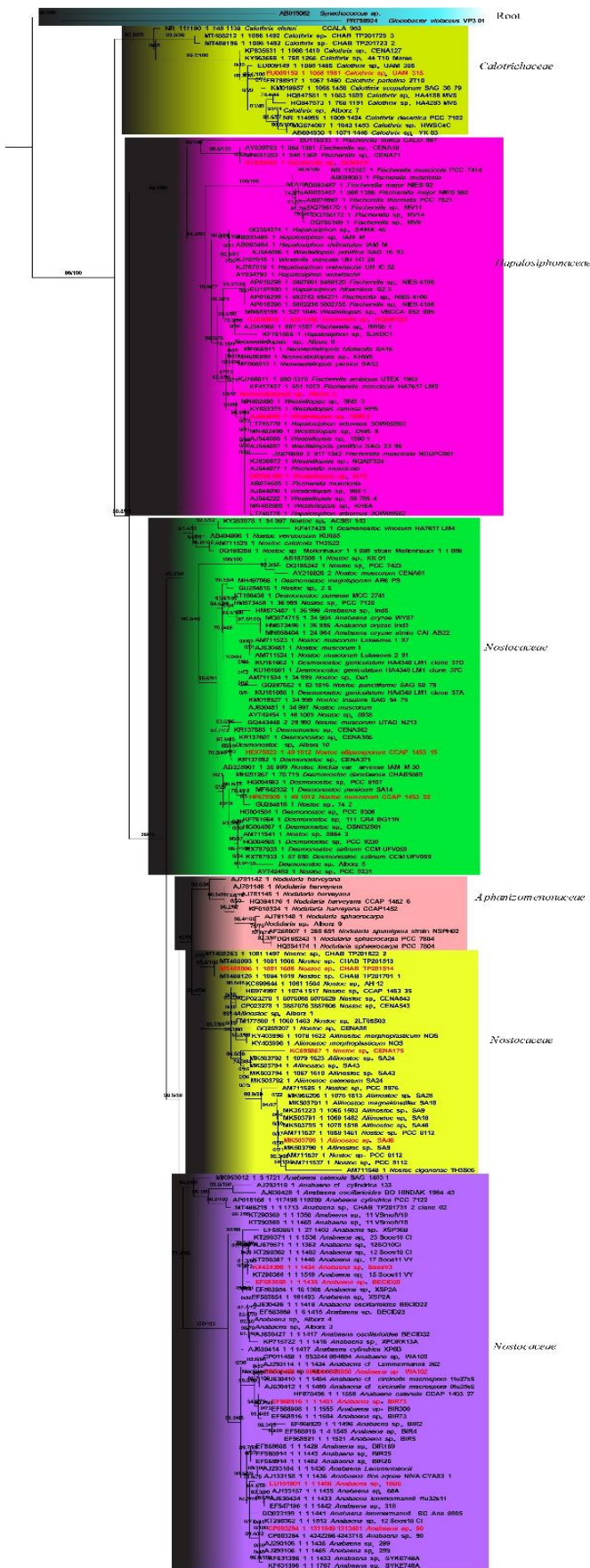
جدول ۱- سیانوباکتری‌های هتروسیت‌دار بومی شناسایی شده در روستاهای شله‌کوچک، طباطبایی، عباس‌آباد، عیدی اسفندیاری و فیروزه
Table 1. Representing indigenous heterocystous cyanobacteria strains identified in Shol-e Koochak, Tabatabaii, Abbas Abad, Eidi Esfandiary, and Firoozeh villages

Name of Ghanat/strain	<i>Aliinostoc</i>	<i>Nodularia</i>	<i>Calothrix</i>	<i>Desmonostoc</i>	<i>Anabaena</i>	<i>Neowestiellopsis</i>
Shol-e Koochak	-	-	-	■	-	■
Tabatabaii	■	-	-	-	■	-
Abbas Abad	-	-	-	-	-	-
Eidi Esfandiary	-	-	-	-	-	■
Firoozeh	-	■	■	■	■	■

- نتایج حاصل از آنالیزهای فیلوژنتیک

برای ساخت درخت فیلوژنتیک، از سویه (FR798924) *Gloeobacter violaceus* VP3-01 و *Synechococcus* sp. (AB015062) به عنوان ریشه استفاده گردید. نتایج حاصل از ارزیابی بهترین مدل برای ساخت درخت با استفاده از وب سرور IQ tree server، TPM2+I+G4+F بود. اعداد کنار هر گره انشعابی، نشان‌دهنده فراوانی حاصل از آنالیز بوت استرپ حاصل از ۱۰۰۰ تکرار است. با توجه به درخت فیلوژنتیک ساخته شده، هر شاخه روابط بین آرایه‌ها از نظر نسل یا جد (نیاکانی) را معین می‌کند. طول شاخه، بیانگر میزان تفاوت‌ها نسبت به نیای مشترک است که در واقع، طول تعداد تغییرهایی است که در یک شاخه رخ داده است. برای ساخت درخت در مجموع، از ۲۰۹ سویه مختلف زیربخش *Nostocales* استفاده گردید. درخت ساخته شده با روش Maximum Likelihood نشان می‌دهد که سویه‌ها در چهار تیره *Nostocaceae*، *Aphanizomenonaceae*، *Hapalosiphonaceae* و *Calotrichaceae* کلاستر بندی شدند و هر سویه درون تیره خود در یک کلاستر مشخص و یک‌رنگ ویژه قرار گرفته است. نتایج حاصل از آنالیز فیلوژنتیکی سویه‌های کلاستر بندی شده در تیره *Calotrichaceae* نشان داد که *Calothrix* sp. Alborz 7 دارای قرابت با سویه *Calothrix desertica* PCC 7102 است و با حمایت بالای بوت استرپ (۹۵/۷۴ درصد) در کلاستر مشترک قرار می‌گیرد. نتایج حاصل از آنالیز فیلوژنتیکی سویه‌های کلاستر بندی شده در تیره *Hapalosiphonaceae* نشان داد که هر سه سویه *Neowestiellopsis* sp. Alborz 6، *Neowestiellopsis* sp. Alborz 8 و *Neowestiellopsis* sp. Alborz 2 با سایر

سویه‌های *Neowestiellopsis* با حمایت بالای بوت استرپ در یک کلاستر مشترک قرار گرفته است. نتایج حاصل از آنالیز فیلوژنتیکی سویه‌های کلاستر بندی شده در تیره *Desmonostoc* sp. Alborz 10 با قرابت فیلوژنتیکی (۹۷/۶ درصد) با سویه *Desmonostoc* sp. CENA386 در یک کلاستر قرار می‌گیرد و سویه *Desmonostoc* sp. Alborz 5 با حمایت بالای بوت استرپ (۹۸/۹ درصد) با سویه *Nostoc* sp. PCC ۹۲۳۱ قرابت فیلوژنتیکی دارد. نتایج حاصل از آنالیز فیلوژنتیکی سویه‌های کلاستر بندی شده در تیره *Nodularia* sp. Alborz 9 دارای قرابت با سویه *Nodularia Spumigena* strain NSPH02 است و با حمایت بالای بوت استرپ (۷۶ درصد) با آن در کلاستر مشترک قرار می‌گیرد. سویه‌های *Nodularia sphaerocarpa* DQ185243 و *Nodularia sphaerocarpa* HQ394174 در یک ساب‌کلاستر قرار دارند. نتایج حاصل از آنالیز فیلوژنتیکی سویه‌های کلاستر بندی شده در تیره *Nostocaceae* نشان داد که سویه *Aliinostoc* sp. Alborz 1 دارای بیشترین قرابت با سویه *Nostoc* sp. 2LT05S03 است و با حمایت بالای بوت استرپ (۸۹/۱ درصد) با آن قرابت فیلوژنتیکی دارد. همچنین، نتایج حاصل از آنالیز فیلوژنتیکی سویه‌های کلاستر بندی شده در تیره *Nostocaceae* نشان داد که سویه‌های *Anabaena* sp. Alborz 3 و *Anabaena* sp. Alborz 4 درون یک کلاستر با قرابت فیلوژنتیکی ۹۸ درصد قرار می‌گیرند و با سویه *Anabaena* sp. BECID23 با حمایت بالای بوت استرپ (۸۳/۶ درصد) قرابت فیلوژنتیکی دارند. مقیاس نشان داده شده در شکل، نشان‌دهنده ۰/۰۳ جهش به ازای هر نوکلئوتید است (شکل ۴).



شکل ۴- روابط فیلوژنتیکی بین سویه‌های مورد مطالعه و سایر سیانوباکتری‌ها براساس توالی‌های 16S rDNA، *Gloeobacter violaceus* VP3-01 و *Synechococcus sp.* (AB015062) به عنوان ریشه درخت انتخاب شدند. اعداد کنار هر گره درصد حمایت بوت استرپ استاندارد (%)/درصد حمایت بوت استرپ را برای آنالیز حداکثر بزرگ‌نمایی نشان می‌دهد.

Fig. 4. Phylogenetic relationships between studied strains and related cyanobacteria based on 16S rDNA sequences with *Gloeobacter violaceus* VP3-01 and *Synechococcus sp.* (AB015062) as out group. Numbers near nodes indicate standard bootstrap support (%) /ultrafast bootstrap support (%) for ML analyses.

جدول ۴- مقایسه تعداد نوکلئوتیدهای مناطق ITS 5-10 *Desmonostoc* sp. Alborz و سایر سویه‌های مشابه

Table 4. Comparison of the nucleotides length of the ITS regions of *Desmonostoc* sp. Alborz 5-10 and the other similar strains

Studied strain and reference strain	D1-D1' helix	D2 with spacer	D3 with spacer	tRNA ^{Ile} gene	tRNA ^{Ala} gene	Pere BOX B spacer	BOX B	Post BOX B spacer	BOX A	V3
<i>Desmonostoc</i> sp. Alborz 5	66	18	5	-	-	29	27	17	11	-
<i>Desmonostoc</i> sp. Alborz 10	67	18	5	75	75	-	-	-	-	-
KF761564.1: <i>Desmonostoc</i> sp.	66	18	5	-	-	29	27	17	11	-
KU161661.1: <i>D. geniculatum</i>	65	17	5	-	-	39	24	18	11	-

جدول ۵- مقایسه تعداد نوکلئوتیدهای مناطق ITS 9 *Nodularia* sp. Alborz و سایر سویه‌های مشابه

Table 5. Comparison of the nucleotides length of the ITS regions of *Nodularia* sp. Alborz 9 and the other similar strains

Studied strain and reference strain	D1-D1' helix	D2 with spacer	D3 with spacer	tRNA ^{Ile} gene	tRNA ^{Ala} gene	Pere BOX B spacer	BOX B	Post BOX B spacer	BOX A	V3
<i>Nodularia</i> sp. Alborz 9	66	18	5	-	-	45	32	17	11	-
AY768379.1: <i>N. harveyana</i>	-	-	5	-	73	122	36	17	11	-
AF367159.1: <i>N. harveyana</i>	66	18	5	-	-	28	31	17	11	-
MT488088.1: <i>Nodularia</i> sp.	65	19	5	-	-	44	31	17	11	-
MH979221.1: <i>N. spumigena</i>	65	18	5	-	-	41	31	17	11	-
AF367166.1: <i>N. sphaerocarpa</i>	65	18	5	-	-	41	31	17	11	-

جدول ۶- مقایسه تعداد نوکلئوتیدهای مناطق ITS 1 *Aliinostoc* sp. Alborz و سایر سویه‌های مشابه

Table 6. Comparison of the nucleotides length of the ITS regions of *Aliinostoc* sp. Alborz 1 and the other similar strains

Studied strain and reference strain	D1-D1' helix	D2 with spacer	D3 with spacer	tRNA ^{Ile} gene	tRNA ^{Ala} gene	Pere BOX B spacer	BOX B	Post BOX B spacer	BOX A	V3
<i>Aliinostoc</i> sp. Alborz 1	69	20	10	74	73	39	30	17	11	-
KY403996.1: <i>A. morphoplasticum</i>	93	24	5	-	-	16	25	15	11	-
MK503791.1: <i>Aliinostoc</i> sp. SA18	60	-	-	-	-	-	33	-	-	-
MK503792.1: <i>Aliinostoc</i> sp. SA24	93	14	-	-	-	45	26	-	-	-
MK503793.1: <i>Aliinostoc</i> sp. SA30	62	-	-	-	-	-	34	18	-	47
MH497065.1: <i>A. soli</i> ZH1	66	20	5	-	-	16	27	-	-	-
MH497064.1: <i>A. tiwarii</i> LIPS	65	-	-	-	-	-	28	44	11	-

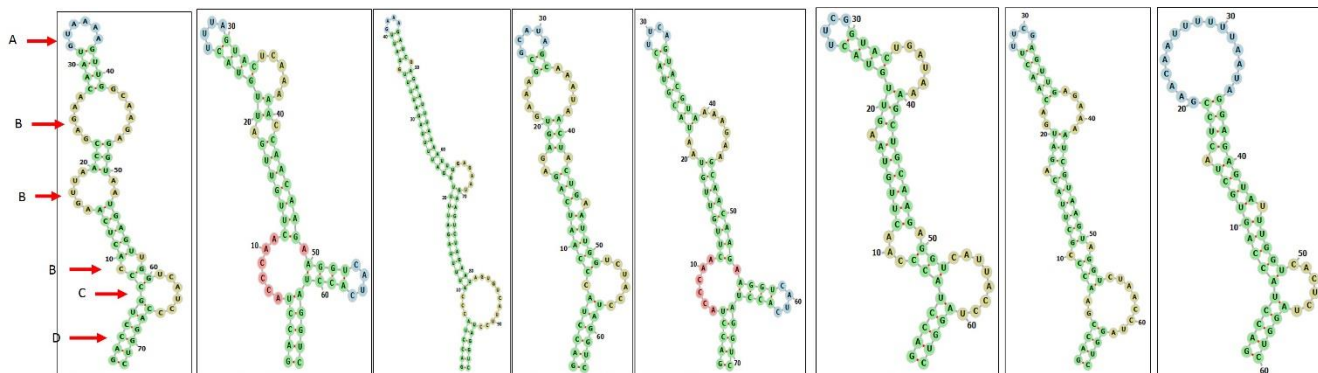
جدول ۷- مقایسه تعداد نوکلئوتیدهای مناطق ITS 3-4 *Anabaena* sp. Alborz و سایر سویه‌های مشابه

Table 7. Comparison of the nucleotides length of the ITS regions of *Anabaena* sp. Alborz 3-4 and the other similar strains

Studied strain and reference strain	D1-D1' helix	D2 with spacer	D3 with spacer	tRNA ^{Ile} gene	tRNA ^{Ala} gene	Pere BOX B spacer	BOX B	Post BOX B spacer	BOX A	V3
<i>Anabaena</i> sp. Alborz 4	72	-	-	-	73	40	32	17	11	-
<i>Anabaena</i> sp. Alborz 3	67	19	11	74	73	14	36	17	11	96
KT290325.1: <i>A. cylindrica</i>	65	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KT290324.1: <i>A. inaequalis</i>	65	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KT290328.1: <i>Anabaena</i> sp. SAG 28.79	65	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KT290322.1: <i>Anabaena</i> sp. SAG 12.82	65	18	5	-	-	44	32	19	11	-
MT577724.1: <i>Anabaena</i> sp. It 4	65	21	5	-	-	44	28	-	-	-
HQ846552.1: <i>Anabaena</i> sp. A7	63	19	11	73	72	-	26	17	11	-
HQ846551.1: <i>A. iyengarii</i>	70	19	10	74	73	16	36	17	11	-
HQ846550.1: <i>A. oscillarioides</i>	-	-	-	64	73	43	27	13	11	-
HQ846527.1: <i>A. oscillarioides</i>	65	23	11	74	73	25	52	12	11	-

نشان داد که تعداد نوکلئوتیدها در لوپ دوطرفه انتهایی سویه مورد بررسی با سایر سویه‌ها متفاوت است (شکل ۵). مقایسه لوپ‌ها در بخش‌های مختلف *Calothrix* sp. Alborz 7 Box B با سایر سویه‌ها نیز نشان داد که تعداد نوکلئوتیدهای لوپ انتهایی و لوپ دوطرفه میانی با سایر سویه‌ها متفاوت است (شکل ۶ و جدول ۸).

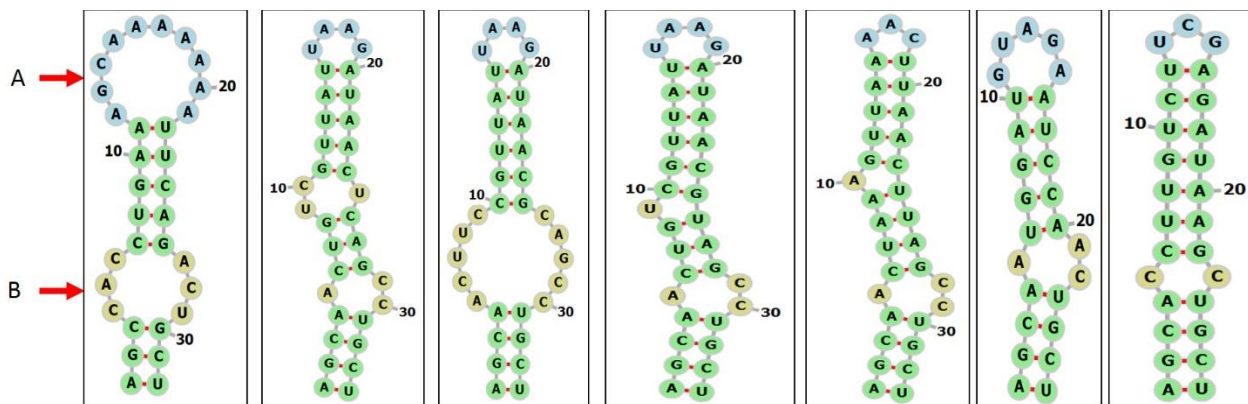
- تجزیه و تحلیل مقایسه‌ای در بخش‌های D1-D1' و Box B مناطق مختلف روی مارپیچ D1-D1' و Box B به صورت لوپ انتهایی دوطرفه (A)، لوپ دوطرفه میانی (B)، لوپ یک‌طرفه (C) و قاعده لوپ‌ها (D) مشخص شده است. مقایسه لوپ‌ها در بخش‌های مختلف *Calothrix* sp. Alborz 7 D1-D1' با سایر سویه‌ها



Calothrix sp. Alborz 7, KT336448.1, HQ847571.1, KF761555.1, AF236642.1, HQ847580.1, FJ661009.1, FJ661007.1

شکل ۵- پیش‌بینی ساختار ثانویه مارپیچ D1-D1' سویه *Calothrix* sp. Alborz 7 در مقایسه با سایر سویه‌های مشابه (از وب سرور M-fold، نسخه ۲/۳، دما ۳۷ درجه سلسیوس): A. لوپ انتهایی دوطرفه، B. لوپ دوطرفه میانی، C. لوپ یک‌طرفه، D. لوپ قاعده‌ای.

Fig. 5. Predicted secondary structures for the D1-D1' helices of *Calothrix* sp. Alborz 7 and the other similar strains. Secondary structures generated from M-fold web server (Ver. 2.3), temperature: 37 °C default; structure: untangled loop fix. Terminal bilateral bulge (A), Bilateral bulge (B), Unilateral bulge (C), Basal clamp (D).



Calothrix sp. Alborz 7, KT336448.1, HQ847571.1, AF236642.1, HQ847580.1, FJ661009.1, FJ661007.1

شکل ۶- پیش‌بینی ساختار ثانویه مارپیچ Box B سویه *Calothrix* sp. Alborz 7 با سایر سویه‌های مشابه (از وب سرور M-fold، نسخه ۲/۳، دما ۳۷ درجه سلسیوس): A. لوپ انتهایی دوطرفه، B. لوپ دوطرفه میانی.

Fig. 6. Predicted secondary structures for the Box B helices of *Calothrix* sp. Alborz 7 and the other similar strains. Secondary structures generated from M-fold web server (Ver. 2.3), temperature: 37 °C default; structure: untangled loop fix. Terminal bilateral bulge (A), Bilateral bulge (B).

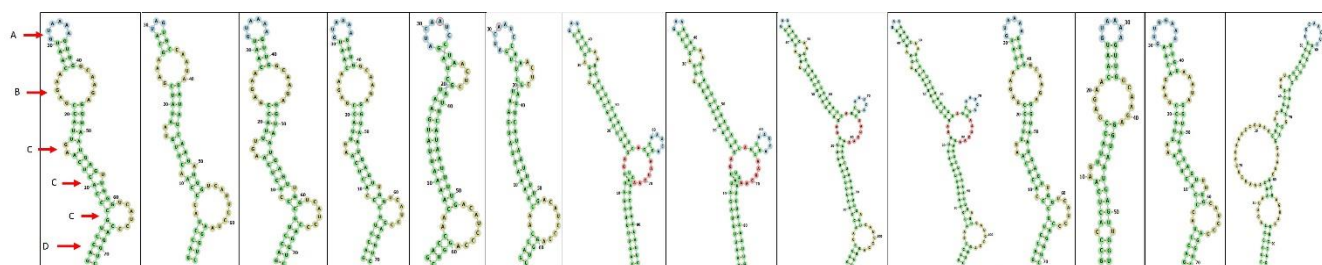
جدول ۸- مقایسه ساختار ثانویه 16S-23S rRNA (مارپیچ D1-D1' و Box-B) بین *Calothrix* sp. Alborz 7 و سایر سویه‌های مشابه

Table 8. Comparison of secondary structure of 16S-23S rRNA (D1-D1' helix and Box-B helix) between the *Calothrix* sp. Alborz 7 and the other similar strains

Studied strain and reference strain	D1-D1' helix				BOX B		
	Terminal bilateral bulge (A)	Bilateral bulge (B)	Unilateral bulge (C)	Basal clamp (F)	Terminal bilateral bulge (A)	Bilateral bulge (B)	Unilateral bulge (C)
	No. of nucleotide	No. of loop	No. of loop	No. of nucleotide	No. of nucleotide	No. of nucleotide	No. of nucleotide
<i>Calothrix</i> sp. Alborz 7	8	3	1	10	12	10	-
KT336448.1: <i>Calothrix</i> sp. SEV5-4	6	2	1	8	6	14	-
HQ847571.1 <i>Calothrix</i> sp. HA4395	6	2	1	10	6	14	-
KF761555.1: <i>Calothrix</i> sp. RSUAIH	7	3	1	10	-	-	-
AF236642.1: <i>C. parietina</i>	6	2	-	8	6	7	5
HQ847580.1: <i>Calothrix</i> sp. HA4186	6	1	3	8	5	7	5
FJ661009.1: <i>Calothrix</i> sp. Asko 16	6	3	1	6	7	7	-
FJ661007.1: <i>Calothrix</i> sp. Asko 3	18	-	3	8	5	6	-

در سویه 2 *Neowestiellopsis* sp. Alborz دارای هشت نوکلئوتید بود (شکل ۷). مقایسه لوپ‌ها در بخش‌های مختلف Box B نشان داد که همه سویه‌ها دارای لوپ دوطرفه ابتدایی و تعداد نوکلئوتیدهای آن‌ها متغیر بود. سویه *Neowestiellopsis* sp. Alborz 6 و *Neowestiellopsis* sp. Alborz 8 دارای هشت نوکلئوتید و سویه 6 *Neowestiellopsis* sp. Alborz پنج نوکلئوتید داشت. در سویه 6 *Neowestiellopsis* sp. و *Neowestiellopsis* sp. Alborz 6 در سویه 2 *Neowestiellopsis* sp. دارای هفت نوکلئوتید، در حالی که در *Neowestiellopsis* sp. Alborz 8 نه نوکلئوتید مشاهده شد (شکل ۹ و جدول ۹).

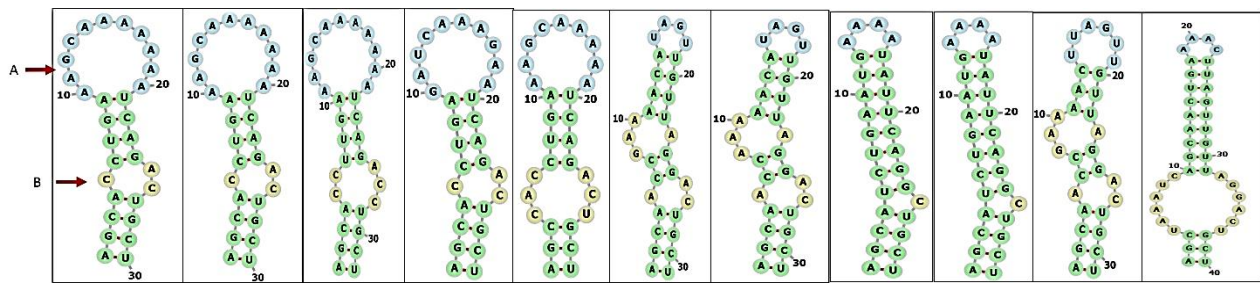
مقایسه لوپ‌ها در بخش‌های مختلف D1-D1' نشان داد که دو سویه 6 *Neowestiellopsis* sp. و *Neowestiellopsis* sp. Alborz 8 در قسمت لوپ ابتدایی دوطرفه دارای هشت نوکلئوتید، اما سویه 2 *Neowestiellopsis* sp. دارای پنج نوکلئوتید بود. در سویه‌های مشابه نیز لوپ دوطرفه ابتدایی وجود داشت، اما تعداد نوکلئوتیدهای آن‌ها متفاوت بود. تعداد لوپ‌های دوطرفه در هر سویه متفاوت و بین ۱ تا سه لوپ بود. لوپ یک‌طرفه در همه سویه‌ها وجود داشت و تعداد آن بین ۱ تا ۲ لوپ متغیر بود. در قسمت پایه انتهایی، تعداد نوکلئوتیدها متفاوت، اما در سویه‌های *Neowestiellopsis* sp. Alborz 6 و *Neowestiellopsis* sp. Alborz 8 دارای ۱۰ نوکلئوتید و



Neowestiellopsis sp. Alborz 6, *Neowestiellopsis* sp. Alborz 2, *Neowestiellopsis* sp. Alborz 8, KF417427.1, KT715746.1, KT715745.1, DQ786172.1, DQ786170.1, DQ786173.1, DQ786171.1, MN656995.1, MF066912.1, KY883375.1, MF066911.1

شکل ۷- پیش‌بینی ساختار ثانویه مارپیچ D1-D1' سویه‌های 2, 6, 8 *Neowestiellopsis* sp. در مقایسه با سایر سویه‌های مشابه (از وب سرور M-fold، نسخه ۲/۳، دما ۳۷ درجه سلسیوس): A. لوپ انتهایی دوطرفه، B. لوپ دوطرفه میانی، C. لوپ یک‌طرفه، D. لوپ قاعده‌ای.

Fig. 7. Predicted secondary structures for the D1-D1' helices of *Neowestiellopsis* sp. Alborz 2, 6, 8 and the other similar strains. Secondary structures generated from M-fold web server (Ver. 2.3), temperature: 37 °C default; structure: untangled loop fix. Terminal bilateral bulge (A), Bilateral bulge (B), Unilateral bulge (C), Basal clamp (D).



Neowestiellopsis sp. Alborz 6, *Neowestiellopsis* sp. Alborz 2, *Neowestiellopsis* sp. Alborz 8, KF417427.1, MN656995.1, DQ786172.1, DQ786170.1, DQ786173.1, DQ786171.1, KT715745.1, KT715746.1

شکل ۸- پیش‌بینی ساختار ثانویه مارپیچ Box B سویه‌های 2, 6, 8 *Neowestiellopsis* sp. با سایر سویه‌های مشابه (از وب سرور M-fold، نسخه ۲/۳، دما ۳۷ درجه سلسیوس): A. لوپ انتهایی دوطرفه، B. لوپ دوطرفه میانی.

Fig. 8. Predicted secondary structures for the Box B helices of *Neowestiellopsis* sp. Alborz 2, 6, 8 and the other similar strains. Secondary structures generated from M-fold web server (Ver. 2.3), temperature: 37 °C default; structure: untangled loop fix. Terminal bilateral bulge (A), Bilateral bulge (B).

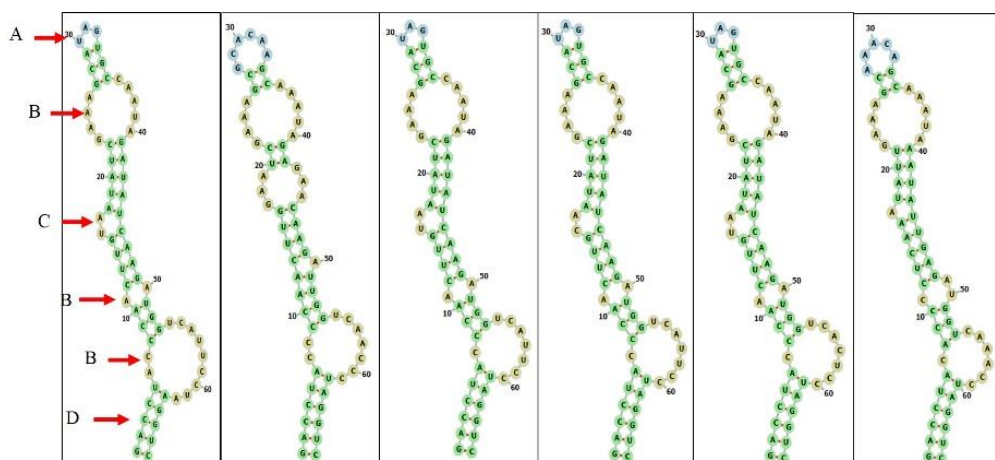
جدول ۹- مقایسه ساختار ثانویه 16S-23S rRNA (مارپیچ D1-D1' و Box-B) بین *Neowestiellopsis* sp. Alborz 2, 6, 8 و سایر سویه‌های مشابه

Table 9. Comparison of secondary structure of 16S-23S rRNA (D1-D1' helix and Box-B helix) between the *Neowestiellopsis* sp. Alborz 2, 6, 8 and the other similar strain

Studied strain and reference strain	D1-D1' helix				BOX B		
	Terminal bilateral bulge (A)	Bilateral bulge (B)	Unilateral bulge (C)	Basal clamp (F)	Terminal bilateral bulge (A)	Bilateral bulge (B)	Unilateral bulge (C)
	No. of nucleotide	No. of loop	No. of loop	No. of nucleotide	No. of nucleotide	No. of nucleotide	No. of nucleotide
<i>Neowestiellopsis</i> sp. Alborz 6	8	1	3	10	13	7	-
<i>Neowestiellopsis</i> sp. Alborz 2	5	3	1	8	13	7	-
<i>Neowestiellopsis</i> sp. Alborz 8	8	2	2	10	13	9	-
KF417427.1: 1104-1661	8	2	2	10	12	7	-
KT715746.1	9	1	1	6	6	16	-
KT715745.1	9	1	1	6	8	15	-
DQ786172.1	5	2	1	22	6	15	-
DQ786170.1	5	2	1	22	6	15	-
DQ786173.1	5	3	2	6	6	-	5
DQ786171.1	5	3	2	6	6	-	5
MN656995.1	8	2	2	10	11	10	-
MF066912.1	8	2	1	4	-	-	-
MF066911.1	10	3	1	10	-	-	-
KY883375.1	10	2	2	8	-	-	-

نوکلئوتید بود (شکل ۹) مقایسه لوپ‌ها در بخش‌های مختلف Box B نشان داد که در بخش BOX B سویه‌های مورد مطالعه و سویه‌های مشابه دارای لوپ دوطرفه ابتدایی با هفت نوکلئوتید بودند. دو سویه مورد مطالعه *Desmonostoc* sp. Alborz 5 و *Desmonostoc* sp. در لوپ دوطرفه دارای ۱۱ نوکلئوتید و سویه‌های مشابه دارای ۱۰ نوکلئوتید بودند (شکل ۱۰ و جدول ۱۰).

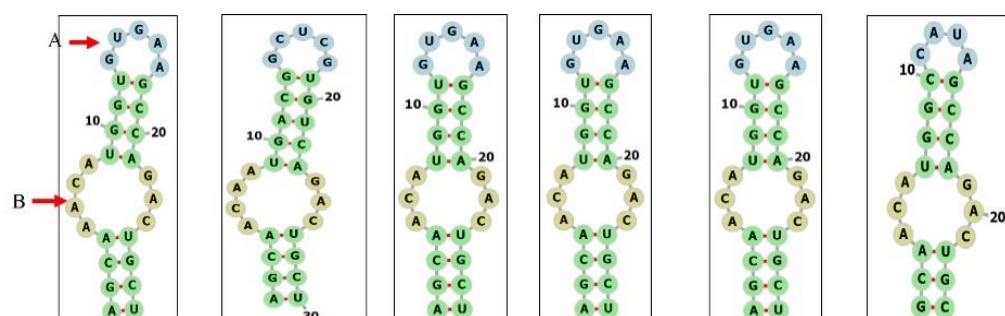
مقایسه لوپ‌ها در بخش‌های مختلف D1-D1' نشان داد که سویه *Desmonostoc* sp. Alborz 5 و سویه‌های مشابه دارای لوپ ابتدایی دوطرفه با پنج نوکلئوتید، اما سویه *Desmonostoc* sp. Alborz 10 هشت نوکلئوتید داشت. همه سویه‌ها دارای سه لوپ دوطرفه و یک لوپ یک‌طرفه بودند. تعداد نوکلئوتیدهای سویه *Desmonostoc* sp. Alborz 5 با دیگر سویه‌ها متفاوت و دارای هشت



Desmonostoc sp. Alborz 5, *Desmonostoc* sp. Alborz 10, KF761565, KX787933.1, KF761564.1, KU161661.1

شکل ۹- پیش‌بینی ساختار ثانویه مارپیچ D1-D1' سویه‌های *Desmonostoc* sp. Alborz 5-10 در مقایسه با سایر سویه‌های مشابه (از وب سرور M-fold، نسخه ۲/۳، دما ۳۷ درجه سلسیوس): A. لوپ انتهایی دوطرفه، B. لوپ دوطرفه میانی، C. لوپ یک‌طرفه، D. لوپ قاعده‌ای.

Fig. 9. Predicted secondary structures for the D1-D1' helices of *Desmonostoc* sp. Alborz 5-10 and the other similar strains. Secondary structures generated from M-fold web server (ver. 2.3), temperature: 37 °C default; structure: untangled loop fix. Terminal bilateral bulge (A), Bilateral bulge (B), Unilateral bulge (C), Basal clamp (D).



Desmonostoc sp. Alborz 5, *Desmonostoc* sp. Alborz 10, KF761565.1, KX787933.1, KF761564.1, KU161661.1

شکل ۱۰- پیش‌بینی ساختار ثانویه مارپیچ Box B سویه‌های *Desmonostoc* sp. Alborz 5-10 با سایر سویه‌های مشابه (از وب سرور M-fold، نسخه ۲/۳، دما ۳۷ درجه سلسیوس): A. لوپ انتهایی دوطرفه، B. لوپ دوطرفه میانی.

Fig. 10. Predicted secondary structures for the Box B helices of *Desmonostoc* sp. Alborz 5-10 and the other similar strains. Secondary structures generated from M-fold web server (Ver. 2.3), temperature: 37 °C default; structure: untangled loop fix. Terminal bilateral bulge (A), Bilateral bulge (B).

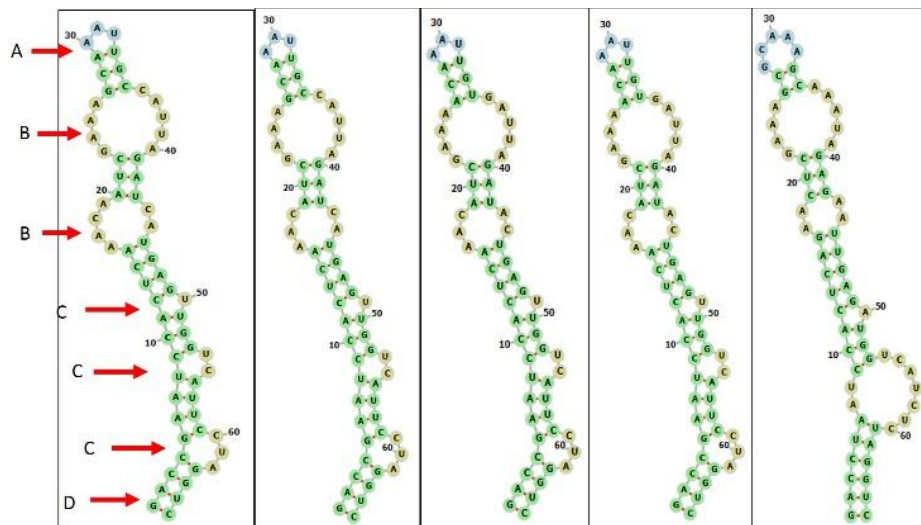
جدول ۱۰- مقایسه ساختار ثانویه 16S-23S rRNA (مارپیچ D1-D1' و Box-B) بین *Desmonostoc* sp. Alborz 5-10 و سایر سویه‌های مشابه

Table 10. Comparison of secondary structure of 16S-23S rRNA (D1-D1' helix and Box-B helix) between the *Desmonostoc* sp. Alborz 5-10 and the other similar strains

Studied strain and reference strain	D1-D1' helix				BOX B		
	Terminal bilateral bulge (A)	Bilateral bulge (B)	Unilateral bulge (C)	Basal clamp (F)	Terminal bilateral bulge (A)	Bilateral bulge (B)	Unilateral bulge (C)
	No. of nucleotide	No. of loop	No. of loop	No. of nucleotide	No. of nucleotide	No. of nucleotide	No. of nucleotide
<i>Desmonostoc</i> sp. Alborz 5	5	3	1	8	7	11	-
<i>Desmonostoc</i> sp. Alborz 10	8	3	1	10	7	11	-
KF761565.1: 808-1478	5	3	1	10	7	10	-
KX787933.1: 1106-1777	5	3	1	10	7	10	-

لوپ‌ها در بخش‌های مختلف Box B نشان داد که سویه مورد مطالعه دارای لوپ دوطرفه ابتدایی با پنج نوکلئوتید که با سایر سویه‌های مشابه متفاوت بود. همه سویه‌ها دارای یک لوپ دوطرفه با هفت نوکلئوتید بودند، اما این لوپ در سویه MH979221.1، دارای ۱۱ نوکلئوتید بود (شکل ۱۲ و جدول ۱۱).

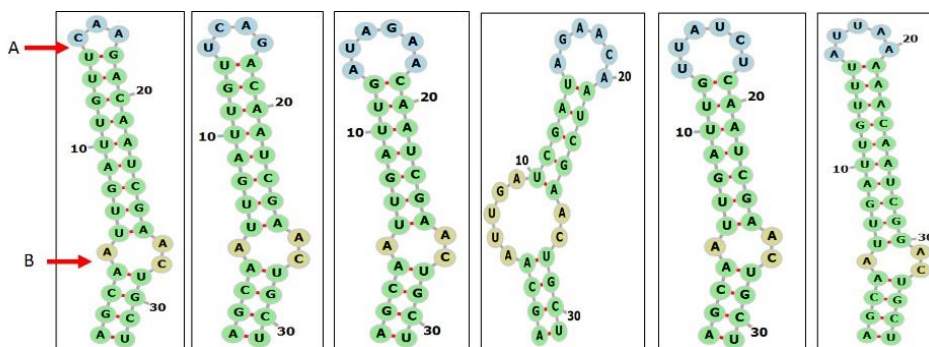
مقایسه لوپ‌ها در بخش‌های مختلف D1-D1' نشان داد که همه سویه‌ها دارای لوپ دوطرفه ابتدایی با پنج نوکلئوتید، اما در سویه AF367159.1، لوپ دوطرفه ابتدایی دارای هفت نوکلئوتید بود. همه سویه‌های مورد بررسی دارای دو لوپ دوطرفه، اما در سویه AF367159.1، سه لوپ دوطرفه وجود داشت (شکل ۱۱). مقایسه



Nodularia sp. Alborz 9, MT488088.1:1457-1888, AF367166.1:1-351, MH979221.1:97-519, AF367159.1

شکل ۱۱- پیش‌بینی ساختار ثانویه مارپیچ D1-D1' سویه *Nodularia* sp. Alborz 9 در مقایسه با سایر سویه‌های مشابه (از وب سرور M-fold، نسخه ۲/۳، دما ۳۷ درجه سلسیوس): A. لوپ انتهایی دوطرفه، B. لوپ دوطرفه میانی، C. لوپ یک‌طرفه، D. لوپ قاعده‌ای.

Fig. 11. Predicted secondary structures for the D1-D1' helices of *Nodularia* sp. Alborz 9 and the other similar strains. Secondary structures generated from M-fold web server (Ver. 2.3), temperature: 37 °C default; structure: untangled loop fix. Terminal bilateral bulge (A), Bilateral bulge (B), Unilateral bulge (C), Basal clamp (D).



Nodularia sp. Alborz 9, MT488088.1, AF367166.1, MH979221.1:97-519, AF367159.1, AY768379.1

شکل ۱۲- پیش‌بینی ساختار ثانویه مارپیچ Box B سویه *Nodularia* sp. Alborz 9 با سایر سویه‌های مشابه (از وب سرور M-fold، نسخه ۲/۳، دما ۳۷ درجه سلسیوس): A. لوپ انتهایی دوطرفه، B. لوپ دوطرفه میانی.

Fig. 12. Predicted secondary structures for the Box B helices of *Nodularia* sp. Alborz 9 and the other similar strains. Secondary structures generated from M-fold web server (Ver. 2.3), temperature: 37 °C default; structure: untangled loop fix. Terminal bilateral bulge (A), Bilateral bulge (B).

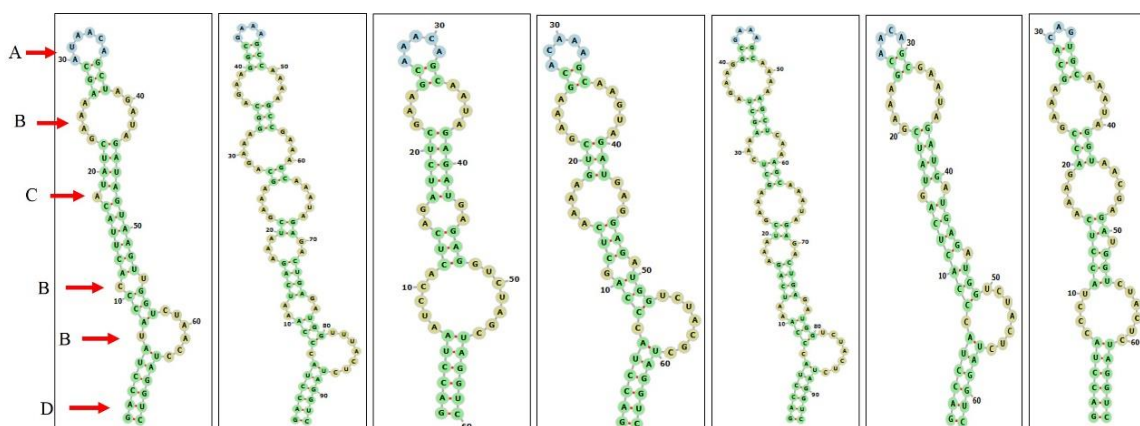
جدول ۱۱- مقایسه ساختار ثانویه 16S-23S rRNA (مارپیچ D1-D1' و Box-B) بین *Nodularia* sp. Alborz 9 و سایر سویه‌های مشابه

Table 11. Comparison of secondary structure of 16S-23S rRNA (D1-D1' helix and Box-B helix) between the *Nodularia* sp. Alborz 9 and the other similar strains

Studied strain and reference strain	D1-D1' helix				BOX B		
	Terminal bilateral bulge (A)	Bilateral bulge (B)	Unilateral Bulge (C)	Basal clamp (F)	Terminal bilateral bulge (A)	Bilateral bulge (B)	Unilateral bulge (C)
	No. of nucleotide	No. of loop	No. of loop	No. of nucleotide	No. of nucleotide	No. of nucleotide	No. of nucleotide
<i>Nodularia</i> sp. Alborz 9	5	2	3	6	5	7	-
MT488088.1: 1457-1888	5	2	3	6	6	7	-
AF367166.1: 1-351	5	2	3	6	8	7	-
MH979221.1: 97-519	5	2	3	6	8	11	-
AF367159.1	7	3	1	10	8	7	-
AY768379.1	-	-	-	-	7	7	-

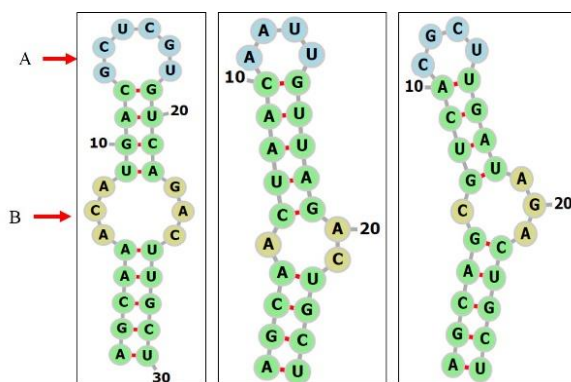
(شکل ۱۳). مقایسه لوپ‌ها در بخش‌های مختلف Box B نشان داد که سویه مورد بررسی دارای لوپ دوطرفه ابتدایی با هشت نوکلئوتید، در حالی که در سویه *Aliinostoc* sp. MK503792.1 و *Aliinostoc morphoplasticum* شش نوکلئوتید وجود داشت (شکل ۱۴ و جدول ۱۲).

مقایسه لوپ‌ها در بخش‌های مختلف D1-D1' نشان داد که همه سویه‌ها دارای لوپ دوطرفه ابتدایی با تعداد نوکلئوتیدهای متفاوت بودند. تعداد لوپ‌های دوطرفه نیز در سویه‌ها متفاوت بود. یک لوپ یک‌طرفه تنها در سویه مورد بررسی و سویه‌های *Aliinostoc* sp. MK503793.1 و *Aliinostoc soli* وجود داشت.



شکل ۱۳- پیش‌بینی ساختار ثانویه مارپیچ D1-D1' سویه *Aliinostoc* sp. Alborz 1 در مقایسه با سایر سویه‌های مشابه (از وب سرور M-fold، نسخه ۲/۳، دما ۳۷ درجه سلسیوس): A. لوپ انتهایی دوطرفه، B. لوپ دوطرفه میانی، C. لوپ یک‌طرفه، D. لوپ قاعده‌ای.

Fig. 13. Predicted secondary structures for the D1-D1' helices of *Aliinostoc* sp. Alborz 1 and the other similar strains. Secondary structures generated from M-fold web server (Ver. 2.3), temperature: 37 °C default; structure: untangled loop fix. Terminal bilateral bulge (A), Bilateral bulge (B), Unilateral bulge (C), Basal clamp (D).



Aliinostoc sp. Alborz 1, *Aliinostoc morphoplasticum*, *Aliinostoc* sp. SA24

شکل ۱۴- پیش‌بینی ساختار ثانویه مارپیچ Box B سویه *Aliinostoc* sp. Alborz 1 با سایر سویه‌های مشابه (از وب سرور M-fold، نسخه ۲/۳، دما ۳۷ درجه سلسیوس): A. لوپ انتهایی دوطرفه، B. لوپ دوطرفه میانی.

Fig. 14. Predicted secondary structures for the Box B helices of *Aliinostoc* sp. Alborz 1 and the other similar strains. Secondary structures generated from M-fold web server (Ver. 2.3), temperature: 37 °C default; structure: untangled loop fix. Terminal Bilateral bulge (A), bilateral bulge (B).

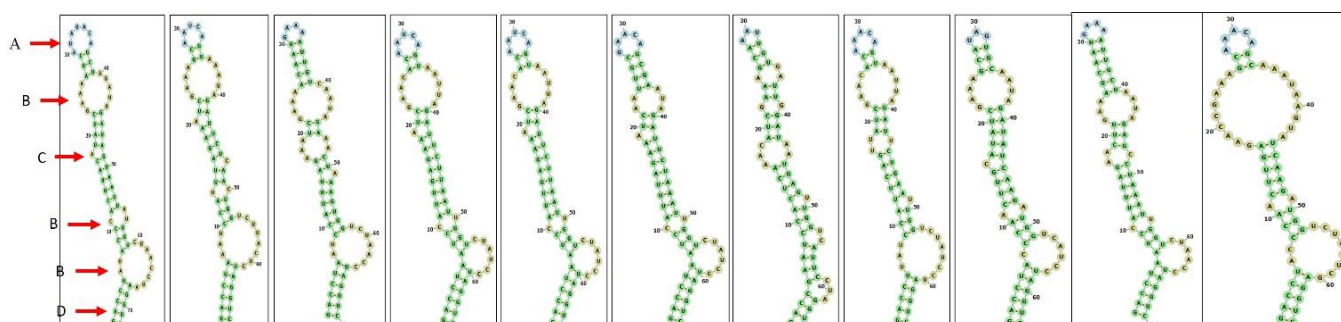
جدول ۱۲- مقایسه ساختار ثانویه 16S-23S rRNA (مارپیچ D1-D1' و Box-B) بین *Aliinostoc* sp. Alborz 1 و سایر سویه‌های مشابه

Table 12. Comparison of secondary structure of 16S-23S rRNA (D1-D1' helix and Box-B helix) between the *Aliinostoc* sp. Alborz 1 and the other similar strains

Studied strain and reference strain	D1-D1' helix				BOX B		
	Terminal bilateral bulge (A)	Bilateral bulge (B)	Unilateral bulge (C)	Basal clamp (F)	Terminal bilateral bulge (A)	Bilateral bulge (B)	Unilateral bulge (C)
	No. of nucleotide	No. of loop	No. of loop	No. of nucleotide	No. of nucleotide	No. of nucleotide	No. of nucleotide
<i>Aliinostoc</i> sp. Alborz 1	8	3	1	10	8	10	-
KY403996.1: <i>A. morphoplasticum</i> NOS	6	6	-	10	6	7	-
MK503791.1: <i>Aliinostoc</i> sp. SA18	7	3	-	10	-	-	-
MH497064.1: <i>A. tiwarii</i> LI PS	7	4	-	10	-	-	-
MK503792.1: <i>Aliinostoc</i> sp. SA24	6	6	-	10	6	8	-
MK503793.1: <i>Aliinostoc</i> sp. SA30	6	3	1	10	-	-	-
MH497065.1: <i>A. soli</i> ZH1	5	3	1	10	-	-	-

مقایسه لوپ‌ها در بخش‌های مختلف D1-D1' نشان داد که همه سویه‌ها دارای لوپ دوطرفه ابتدایی با تعداد نوکلئوتیدهای متفاوت بودند. دو سویه مورد بررسی، سه لوپ دوطرفه داشتند، در حالی که سویه‌های KT290325.1، KT290328.1 و KT290324.1 دارای دو لوپ بودند. سویه *Anabaena* sp. Alborz 4 دارای ۱ لوپ و سویه 3 *Anabaena* sp. Alborz 3 دارای ۱۷ نوکلئوتید بود (شکل ۱۶ و جدول ۱۳).

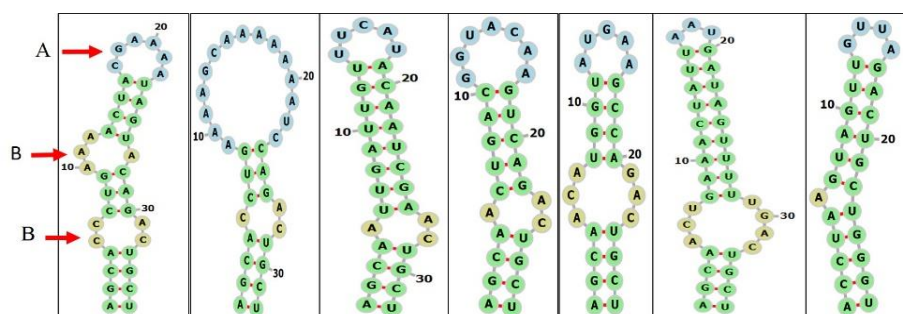
مقایسه لوپ‌ها در بخش‌های مختلف D1-D1' نشان داد که همه سویه‌ها دارای لوپ دوطرفه ابتدایی با تعداد نوکلئوتیدهای متفاوت بودند. دو سویه مورد بررسی، سه لوپ دوطرفه داشتند، در حالی که سویه‌های KT290325.1، KT290328.1 و KT290324.1 دارای دو لوپ بودند. سویه *Anabaena* sp. Alborz 4 دارای ۱ لوپ و سویه 3 *Anabaena* sp. Alborz 3 دارای ۱۷ نوکلئوتید بود (شکل ۱۶ و جدول ۱۳).



Anabaena sp. Alborz 4, *Anabaena* sp. Alborz 3, EU636199.1, KT290325.1, KT290324., KT290328.1, KT290322.1, MT577724.1, HQ846552.1, HQ846551.1, HQ846527.1

شکل ۱۵- پیش‌بینی ساختار ثانویه مارپیچ D1-D1' سویه‌های *Anabaena* sp. Alborz 3-4 در مقایسه با سایر سویه‌های مشابه (از وب سرور M-fold، نسخه ۲/۳، دما ۳۷ درجه سلسیوس): A. لوپ انتهایی دوطرفه، B. لوپ دوطرفه میانی، C. لوپ یک‌طرفه، D. لوپ قاعده‌ای.

Fig. 15. Predicted secondary structures for the D1-D1' helices of *Anabaena* sp. Alborz 3-4 and the other similar strains. Secondary structures generated from M-fold web server (Ver. 2.3), temperature: 37 °C default; structure: untangled loop fix. Terminal bilateral bulge (A), Bilateral bulge (B), Unilateral bulge (C), Basal clamp (D).



Anabaena sp. Alborz 4, *Anabaena* sp. Alborz 3, KT290322.1, MT577724.1, HQ846552.1, HQ846551.1, HQ846550.1

شکل ۱۶- پیش‌بینی ساختار ثانویه مارپیچ Box B سویه‌های *Anabaena* sp. Alborz 3-4 با سایر سویه‌های مشابه (از وب سرور M-fold، نسخه ۲/۳، دما ۳۷ درجه سلسیوس): A. لوپ انتهایی دوطرفه، B. لوپ دوطرفه میانی.

Fig. 16. Predicted secondary structures for the Box B helices of *Anabaena* sp. Alborz 3-4 and the other similar strains. Secondary structures generated from M-fold web server (Ver. 2.3), temperature: 37 °C default; structure: untangled loop fix. Terminal bilateral bulge (A), Bilateral bulge (B).

Neowestiellopsis و *Alborz 5 / Desmonostoc* sp. Alborz 10 جداگانه در کلادهای مشترک دوتایی با شباهت ۷۰ درصدی با *sp. Alborz 8 / Neowestiellopsis* sp. Alborz 2 هم قرار گرفتند. سویه *Nodularia* sp. Alborz 9 در دورترین کلاد قرار گرفت و کمترین قرابت را با سایر نمونه‌ها داشت (شکل ۱۷).

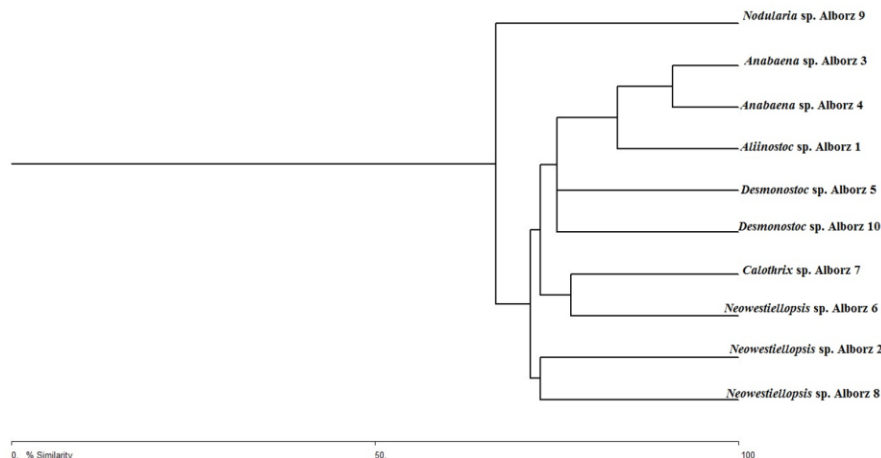
- نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل دندروگرام‌های حاصل از آنالیز توالی‌های پالیندرومی

بررسی نتایج کلاستر STRR نشان داد دو سویه *Anabaena* sp. Alborz 3 / *Anabaena* sp. Alborz 4 با شباهت ۹۰ درصدی با یکدیگر داشتند. سویه *Aliimostoc* sp. Alborz 1 با شباهت ۸۰ درصدی در کلاد مشترکی با این دو قرار گرفت. دو سویه *Desmonostoc* sp.

جدول ۱۳- مقایسه ساختار ثانویه 16S-23S rRNA (مارپیچ D1-D1' و Box-B) بین *Anabaena* sp. Alborz 3-4 و سایر سویه‌های مشابه

Table 13. Comparison of secondary structure of 16S-23S rRNA (D1-D1' helix and Box-B helix) between the *Anabaena* sp. Alborz 3-4 and the other similar strains

Studied strain and reference strain	D1-D1' helix				BOX B		
	Terminal bilateral bulge (A)	Bilateral bulge (B)	Unilateral bulge (C)	Basal clamp (F)	Terminal bilateral bulge (A)	Bilateral bulge (B)	Unilateral bulge (C)
	No. of nucleotide	No. of loop	No. of loop	No. of nucleotide	No. of nucleotide	No. of nucleotide	No. of nucleotide
<i>Anabaena</i> sp. Alborz 4	9	3	1	8	8	16	-
<i>Anabaena</i> sp. Alborz 3	7	3	2	10	17	7	-
EU636199.1: 1345-1833 <i>A. circinalis</i> ACMB13	6	3	1	10	-	-	-
KT290325.1: <i>A. cylindrica</i> PCC 7122	7	2	2	10	-	-	-
KT290324.1: <i>A. inaequalis</i> CCAP 1446/1A	7	2	2	10	-	-	-
KT290328.1: <i>Anabaena</i> sp. SAG 28.79	7	2	2	10	-	-	-
KT290322.1: <i>Anabaena</i> sp. SAG 12.82	5	3	3	6	7	7	-
MT577724.1: <i>Anabaena</i> sp. It 4	7	3	1	8	9	7	-
HQ846552.1: <i>Anabaena</i> sp. A7	5	3	1	10	7	10	-
HQ846551.1: <i>A. iyengarii</i> RPAN70	6	3	1	10	5	11	-
HQ846527.1: <i>A. oscillarioides</i> RPAN4	7	3	-	8	-	-	-
HQ846550.1: <i>A. oscillarioides</i> RPAN69	-	-	-	-	6	-	5

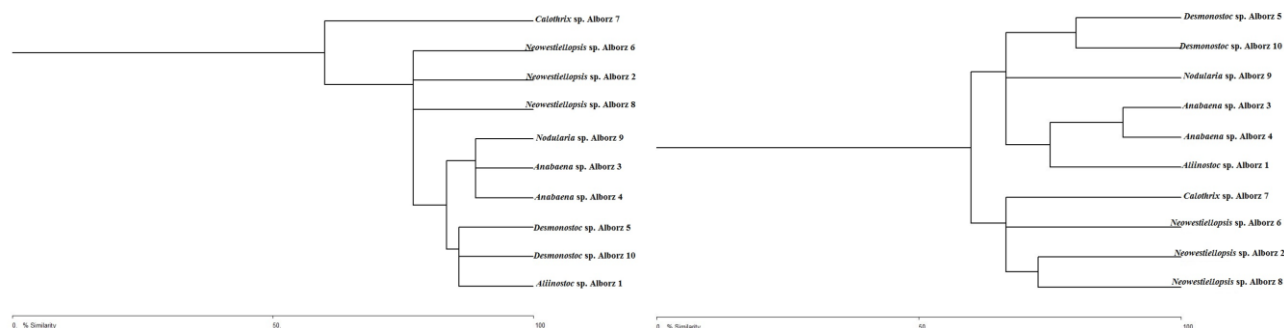


شکل ۱۷- دندروگرام مرکب براساس پروفایل تکثیر پرایمر STRR1a.

Fig. 17. Composite dendrogram based on the STRR1a primer amplification profile.

قربان کمتری نسبت به سایر نمونه‌ها داشتند. طبق شکل ۱۸ (سمت چپ)، نتایج پرایمر HIP CA نشان داد که *Anabaena* sp. Alborz 3 / *Anabaena* sp. Alborz 4 و *Aliinostoc* sp. Alborz 1 شباهت ۹۰ درصدی با یکدیگر دارند. سه سویه *Desmonostoc* sp. Alborz 5، *Desmonostoc* sp. Alborz 10 و *Aliinostoc* sp. Alborz 1 با شباهت ۸۵ درصدی در یک کلاسه مشترک با یکدیگر قرار گرفتند. همچنین، سه سویه *Neowestiellopsis* sp. Alborz 6، *Neowestiellopsis* sp. Alborz 2 و *Neowestiellopsis* sp. Alborz 8 با شباهت ۸۰ درصدی در یک کلاسه مشترک قرار گرفتند. سویه *Calothrix* sp. Alborz 7 در فاصله دورتر و قربان کمتری نسبت به سایر نمونه‌ها داشت.

بررسی نتایج کلاستر HIP AT مطابق شکل ۱۸ (سمت راست) نشان داد دو سویه *Anabaena* sp. Alborz 3 / *Anabaena* sp. Alborz 4 شباهت ۹۰ درصدی با یکدیگر دارند. سویه *Aliinostoc* sp. Alborz 1 با شباهت ۸۰ درصدی در کلاسه مشترکی با این دو قرار گرفت. دو سویه *Desmonostoc* sp. Alborz 5 / *Desmonostoc* sp. Alborz 10 در یک کلاسه مشترک با شباهت ۸۰ درصدی و *Neowestiellopsis* sp. Alborz 2 / *Neowestiellopsis* sp. Alborz 8 در کلاسه مشترک با شباهت ۷۵ درصدی با هم قرار گرفتند. سویه *Nodularia* sp. Alborz 9 و *Calothrix* sp. Alborz 7 و *Neowestiellopsis* sp. Alborz 6 در فاصله دورتر و

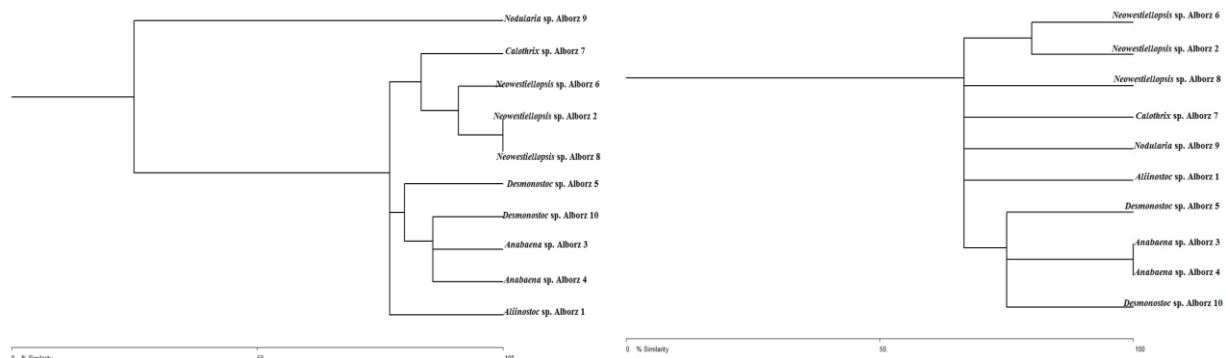


شکل ۱۸- دندروگرام مرکب براساس پروفایل تکثیر پرایمرهای HIP-CA (سمت چپ) و HIP-AT (سمت راست).

Fig. 18. Composite dendrograms based on the HIP-CA (left) and HIP-AT (right) primers amplification profile.

نتایج کلاستر HIP GC براساس شکل ۱۹ (سمت راست) نشان داد دو سویه *Anabaena sp. Alborz 3* / *Anabaena sp. Alborz 4* با یکدیگر شباهت ۱۰۰ درصدی داشت و دو سویه *Desmonostoc sp. Alborz 5* / *Desmonostoc sp. Alborz 10* شباهت ۷۵ درصدی در یک کلاد مشترک با آن‌ها قرار گرفتند. دو سویه *Neowestiellopsis sp. Alborz 2* / *Neowestiellopsis sp. Alborz 6* با شباهت ۸۰ درصدی با یکدیگر در یک کلاد مشترک و سویه *Neowestiellopsis sp. Alborz 8* در فاصله دورتری از آن‌ها قرار گرفت.

نتایج پرایمر HIP TG طبق شکل ۱۹ (سمت چپ) نشان داد که دو سویه *Neowestiellopsis sp. Alborz 2* / *Neowestiellopsis sp. Alborz 8* شباهت ۱۰۰ درصدی به یکدیگر داشتند و سویه *Neowestiellopsis sp. Alborz 6* با قرابت ۹۰ درصدی با آن‌ها در یک کلاد مشترک قرار گرفت. سه سویه *Anabaena sp. Alborz 4* / *Desmonostoc sp. Alborz 10* و *Anabaena sp. Alborz 3* با یکدیگر در یک کلاد مشترک و سویه *Desmonostoc sp. Alborz 5* در فاصله دورتری از آن‌ها قرار گرفت. سویه *Nodularia sp. Alborz 9* دارای قرابت کمتر از ۵۰ درصد در دورترین کلاد از سایر سویه‌ها بود.



شکل ۱۹- دندروگرام مرکب براساس پروفایل تکثیر پرایمرهای HIP-TG (سمت چپ) و HIP-GC (سمت راست).

Fig. 19. Composite dendrograms based on the HIP-TG (left) and HIP-GC (right) primers amplification profile.

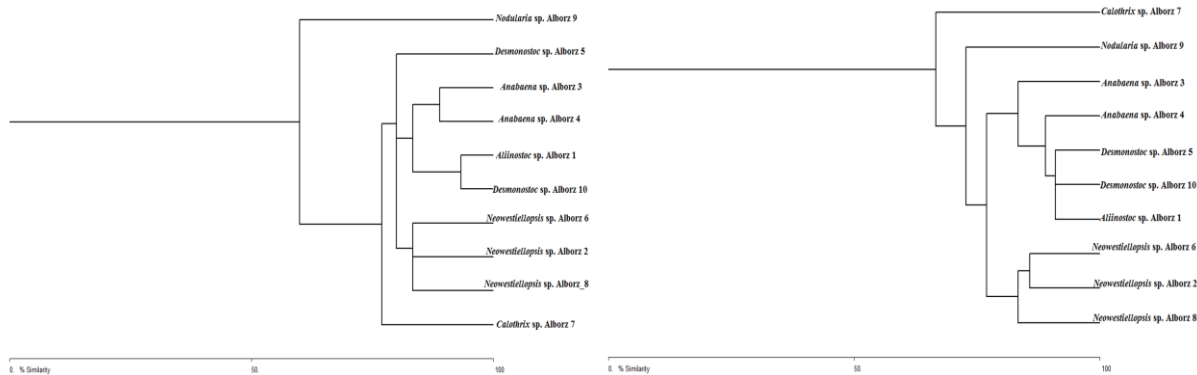
Nodularia sp. Alborz 9 در فاصله دورتر و قرابت کمتری نسبت به سایر نمونه‌ها داشت.

نتایج کلاستر ERIC A براساس شکل ۲۰ (سمت راست) نشان داد که سه سویه *Desmonostoc sp. Alborz 5* / *Desmonostoc sp. Alborz 10* و *Aliinostoc sp. Alborz 1* با شباهت ۹۰ درصدی در یک کلاد مشترک با یکدیگر و دو سویه *Anabaena sp. Alborz 3* / *Anabaena sp. Alborz 4* دورتری با آن‌ها قرار گرفتند. دو سویه

نتایج کلاستر ERIC A براساس شکل ۲۰ (سمت چپ) نشان داد که *Desmonostoc sp. Alborz 10* و *Aliinostoc sp. Alborz 1* با شباهت ۹۰ درصدی و دو سویه *Anabaena sp. Alborz 3* / *Anabaena sp. Alborz 4* هرکدام در یک کلاد مشترک با هم قرار گرفتند. سه سویه *Neowestiellopsis sp. Alborz 8* / *Neowestiellopsis sp. Alborz 2* با قرابت ۸۰ درصدی با یکدیگر در یک کلاد قرار گرفتند. سویه

کمی دورتر از آن‌ها قرار داشت. سویه 7 *Calothrix* sp. Alborz در فاصله دورتر و قرابت کمتری نسبت به سایر نمونه‌ها داشت.

Alborz 2 و *Neowestiellopsis* sp. Alborz با قرابت ۸۰ درصدی در یک کلاذ و سویه 8 *Neowestiellopsis* sp. Alborz در فاصله



شکل ۲۰- دندروگرام مرکب بر اساس پروفایل تکثیر پرایمرهای ERIC1A (سمت چپ) و ERIC1B (سمت راست).

Fig. 20. Composite dendrograms based on the ERIC1A (left) and ERIC1B (right) primers amplification profile.

بحث

سویه‌های سیانوباکتری‌ها و مشکلات به وجود آمده در فیلوژنی مولکولی آن‌ها، دانشمندان را بر آن داشت تا از روش‌های مولکولی و براساس ماگرهای ژنی متمرکز بر توالی‌های ژنتیکی استفاده کنند، چراکه بسیاری از ویژگی‌های ریخت‌شناختی به مقدار زیاد به وسیله محیط تغییرپذیر است و به صورت مشخص به عنوان ویژگی‌های تاکسونومیک قابل اطمینان نیستند (Whitton 1992). طبق برآوردهای صورت گرفته، درصد زیادی از سویه‌های سیانوباکتریایی موجود در سراسر جهان به اشتباه شناسایی و تشخیص داده شده‌اند که در نتیجه منجر به ثبت گزارش‌های نادرست گردیده است. استفاده از توالی‌های DNA امکان استنباط فیلوژنی موجودات را می‌دهد که در واقع، توالی‌های DNA در مقایسه با بسیاری از ویژگی‌های ریخت‌شناختی کمتر تأثیرپذیرند (Komárek 2016).

کبیرنتاج و همکاران (Kabirntaj *et al.* 2020) به توصیف گونه‌های جدید *Desmonostoc* و *Desikacharya*، *Aliinostoc* با روش پلی‌فازیک پرداختند. پنج سویه سیانوباکتریایی با ریخت‌شناسی شبیه به *Nostoc* از مناطق مختلف استان مازندران جدا شدند و با روش پلی‌فازیک مورد ارزیابی قرار گرفتند. سه گونه به کلاذ *Aliinostoc* و دو سویه دیگر به *Desmonostoc* و *Desikacharya* تعلق داشتند. اما با توجه به موقعیت فیلوژنتیکی و آنالیز ژن 16S-23S و ساختار ثانویه ITS، هر پنج گونه مورد مطالعه، جدید بودند و مطابق با کد بین‌المللی نام‌گذاری جلبک‌ها و قارچ‌ها و گیاهان نام‌گذاری شدند. کاسماتا و همکاران (Casamatta *et al.* 2005) نشان دادند که ساختار ثانویه مناطق محافظت شده

تنوع ریختی سیانوباکتری‌ها در محیط کشت، مشکل‌های فراوانی را در زمینه تاکسونومی آن‌ها ایجاد کرده است (Anand 2019). بررسی روی ایزوله‌ها در محیط کشت‌های مختلف با استفاده از کلیدهای شناسایی کلاسیک که شامل توصیف کلیدهای دوتایی و شکل‌های انواع نمونه است، مشکل‌های فراوانی را به علت ایجاد تنوع در طول آزمایش و عدم ثبات بعضی از ویژگی‌هایی که برای شناسایی استفاده می‌شود، ایجاد کرده است. به عنوان مثال، در تحقیقی شناسایی سویه‌های مختلف *Anabaena* توسط محققان مختلف براساس معیارهای ریخت‌شناختی منجر به شناسایی با نام‌های متفاوت گردید. ابتدا تصور آن‌ها این بود که شاید شرایط کشت متفاوت منجر به شناسایی‌های متفاوت می‌شود، اما نتایج آزمایش‌های دیگر نشان داد که سویه‌های متفاوتی از گونه‌های *Nostoc* نیز در محیط کشت‌های مشابه و شرایط کشت کاملاً یکسان توسط دو محقق به طور کاملاً متفاوت شناسایی شدند (Stein 1973, Allen *et al.* 1995).

بسیاری از شناسایی‌های متکی بر تنها ویژگی‌های ریخت‌شناختی، بیشتر مواقع خیلی سطحی و به طور ناصحیح انجام می‌شود و موجب بروز خطاهای زیاد در تحقیق‌های آزمایشگاهی می‌شود (Komárek 2009). تحقیق‌های جدید نشان می‌دهد که تاکسونومی صحیح باید ترکیبی از ویژگی‌های ریخت‌شناسی نمونه‌ها با روش‌های چندفازی شامل اطلاعات فنوتیپیک، کموتاکسونومیک و ژنوتیپی باشد. بنابراین، واریاسیون ریخت‌شناختی در میان

ITS نشان داده شد که سویه 4 *Anabaena* sp. Alborz دارای یک *tRNA* است و ناحیه V3 ندارد، اما سویه 3 *Anabaena* sp. Alborz دارای دو *tRNA* و ناحیه V3 است. سه سویه *Neowestiellopsis* sp. Alborz 2، *Neowestiellopsis* sp. Alborz 6 و *Neowestiellopsis* sp. Alborz 8 هر سه دارای ناحیه V3 و دو *tRNA* بودند، اما تعداد نوکلئوتیدهای آن‌ها با یکدیگر تفاوت داشت. گنزالس و همکاران (González-Resendiz *et al.* 2018) به بررسی ریخت‌شناختی و فیلوژنتیکی سیانوباکتری‌های جدا شده از سواحل سنگی اقیانوس آرام پرداختند. براساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی مانند هتروسیت‌های داخلی و انشعابات کاذب، این جمعیت به جنس *Brasilonema* تعلق داشت، اما در برخی از ویژگی‌های دیگر مانند اندازه هتروسیت در مقایسه با *Brasilonema* متفاوت بود. بررسی توالی ژن 16S rRNA و ITS نشان داد که این جمعیت با وجود این که ویژگی ریخت‌شناختی آن با نوع تیپیک تفاوت داشت، متعلق به تیره *Rivulariaceae* است. در نتیجه یک جنس جدید به نام *Nunduva fasciculata* gen. nov. و چهار نوع معرفی گردید. رسم ساختار ثانویه ITS در بخش D1-D1' نشان داد که تنها در لوپ ابتدایی تفاوت داشتند و همه توالی‌ها در لوپ یک‌طرفه انتهایی مشابه بودند. در این مطالعه نیز، دو سویه 5 *Desmonostoc* sp. Alborz و 10 *Desmonostoc* sp. Alborz تنها در لوپ ابتدایی بخش D1-D1' تفاوت داشتند، اما سویه 9 *Nodularia* sp. Alborz با سویه‌های مشابه خود تنها در تعداد نوکلئوتید پایه انتهایی متفاوت بود و در تعداد نوکلئوتید BOX B نیز تفاوت داشتند.

ریوندی و همکاران (Rivandi *et al.* 2021)، به بررسی‌های ریخت‌شناختی و فیلوژنی سویه سمی خالص‌سازی شده از آب دریاچه لواسان، با استفاده از مارکرهای ژنی 16S rRNA و ITS پرداختند. براساس نتایج به دست آمده از درخت فیلوژنی رسم شده مبتنی بر ژن 16S rRNA، سویه‌های غیرسمی با سویه سمی *Anabaena* sp. B3 (CCC B3) درون یک کلاد خوشه‌بندی نشدند. نتایج حاصل از آنالیز ژن ITS با استفاده از Mfold نشان داد که مهم‌ترین تفاوت سویه سمی *Anabaena* sp. B3 با سایر سویه‌های غیرسمی *Anabaena* sp.، تعداد نوکلئوتیدهای لوپ انتهایی دوطرفه و تعداد لوپ‌های دوطرفه میانی در مارپیچ D1-D1' است. این در حالی است که ساختمان مارپیچ Box B در هیچ‌کدام از سویه‌ها تفاوتی نداشت. در این مطالعه نیز دو سویه *Desmonostoc* sp. Alborz 10 و *Desmonostoc* sp. Alborz 5

می‌تواند برای طبقه‌بندی مفید باشند. این ژن در بسیاری از آنالیزهای فیلوژنتیکی سیانوباکتریایی به طور وسیع استفاده می‌شوند. از آنجا که این مناطق نه تنها نقش اساسی در سنتز پروتئین و کل فعالیت‌های سلول ندارند، بلکه در طول زمان تغییرهای بسیار کمی یافتند. ساختمان ثانویه ژن‌های RNA ریبوزومی بسیار محافظت شده است. آنالیزهای فیلوژنتیکی بر پایه مارکرهای مولکولی، به ویژه 16S rRNA پایه‌ای برای سازماندهی دوباره برخی از تیره‌های سیانوباکتری‌ها بوده است (Casamatta *et al.* 2005). در مطالعه حاضر، از دو مارکر ژنتیکی 16S rRNA و ITS برای شناسایی سویه‌ها انتخاب و با روش Iq tree web server درخت فیلوژنتیکی رسم گردید که در نتیجه سویه‌های مشابه با حمایت بالای بوت استرپ در یک کلاد مشترک قرار گرفتند.

در مطالعه‌ای توسط سیهونن و همکاران (Sihvonon *et al.* 2007) از توالی ژن 16S rRNA برای تفکیک جنس‌های مختلف استفاده کردند؛ به این ترتیب که از بررسی ۴۲ کشت سیانوباکتریایی متعلق به جنس‌های *Rivularia*، *Calothrix*، *Gloeotrichia* و *Tolypothrix* که از لحاظ ریخت‌شناختی مشابه بودند دریافتند که *Calothrix*، *Gloeotrichia* و *Tolypothrix* یک گروه منوفیلیتیک را تشکیل نمی‌دهند و دارای تنوع ژنتیکی زیادی هستند. نتایج این تحقیق نشان داد که مارکر ژنی 16S rRNA، برای تفکیک جنس‌های سیانوباکتری کارآیی لازم را دارد.

مولستینو و همکارانش (Muhlsteinova *et al.* 2014) از توالی ژن 16S-23S ITS به عنوان مارکر مولکولی برای طبقه‌بندی سیانوباکتری‌های موجود در بیابان استفاده کردند و منجر به معرفی سویه جدیدی به نام *Trichocoleus desertorum* sp. nov. شد. به طبقه‌بندی سیانوباکتری‌های موجود در بیابان علیرغم نقش مهمی که در اکوسیستم دارند، کمتر توجه شده است، این مطالعه نشان داد که تفاوت در اپران ITS می‌تواند بر ساختار ثانویه اثر بگذارد. مقایسه اپران‌هایی که اصلاً ژن *tRNA* نداشتند نسبت به اپرانی با دو ژن *tRNA*، ساختار ثانویه خاص و متفاوتی را نشان دادند. بنابراین، باید اپران‌هایی که تعداد *tRNA* یکسانی دارند با یکدیگر مقایسه شوند؛ اگرچه ممکن است در اپران‌هایی با الگوی یکسان نیز تفاوت وجود داشته باشد. سه سویه که دارای شباهت کمی در منطقه 16S rRNA با یکدیگر و دیگر سویه‌های *T. desertorum* بودند درون یک کلاستر قرار گرفتند. هر سه سویه ناحیه V2 نداشتند که می‌توان گفت این عدم حضور V2 در قرارگیری آن‌ها در یک کلاستر نقش دارد و ویژگی مشخص این سه سویه است. در این مطالعه، با بررسی ساختار

ساختار ثانویه 16S-23S ITS نشان داد که سویه *Alborzica* در مقایسه با *Dulcicalothrix* دارای ساختار منحصر به فرد است. در این مطالعه نیز دو ژن 16S rRNA و ITS بررسی شد و دندروگرام‌ها نتایج درخت فیلوژنتیکی را تایید کردند. به علاوه، تحقیقات زیادی در زمینه شناسایی جنس‌ها و گونه‌های جدید با استفاده از ژن‌های ساختاری و عملکردی انجام شده است. به عنوان مثال، نوروزی و سارز (Nowruzi & Soares 2021) موفق به معرفی جنس جدید *Alborzia kermanshahica* gen. nov. جدا شده از مزارع استان کرمانشاه شدند. این شناسایی با استفاده از ژن مارکرهای 16S rRNA-23S ITS و MCY انجام گردید.

مطالعات بسیاری آشکار ساخته است که استفاده از مارکرهای مولکولی به دلیل حفظ ساختار در طول تکامل در بررسی‌های فیلوژنی و تنوع ژنتیکی سیانوباکتری‌های هتروسیت‌دار، کاربرد زیادی دارند. بنابراین، در تحقیق حاضر، با استفاده از یک سری از ژن‌های ساختمانی و عملکردی به عنوان مارکرهای مولکولی، به ارزیابی فیلوژنی مولکولی ده سیانوباکتری پرداخته شد. شکرایی و همکاران (Shokraei et al. 2019)، با استفاده از یک رویکرد پلی‌فازی، تفاوت در ویژگی‌های ریخت‌شناختی و ژنوتیپی گونه‌های مختلف مورد بررسی قراردادند. آن‌ها نخستین تحقیق را در مورد اثر انگشت‌نگاری ژنومی مستند از هفت سویه سیانوباکتری مشابه هم را در ایران با استفاده از سه نوع توالی پالیندرومی ERIC، HIP و STRR به عنوان مارکر مولکولی انجام دادند. همچنین، با استفاده از تکنیک انگشت‌نگاری STRR-PCR، اطلاعات جدیدی در زمینه تاکسونومی سیانوباکتری‌ها در *Azolla* به دست می‌آید که حصول این نتایج از طریق روش‌های طبقه‌بندی دیگر مشکل‌تر است. روش انگشت‌نگاری PCR ممکن است وسیله‌ای برای ارزیابی مطالعات تنوع و طبقه‌بندی سیانوباکتری‌های هم‌زیست با *Azolla* و تکامل بین سیانوباکتری‌ها و میزبانان مربوطه باشد. روش مذکور همچنین، برای تاکسونومی *Azolla* نیز بسیار مفید است (Thajuddin et al. 2010).

همان‌طور که قبلاً نیز اشاره شد، تاکسونومی صحیح می‌بایست ترکیبی از ویژگی‌های ریخت‌شناسی نمونه‌ها با روش‌های چندفازی شامل اطلاعات فنوتیپیک، کموتاکسونومیک و ژنوتیپی باشد. بسیاری از ویژگی‌های ریخت‌شناختی به مقدار زیادی به وسیله محیط تغییرپذیر است و به صورت مشخص به عنوان ویژگی‌های تاکسونومیک قابل اطمینان نیستند. استفاده از توالی‌های DNA، امکان استنباط فیلوژنی موجودات را می‌دهد. استفاده از دو مارکر

لوپ ابتدایی بخش 'D1-D1 تفاوت داشتند. این در حالی است که ساختمان مارپیچ Box B آن‌ها با یکدیگر تفاوتی نداشت.

نوروزی همکاران (Nowruzi et al. 2018) با رویکرد پلی‌فازیک، به بررسی تفاوت‌های ویژگی‌های ریخت‌شناختی و ژنوتیپی دوسویه سیانوباکتری جدا شده از مناطق مختلف کشاورزی و آب‌های شیرین استان کرمانشاه پرداختند. در واقع، شناسایی و طبقه‌بندی هر دو *Calothrix* sp. N42 و *Scytonema* sp. N11 مشکل‌ساز و گیج‌کننده بود. چالش‌ها زمانی به وجود آمد که از منظر ریخت‌شناختی، به نظر می‌رسید این دو سویه *Calothrix* هستند، زیرا رشته‌های اولیه بدون انشعاب، باریک بودند، اما با رشد بیشتر، با انجام آنالیز مولکولی، شاخه‌ها نیز به وجود آمدند. نتایج حاصل از تعیین توالی قطعه 16S rRNA و مقایسه فیلوژنتیکی نشان داد که دو سویه در خوشه‌های مختلف فیلوژنتیکی قرار می‌گیرند که به عنوان *Calothrix* sp. N42 و *Scytonema* sp. N11 نام‌گذاری شدند. اُسرئو و همکاران (Osorio-Santos et al. 2014) سویه *Oculatella* را جداسازی، توالی‌یابی و آنالیز کردند. آنالیز فیلوژنتیکی براساس ژن 16S rRNA و اپران‌های ITS صورت گرفت. تفاوت در ساختار ثانویه منطقه محافظت شده ITS و همچنین فاصله p در ITS منجر به طبقه‌بندی گونه مجزا شد و هفت گونه جدید معرفی شد. آنالیز منطقه ITS در هفت گونه *Oculatella* نشان داد که با بیشتر *Pseudanabaenales* مشابه است و حداقل دو اپران دارد که یکی دو tRNA و دیگری tRNA ندارد. مارپیچ‌ها در اپران‌های مختلف ساختارهای مشابهی داشتند. ساختمان مارپیچ 'D1-D1 بیشترین شباهت را در همه *Oculatella* ها به جز در *O. kauaiensis* داشت. در این مطالعه نیز، سویه *Calothrix* sp. Alborz 7 هر دو tRNA در آن حذف شده بود، در حالی که سویه‌های مشابه دارای دو tRNA بودند، اما در سویه *Alborz 1 Aliinostoc* sp. هر دو tRNA حفظ شده و در سویه‌های مشابه حذف گردیده‌اند.

نوروزی و شالگین (Nowruzi & Shalygin 2021) موفق به شناسایی یک سویه جدید سیانوباکتری به نام *Dulcicalothrix alborzica* sp. nov. جدا شده از مزارع استان کرمانشاه شدند. این شناسایی با استفاده از ژن مارکرهای rbcL، rpoC1 و 16S-23S ITS انجام گردید. بررسی‌های ریخت‌شناختی نشان داد که این سویه متعلق به جنس *Calothrix* است، اما آنالیز ژن 16S rRNA نشان داد که در کلاستر *Dulcicalothrix* قرار دارد. برای تایید طبقه‌بندی این سویه جدید از مارکرهای rbcL و rpoC1 نیز استفاده شد و نتایج سویه جدید *Alborzica* براساس ژن 16S rRNA را تایید کرد. آنالیز

مفیدند و می‌توانند به عنوان یک کلید تشخیص برای تمایز بین سیانوباکتری‌ها و شناسایی آن‌ها در مناطق مختلف زیستی و آب و هوایی و جغرافیایی استفاده شوند. دندروگرام‌هایی که در این مطالعه تهیه شد، نتایج فیلوژنی حاصل از ژن 16S rRNA را تایید کردند که این امر استفاده از دو مارکر ژنتیکی 16S rRNA و ITS و توالی‌های تکرار شونده پشت سرهم را به عنوان مارکرها برای مولکولی برای ارزیابی تنوع سویه‌های سیانوباکتری تایید می‌کند.

References

- Allen, M.M. & Arnon, D.I. 1955. Studies on nitrogen-fixing blue green algae. I. Growth and nitrogen fixation by *Anabaena cylindrica* Lemm. *Plant Physiology* 30: 366–372.
- Anand, N., Thajuddin, N. & Dadheech, P.K. 2019. Cyanobacterial Taxonomy: Morphometry to Molecular Studies. Chapter 3. Pp. 43–64. *In*: Mishra, A.K., Tiwari, D.N. & Rai, A.V. (eds), *Cyanobacteria*. Academic Press.
- Cai, F., Yang, Y., Wen, Q. & Li, R. 2018. *Desmonostoc danxiaense* sp. nov. (Nostocales, Cyanobacteria) from Danxia mountain in China based on polyphasic approach. *Phytotaxa* 367(3): 233–244.
- Casamatta, D.A., Johansen, J.R., Vis, M.L. & Broadwater, S.T. 2005. Molecular and morphological characterization of ten polar and near-polar strains within the Oscillatoriales (Cyanobacteria) 1. *Journal of Phycology* 41(2): 421–438.
- Castenholz, R.W. 2001. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Ed. The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria. Springer-Verlag, NY.
- De Bruijn, F.J. 1992. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 58(7): 2180–2187.
- Driscoll, C.B., Meyer, K.A., Šulčičius, S., Brown, N.M., Dick, G.J., Cao, H., Gasiūnas, G., Timinskas, A., Yin, Y., Landry, Z.C. & Otten, T.G. 2018. A closely-related clade of globally distributed bloom-forming cyanobacteria within the Nostocales. *Harmful Algae* 1(77): 93–107.
- Fiore, M.F., Moon, D.H., Tsai, S.M., Lee, H. & Trevors, J.T. 2000. Miniprep DNA isolation from unicellular and filamentous cyanobacteria. *Journal of Microbiological Methods* 39(2): 159–169.
- González-Resendiz, L., Johansen, J.R., Escobar-Sánchez, V., Segal-Kischinevzky, C., Jiménez-García, L.F. & León-Tejera, H. 2018. Two new species of *Phyllonema* (Rivulariaceae, Cyanobacteria) with an emendation of the genus. *Journal of Phycology* 54(5): 638–652.
- Iteman, I., Rippka, R., de Marsac, N.T. & Herdman, M. 2000. Comparison of conserved structural and regulatory domains within divergent 16S rRNA-23S rRNA spacer sequences of cyanobacteria The GenBank accession numbers for the sequences reported in this paper are AF180968 and AF180969 for ITS-L and ITS-S, respectively. *Microbiology* 146(6): 1275–1286.
- Kabirnatay, S., Nematzadeh, G.A., Talebi, A.F., Saraf, A., Suradkar, A., Tabatabaei, M. & Singh, P. 2020. Description of novel species of *Aliinostoc*, *Desikacharya* and *Desmonostoc* using a polyphasic approach. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 70(5): 3413–3426.

ژنتیکی 16S rRNA و ITS برای شناسایی سویه‌ها و رسم درخت فیلوژنتیکی نشان داد که سویه‌های مشابه با حمایت بالای بوت استرپ در یک کلاد مشترک قرار گرفتند. به علاوه، از مطالعه حاضر نتیجه گرفته می‌شود که توالی‌های تکراری یافت شده در ژنوم سیانوباکتری‌ها به ویژه توالی‌های پالیندرومی تکراری HIP به همراه توالی‌های STRR و ERIC و 16S rRNA-23S ITS در کشف ارتباطات ژنومی و تعیین نوع در میان سویه‌های مورد مطالعه بسیار

- Komárek, J. 2013. Süßwasserflora von mitteleuropa, Bd. 19/3: cyanoprokaryota. 3. Teil/3rd part: heterocytous genera. Süßwasserflora von Mitteleuropa. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Komárek, J. 2016. A polyphasic approach for the taxonomy of cyanobacteria: principles and applications. *European Journal of Phycology* 51(3): 346–353.
- Komárek, J., Kaštovský, J., Mareš, J. & Johansen, J.R. 2014. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. *Preslia* 86(4): 295–335.
- Komárek, J. 2020. Quo vadis, taxonomy of cyanobacteria (2019). *Fottea* 20(1): 104–110.
- Kotai, J. 1972. Instructions for preparation of modified nutrient solution Z8 for algae. *Norwegian Institute for Water Research, Oslo* 11(69): 5–15.
- Liu, L., Jokela, J., Wahlsten, M., Nowruzi, B., Permi, P., Zhang, Y.Z., Xhaard, H., Fewer, D.P. & Sivonen, K. 2014. Nostosins, trypsin inhibitors isolated from the terrestrial cyanobacterium *Nostoc* sp. strain FSN. *Journal of Natural Products* 77(8): 1784–1790.
- Muhlsteinova, R., Johansen, J.R., Pietrasiak, N., Martin, M.P., Osorio-Santos, K. & Warren, S.D. 2014. Polyphasic characterization of *Trichocoleus desertorum* sp. nov. (Pseudanabaenales, Cyanobacteria) from desert soils and phylogenetic placement of the genus *Trichocoleus*. *Phytotaxa* 163(5): 241–261.
- Moreira, C., Martins, J., Vasconcelos, V. & Antunes, A. 2020. Genomics Perspectives on Cyanobacteria Research. *In: Handbook of Algal Science. Technology and Medicine* 1(3): 147–159.
- Negi, Y., Sharma, S., Sutradhar, N. & Adhikari, S. 2019. A study on the differentiation of filamentous cyanobacterial isolates using DNA fingerprinting approach, *Indian Journal of Biotechnology* 4(9): 151–163.
- Nowruzi, B., Fahimi, H. & Ordodari, N. 2018. Molecular phylogenetic and morphometric evaluation of *Calothrix* sp. N42 and *Scytonema* sp. N11. *Rostaniha* 18(2): 210–221.
- Nowruzi, B. & Soares, F. 2021. *Alborzia kermanshahica* gen. nov., sp. nov. (Chroococcales, Cyanobacteria), isolated from paddy fields in Iran. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 71(6): 1–13.
- Nowruzi, B. & Shalygin, S. 2021. Multiple phylogenies reveal a true taxonomic position of *Dulcicalothrix alborzica* sp. nov. (Nostocales, Cyanobacteria). *Fottea* 21(2): 235–246.
- Nowruzi, B. 2020. Culturing of Aquatic and terrestrial cyanobacteria. *Research in Karyotic Cell and Tissue* 1(1): 34–44.
- Nowruzi, B. & Blanco, S. 2019. In silico identification and evolutionary analysis of candidate genes involved in the biosynthesis methylproline genes in cyanobacteria strains of Iran. *Phytochemistry Letters* 29: 199–211.
- Osorio-Santos, K., Pietrasiak, N., Bohunická, M., Miscoe, L.H., Kováčik, L., Martin, M.P. & Johansen, J.R. 2014. Seven new species of *Oculatella* (Pseudanabaenales, Cyanobacteria): taxonomically recognizing cryptic diversification. *European Journal of Phycology* 49(4): 450–470.
- Prabha, R. & Singh, D.P. 2019. Cyanobacterial phylogenetic analysis based on phylogenomics approaches render evolutionary diversification and adaptation: an overview of representative orders. *Biotech* 9(3): 1–16.
- Rasmussen, U. & Svenning, M.M. 1998. Fingerprinting of cyanobacteria based on PCR with primers derived from short and long tandemly repeated repetitive sequences. *Applied and Environmental Microbiology* 64(1): 265–272.
- Řeháková, K., Johansen, J.R., Casamatta, D.A., Xuesong, L. & Vincent, J. 2007. Morphological and molecular

- characterization of selected desert soil cyanobacteria: three species new to science including *Mojavia pulchra* gen. et sp. nov. *Phycologia* 46(5): 481–502.
- Rivandi, M., Nowruzi, B. & Fahimi, H. 2021. Molecular phylogenetic study of toxic cyanobacterium *Anabaena* sp. strain B3 isolated from Lavasan Lake, Tehran (Iran). *Rostaniha* 22(1): 120–33.
- Selvakumar, G. & Gopalaswamy, G. 2008. PCR based fingerprinting of *Westiellopsis* cultures with short tandemly repeated repetitive (STRR) and highly iterated palindrome (HIP) sequences. *Biologia* 63(3): 283–288.
- Shokraei, R., Fahimi, H., Blanco, S. & Nowruzi, B. 2019. Genomic fingerprinting using highly repetitive sequences to differentiate close cyanobacterial strains. *Microbial Bioactives* 2(1): 68–75.
- Sihvonen, L.M., Lyra, C., Fewer, D.P., Rajaniemi-Wacklin, P., Lehtimäki, J.M., Wahlsten, M. & Sivonen, K. 2007. Strains of the cyanobacterial genera *Calothrix* and *Rivularia* isolated from the Baltic Sea display cryptic diversity and are distantly related to *Gloeotrichia* and *Tolypothrix*. *FEMS Microbiology Ecology* 61(1): 74–84.
- Smith, J., Parry, J., Day, J., & Smith, R. 1998. A PCR technique based on the Hipl interspersed repetitive sequence distinguishes cyanobacterial species and strains. *Microbiology* 144(10): 2791–2801.
- Stein, J. 1973. *Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Measurements*. Cambridge University Press: 448–510.
- Taton, A., Grubisic, S., Brambilla, E., De Wit, R. & Wilmotte, A. 2003. Cyanobacterial diversity in natural and artificial microbial mats of Lake Fryxell (McMurdo Dry Valleys, Antarctica): a morphological and molecular approach. *Applied and Environmental Microbiology* 69(9): 5157–5169.
- Thajuddin, N., Muralitharan, G., Sundaramoorthy, M., Ramamoorthy, R., Ramachandran, S., Akbarsha, M.A. & Gunasekaran, M. 2010. Morphological and genetic diversity of symbiotic cyanobacteria from cycads. *Journal of Basic Microbiology* 50(3): 254–65.
- Whitton, B.A. 1992. Diversity, Ecology, and Taxonomy of the Cyanobacteria. Pp. 1–51. *In: Photosynthetic Prokaryotes*. Springer, Boston, MA.
- Zuker, M. 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research* 31(13): 3406–3415.