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: ۱}۴۰۱/۰۲/۱۶ / پذیرش: ۱۴۰۱/۰۴/۲

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 فناوری های نوین، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران، ایران

چکیدہ

هدف از این مطالعه، یافتن روابط فیلوژنتیک سیانوباکتریها براساس ژنهای Ids rRNA و ITS و Ids توالیهای پالیندرومی ERIC باله STRR بوده است. به این منظور، نمونهبرداری از پنج چشمه از قناتهای کمعمق روستاهای گنبدکاووس (استان گلستان) انجام شد و در محیط کشت STRR کرده. پس از استخراج ADA، ژنهای RNA، و ITS و ITS تکثیر و توالی یابی شدند. درخت فیلوژنتیک با استفاده از روش استان ZS خالص سازی گردید. پس از استخراج ADA، ژنهای RNA و ItS تکثیر و توالی یابی شدند. درخت فیلوژنتیک با استفاده از روش کمت ZS خالص سازی گردید. پس از استخراج MDA، ژنهای ISS rRNA و ItS تکثیر و توالی یابی شدند. درخت فیلوژنتیک با استفاده از روش Likelihood Maximum له محک وب سرور برخط ItS arNA و ItS ما بند. ساختار ثانویه ITS، در بخشهای مختلف مارپیچ Likelihood Maximum و مدل مناسب به کمک وب سرور برخط Itse server ساخته شد. ساختار ثانویه ITS، در بخشهای مختلف مارپیچ ItS ملک. DI-DI CD، DI-DI دول ما مالی به تعلی و ItS مال مال المان المان المال المان المال المان المال المال

واژدهای 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 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

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 هتروسیستدار دیگر نیز یافت شدند (Driscoll et al. 2018). توالیهای تکراری در ژنوم پروکاریوتها میتوانند، جایگاههای اتصالی برای پرایمرهای الیگونوکلئوتیدی در روش انگشتنگاریهای ژنومیک به واسطه واکنش زنجیرهای پلیمراز 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 امکان پذیر 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 می توان انگشت نگاری DNA مختلفی از میکروار گانیسم ها را انجام داد. شناسایی و آنالیز محصولات rep-PCR با اندازههای مختلف، توسط معاينه بصرى ژلهاى لكه گذارى شده با اتيديوم برماید، انجام می شود و سپس شناسایی با کمک کامپیوتر و به کمک اسکن لیزری محصولات تکثیر و لیبل شده با فلوئورفور صورت می گیرد. الگوهای انگشتنگاری DNA می توانند با یکدیگر مقایسه شوند تا بتوان درجه ارتباط شباهت سویههای جداسازی شده با یکدیگر را تخمین زد (Moreira et al. 2020).

آنالیز توالیهای ERIC ، HIP و STRR، ابزاری قوی برای مطالعات تاکسونومی معرفی شدهاند. اختصاصی بودن این توالیها، برای کشتهای غیراگزنیک 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 Selvakumar (کی محققان، سویههای سیانوباکتری سویههای سیانوباکتریها نیز استفاده شدهاند (& STRR Selvakumar 2008). محققان، سویههای سیانوباکتری تولیدکننده سم را با استفاده از توالیهای STRR شناسایی کردند. آنها با استفاده از توالیهای مشخصی را بین چندین 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 ریسهای 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 قابل اعتمادی برای ردهبندی تاکسونومیکی سیانوباکتریها (سیانوپروکریوتها) گردیده است؛ براساس هیبریداسیون ANA، توالییابی ژنها و استراتژیهای براساس هیبریداسیون ANA، توالییابی ژنها و استراتژیهای

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

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

در حالی که ردهبندی سیانوباکتریها در درجه اول براساس ویژگیهای ریختشناختی، است اما همواره این مشکل مطرح است که ریختشناسی میکروبها در کشتهای آزمایشگاهی، بیشتر اوقات نسبت به ریختشناسی اصلی آنان در طبيعت تغيير پيدا مىكند. برخى ويژگىهاى شناسايى مانند واکوئل گازی یا آکینتها میتوانند در محیطزیستهای مختلف و شرايط كشت متفاوت، متنوع باشند. يا حتى مى توانند طى كشت، ناپدید شوند. تکنولوژی PCR این اجازه را داده است که ارزیابی برای شناسایی گوناگونیها در سطح نوکلئوتید انجام گیرد که این امر تأثیر مهمی تقریبا در همه زمینههای زیستشناسی مدرن داشته است. با پیشرفتهای صورت گرفته در زیستشناسی مولکولی و بیوانفورماتیک، این امر امکان پذیر شده است که ژنوم یک ارگانیسم را برای یافتن توالیهای منحصر به فرد کندوکاو کرد. از این توالیهای منحصربهفرد میتوان برای تفکیک یک گروه خاص از میکروارگانیسمها از خویشاوندان نزدیک آنها، استفاده كرد (Nowruzi & Blanco 2019). توالى هاى DNA، امكان 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 توليد طيف وسيعى از متابوليتهاى ثانويه توسط سیانوباکتریها و قابلیت رشدپذیری سریع آنها، تاکنون

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 زیست فعال به همراه داشته است. همان طور 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 ' '55 '26'26) و عرض روستای یساقی [طول جغرافیایی (E ' '55 '26'26) و عرض 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 نمونهها در محیط کشت جامد Z8 (Kotai 1972) کشت داده مدند و در اتاقک رشد با دمای ۲۸ درجه سلسیوس و روشنایی ممتد لامپ فلورسنت با شدت ۳۰ میکرومول کوانتا انجام شد (Nowruzi 2020)



شکل ۱– ایستگاههای نمونهبرداری در منطقه تحت بررسی. Fig. 1. Sampling stations in the area under investigation.

به منظور خالصسازی سیانوباکتریها از کشتهای به دست آمده، سه تا پنج بار کشت مجدد تهیه شد تا کاملا از خالص بودن أن اطمينان حاصل شود. جهت انكوباسيون، بين يك الی چهار هفته زمان در نظر گرفته شد. برای اطمینان از خالص بودن سویهها، از تلقیح در محیط کشت (R2A) 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 کُمارک (Komárek 2020) صورت گرفت.

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

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

قرار دادن روی ژل الکتروفورز و نیز از روش کمّی به کمک دستگاه نانودراپ استفاده گردید. قطعات ۱۴۵۴ تا ۱۴۹۴ جفت بازی PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر تکثیر گردید.

- ترسیم درخت فیلوژنتیک

جستجوی بلاست نوکلئوتید برای یافتن توالیهای مشابه ژن GenBank™ موجود در پایگاه دادههای ™GenBank در 16S rRNA انجام گردید. همردیف سازی توالی ژن MAFI به دستآمده در این بررسی به همراه دیگر توالیهای مشابه (Ver. 7) MAFFT به همراه دیگر توالیهای مشابه انجام گردید. پس از انتخاب بهترین مدل، رسم درختان فیلوژنتیک با برنامه Iqtree server و با استفاده از آنالیز Maximum با برنامه Likelihood و با استفاده از آنالیز Inkscape و Figtree

- آناليز ساختار ثانويه منطقه I6S-23S rRNA ITS

به منظور رسم ساختار ثانویه ITS، از وب سرور Mfold (نسخه ۲/۳) استفاده شد (Zuker 2003). مناطق مختلف مارپیچ /D3 ،D2، مارپیچ D3، D3، ژن RNAIle اteman *et al.* (2000) طبق (2000) teman *et al.* (2000) مارپیچ 2V، ژن RNAAla و Box B طبق (2000) teman *et al.* جستجو گردید. به علاوه، برای پیشبینی حضور ژن های RNA Ile و RNAscan-SE استفاده گردید.

- تكثير توالىھاى پاليندرومى

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

حضور و عدم حضور باندهای مجزا و قابل تکثیر در هر الگوی انگشتنگاری DNA تولید شده با پروفایلهای PCR HIP، PCR و STRR، به اطلاعات دوتایی تبدیل شد و این اطلاعات برای ساختن دندروگرام مرکب، استفاده شد. نرمافزار Jaccard Pcc (Ver. 2) استفاده گردید. 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 پلیمراز انجام گردید. پرایمرهای مورد استفاده برای توالیهای DNA شامل (ERIC1A -'5 (ATGTAAGCTCCTGGGGGATTCAC-3) و (ERIC1B -'5 PCR -'2 Madd سیکل اول در ۹۵ درجه سلسیوس برای هفت دقیقه با ۳۰ شامل سیکل (۹۴ درجه سلسیوس برای هشت دقیقه) و یک سیکل برای یک دقیقه، ۶۵ درجه سلسیوس برای هشت دقیقه) و یک سیکل در ۶۵ درجه سلسیوس برای هشت دقیقه) و یک سیکل در جه سلسیوس برای ۶۱ دقیقه و انکوباسیون نهایی در چهار درجه سلسیوس برای ۲۰ دقیقه انجام گرفت (Bruijn 1992). برای

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 انکوباسیون

نهایی در چهار درجه سلسیوس برای ۳۰ دقیقه انجام گرفت HIP (یا تکثیر توالیهای Rasmussen & Svenning 1998). از پرایمرهای 'GCGATCGCTG-3' -'HIP-TG; 5'-GCGATCGCTG-5' استفاده 'GCGATCGCGCG-5' و 'HIP-CA; 5'-GCGATCGCCA-5' استفاده گردید و برنامه PCR شامل ۹۵ درجه سلسیوس برای پنج دقیقه، ۳۰ سیکل (۹۵ درجه سلسیوس برای ۳۰ ثانیه، ۳۰ درجه سلسیوس برای (۱۹۹ درجه سلسیوس برای ۶۰ ثانیه)، یک سیکل در ۷۲ درجه سلسیوس برای ینج دقیقه انجام شد (Smith *et al.* 1998).

نتيجه

- 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* و *Aphanizomenonaceae* راسته *Nostocaceae* بود. سه سویه مورد بررسی در کلاد *Neowestiellopsis* یک سویه در کلاد *Calothrix*، دو سویه در کلاد *Anabaena* یک سویه در کلاد *Aliinostoc* جای گرفتند (شکلهای ۲ و ۳).



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



Desmonostoc sp. Alborz 5 .B *Desmonostoc* sp. Alborz 10 .A شكل ۳- ميكروگرافهاى نورى سويههاى سيانوباكترىهاى مختلف: *Anabaena* sp. Alborz 7 .G *Anabaena* sp. Alborz 7 .G *Aliinostoc* sp. Alborz 7 .G *Neowestiellopsis* sp. J *Neowestiellopsis* sp. Alborz 8 .I *Neowestiellopsis* sp. Alborz 6 .H *Calothrix* sp. Alborz 7 .G (مقياس = ۵ و ۱۰ ميكرومتر).

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).

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

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

- نتایج حاصل از آنالیزهای فیلوژنتیک

برای ساخت درخت فیلوژنتیک، از سویه (FR798924) Gloeobacter violaceus VP3-01 و .(AB015062) Synechococcus sp به عنوان ريشه 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 كنار هر گره انشعابی، نشان دهنده 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 می کند. طول شاخه، بیانگر میزان تفاوت ها 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 می دهد که سویه ها در چهار تیره Nostocaceae Aphanizomenonaceae، Hapalosiphonaceae و Calotrichaceae كلاستربندى شدند و هر سویه درون تیره خود در یک کلاستر مشخص و یکرنگ ویژه قرار گرفته است. نتایج حاصل از آنالیز فیلوژنتیکی سویههای کلاستربندی شده در تیره Calothrix sp. Alborz 7 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 کلاد مشترک قرار میگیرد. نتایج حاصل از آنالیز فیلوژنتیکی سویههای کلاستربندی شده در تیره Hapalosiphonaceae نشان داد که هر سه سویه Neowestiellopsis sp. Neowestiellopsis sp. Alborz 6 Alborz 8 و Neowestiellopsis sp. Alborz 2 با ساير

سویه های Neowestiellopsis با حمایت بالای بوت استرپ در یک کلاد مشترک قرار گرفته است. نتایج حاصل از آنالیز فیلوژنتیکی سویههای کلاستربندی شده در تیره Desmonostoc sp. نشان داد که سویه Nostocaceae 10 Alborz با قرابت فیلوژنتیکی (۹۷/۶ درصد) با سویه Desmonostoc sp. CENA386 در یک کلاد قرار می گیرد و سویه Desmonostoc sp. Alborz 5 با حمایت بالای بوت استرپ (۹۸/۹ درصد) با سویه ۸۲۳۱ Nostoc sp. PCC قرابت فیلوژنتیکی دارد. نتایج حاصل از آنالیز فیلوژنتیکی سویههای کلاستربندی شده در تیره Nodularia sp. نشان داد که Aphanizomenonaceae Alborz 9 دارای قرابت با سویه Alborz 9 strain NSPH02 است و با حمايت بالای بوت استرپ (۷۶ درصد) با آن در کلاد مشترک قرار می گیرد. سویههای Nodularia , Nodularia sphaerocarpa DQ185243 sphaerocarpa HQ394174 در یک ساب کلاد قرار دارند. نتایج حاصل از آنالیز فیلوژنتیکی سویههای کلاستربندی شده در تیره Nostocaceae نشان داد که سویه Aliinostoc sp. Alborz 1 دارای بیشترین قرابت با سویه Nostoc sp. 2LT05S03 است و با حمايت بالاي بوت استرپ (۸۹/۱ درصد) با آن قرابت فیلوژنتیکی دارد. همچنین، نتایج حاصل از آنالیز فیلوژنتیکی سویههای کلاستربندی شده در تیره Nostocaceae نشان داد که سويه هاى Anabaena sp. Alborz 3 و Anabaena sp. 4 Alborz درون یک کلاد با قرابت فیلوژنتیکی ۹۸ درصد قرار می گیرند و با سویه Anabaena sp. BECID23 با حمایت بالای بوت استرپ (۸۳/۶ درصد) قرابت فیلوژنتیکی دارند. مقیاس نشان داده شده در شکل، نشان دهنده ۰/۰۳ جهش به ازای هر نوکلئوتید است (شکل ۴).



شکل ۴- روابط فیلوژنتیکی بین سویههای مورد مطالعه و سایر سیانوباکتریها براساس توالیهای IDNA ، IOS rDNA و Synechococcus sp. (AB015062 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.

www.SID.ir

- آناليز ساختار ثانويه 16S-23S rRNA ITS

- مقایسه تعداد نوکلئوتید بخش های مختلف منطقه ITS

10 دارای هر دو منطقه tRNA است. به علاوه، تفاوت در تعداد نوکلئوتیدها نیز در سایر بخشها مشاهده شد (جدول ۴). مقایسه *Nodularia* sp. Alborz 9 سویهها ناحیه V3 و RNA نداشتند، به جز سویه Nodularia سویهها ناحیه V3 و tRNA نداشتند، به جز سویه *Nodularia* داشت (جدول ۵). مقایسه Ala tRNA به توکلئوتید وجود سویههای مشابه نشان داد که دارای دو tRNA بود. بخش V3 تنها در سویه ای مشابه نشان داد که دارای دو tRNA با ۷۶ نوکلئوتید وجود سویههای مشابه نشان داد که دارای دو tRNA با ۷۶ نوکلئوتید وجود سویههای مشابه نشان داد که دارای دو tRNA با ۷۶ نوکلئوتید وجود در سویه ای ۲۵ با ۱۱ نوکلئوتید تنها در بعضی از سویهها از جمله داشت. Abit که موجود بود (جدول ۶). مقایسه سویههای سویه مورد مطالعه موجود بود (جدول ۶). مقایسه سویههای سویه ایز نشان داد که هر دو دارای Alborz 4 با ۱۱ نوکلئوتید و مسویهها نیز نشان داد که هر دو دارای Alborz 5 با ۱۱ نوکلئوتید و مسویهها نیز نشان داد که هر دو دارای Abit 7 با ۱۱ نوکلئوتید و مسویهها نیز نشان داد که هر دو دارای Abit 7 با ۱۱ نوکلئوتید و مسویهها نیز نشان داد که هر دو دارای Abit 7 با ۲۰ نوکلئوتید و مسویهها نیز نشان داد که هر دو دارای Abit 7 با ۲۰ نوکلئوتید و مسویه مورد مطالعه موجود بود (جدول ۶). مقایسه مویه 7 مامله 20 با ۱۱ نوکلئوتید و مامله 20 با ۱۱ نوکلئوتید و مامله 20 با ۱۱ نوکلئوتید و مارد ما در سویه . 20 با ۱۱ نوکلئوتید و

سویههای مشابه نشان داد که تنها سویه Desmonostoc sp. Alborz

طبق ایتمان و همکاران (.Outer et al. 2000)، هشت منطقه مارپیچ 'ID-D1، مارپیچ CD، CD، ژن ARNAIle، مارپیچ V2، ژن ARNAAla و Box B روی ژن TS مشخص گردید (جدولهای ۲ تا ۲). از مقایسه سویه TS, Alborz 7 با سایر سویههای مشابه نشان داده شد که تعداد نوکلئوتیدها در منطقه 'ID-D1 با سایر سویهها متفاوت بود و در سویه مورد مطالعه مناطق A SO و هر دو ARNA حذف شده است، اما در سایر سویههای مشابه با ۱۱ هر دو ARNA حذف شده است، اما در سایر سویههای مشابه با ۱۱ با RR47571.1 مود داشت. بخش V3 نیز تنها در سویه ای AR47571.1 نوکلئوتید وجود داشت. بخش V3 نیز تنها در سویه ای AR47571.1 (جدول ۲). مقایسه سویههای 26، RA Alborz و BOX B بخش 'ID-D1 و BOX A ماک و BOX A ماک و BOX B نوکلئوتیدها برابر، اما سویه BOX A، D3 و BOX B نوکلئوتیدها برابر، اما سویه BOX A، D3 و BOX B بخش 'ID-D1 و V3 نوکلئوتیدهای متفاوتی داشت (جدول ۳). مقایسه تعداد نوکلئوتید بخشهای مختلف منطقه ITS دو سویه ABIL منطقه ITS مقایسه منطقه ITS دو سویه بخش 'ID-D1 و Desmonostoc sp. Alborz 5

جدول ۲- مقایسه تعداد نوکلئوتیدهای مناطق Calothrix sp. Alborz 7 ITS و سایر سویههای مشابه

Table 2. Comparison of the nucleotides	length of	the ITS	regions o	f <i>Calothri</i> .	x sp. Albo	orz 7 and tl	ne oth	er similar s	strain	s
Studied strain and reference strain	D1-D1' helix	D2 with spacer	D3 with spacer	tRNA ^{lle} gene	tRNA ^{Ala} gene	Pere BOX B spacer	BOX B	Post BOX B spacer	BOXA	V3
Calothrix sp. Alborz 7	72	-	-	-	-	-	32	-	-	-
KT336448.1: Calothrix sp. SEV5-4-C5	66	21	10	74	73	64	34	18	11	-
HQ847571.1: Calothrix sp. HA4395-MV3	68	20	11	74	73	65	34	17	11	50
KF761555.1: Calothrix sp. RSUAII 16S23S	63	19	9	74	73	-	-	-	-	-
AF236642.1: C. parietina clone 102-2A	71	21	10	74	73	64	34	18	11	-
HQ847580.1: Calothrix sp. HA4186-MV5	65	24	5	-	-	35	33	17	11	51
FJ661009.1: Calothrix sp. Asko 16	66	43	5	-	-	13	26	19	11	-
FJ661007.1: Calothrix sp. Asko 3	60	-	-	74	76	31	27	17	11	-

جدول ۳- مقایسه تعداد نوکلئوتیدهای مناطق Neowestiellopsis sp. Alborz 6-2-8 ITS و سایر سویههای مشابه Table 3. Comparison of the nucleotides length of the ITS regions of Neowestiellopsis sp. Alborz 6-2-8 and the other similar strains

Studied strain and reference strain	D1-D1′ helix	D2 with spacer	D3 with spacer	tRNAlle gene	tRNAAla gene	Pere BOX B spacer	BOXB	Post BOX B spacer	BOX A	V3
Neowestiellopsis sp. Alborz 2	72	19	12	74	65	6	32	17	11	96
Neowestiellopsis sp. Alborz 8	71	19	12	74	73	28	30	17	11	61
Neowestiellopsis sp. Alborz 6	72	19	12	74	73	28	30	17	11	96
MN656995.1: Neowestiellopsis sp. KHW5	71	19	12	73	-	81	24	22	-	-
MF066912.1: N. persica	55	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MN656995.1: Neowestiellopsis sp. KHW5	71	19	12	73	73	31	29	16	11	124
MF066911.1: N. bilateralis	93	-	-	-	-	-	-	-	-	-

www.SID.ir

جدول ۴- مقایسه تعداد نوکلئوتیدهای مناطق Desmonostoc sp. Alborz 5-10 ITS 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 ^{lle} gene	tRNA ^{Ala} gene	Pere BOX B spacer	BOXB	Post BOX B spacer	BOXA	V3
Desmonostoc sp. Alborz 5	66	18	5	-	-	29	27	17	11	-
Desmonostoc sp. Alborz 10	67	18	5	75	75	-	-	-	-	-
KF761564.1: Desmonostoc sp.	66	18	5	-	-	29	27	17	11	-
KU161661.1: D. geniculatum	65	17	5	-	-	39	24	18	11	-

جدول ۵- مقایسه تعداد نوکلئوتیدهای مناطق Nodularia sp. Alborz 9 ITS 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 ^{lle} gene	tRNA ^{Ala} gene	Pere BOX B spacer	BOX B	Post BOX B spacer	BOXA	V3
Nodularia sp. Alborz 9	66	18	5	-	-	45	32	17	11	-
AY768379.1: N. harveyana	-	-	5	-	73	122	36	17	11	-
AF367159.1: N. harveyana	66	18	5	-	-	28	31	17	11	-
MT488088.1: Nodularia sp.	65	19	5	-	-	44	31	17	11	-
MH979221.1: N. spumigena	65	18	5	-	-	41	31	17	11	-
AF367166.1: N. sphaerocarpa	65	18	5	-	-	41	31	17	11	-

جدول ۶- مقایسه تعداد نوکلئوتیدهای مناطق Aliinostoc sp. Alborz 1 ITS 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 ^{lle} gene	tRNA ^{Ala} gene	Pere BOX B spacer	BOXB	Post BOX B spacer	BOXA	V3
Aliinostoc sp. Alborz 1	69	20	10	74	73	39	30	17	11	-
KY403996.1: A. morphoplasticum	93	24	5	-	-	16	25	15	11	-
MK503791.1: Aliinostoc sp. SA18	60	-	-	-	-	-	33	-	-	-
MK503792.1: Aliinostoc sp. SA24	93	14	-	-	-	45	26	-	-	-
MK503793.1: Aliinostoc sp. SA30	62	-	-	-	-	-	34	18	-	47
MH497065.1: A. soli ZH1	66	20	5	-	-	16	27	-	-	-
MH497064.1: A. tiwarii LIPS	65	-	-	-	-	-	28	44	11	-

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

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

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

www.SID.ir

نشان داد که تعداد نوکلئوتيدها در لوپ دوطرفه انتهايي سويه مورد مناطق مختلف روی مارپیچ 'D1-D1 و Box B به صورت 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 لوپ انتهایی دوطرفه (A)، لوپ دوطرفه میانی (B)، لوپ یکطرفه (C) و قاعده لوپها (D) مشخص شده است. مقایسه لوپها در بخش های 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− پیش بینی ساختار ثانویه مارپیچ ′D1-D1 سویه 7 *Calothrix* sp. Alborz 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 7/۲ *Calothrix* sp. Alborz 7 با سایر سویههای مشابه (از وب سرور M-fold، نسخه ۲/۳، دما ۳۷ درجه سلسيوس): A. لوپ انتهايي دوطرفه، B. لوپ دوطرفه مياني.

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- مقايسه ساختار ثانويه 16S-23S rRNA (مارپيچ 'D1-D1 و Box-B) بين Calothrix sp. Alborz 7 و ساير سويه هاى 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

		D1-D1	' helix			BOX B	
Studied strain and reference strain	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
Calothrix sp. Alborz 7	8	3	1	10	12	10	-
KT336448.1: Calothrix sp. SEV5-4	6	2	1	8	6	14	-
HQ847571.1 Calothrix sp. HA4395	6	2	1	10	6	14	-
KF761555.1: Calothrix sp. RSUAII	7	3	1	10	-	-	-
AF236642.1: C. parietina	6	2	-	8	6	7	5
HQ847580.1: Calothrix sp. HA4186	6	1	3	8	5	7	5
FJ661009.1: Calothrix sp. Asko 16	6	3	1	6	7	7	-
FJ661007.1: Calothrix sp. Asko 3	18	-	3	8	5	6	-

در سویه Box B دارای هشت نوکلئوتید ابود (شکل Y). 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 هشت نوکلئوتید و Alborz 6 و Alborz مشت نوکلئوتید داشت. سویه Alborz 6 پنج نوکلئوتید داشت. *Neowestiellopsis* sp. Alborz 6 پنج نوکلئوتید داشت. در سویه Neowestiellopsis sp. Alborz 6 و بدولئوتید داشت. Alborz 6 و مدولرفه دارای هفت نوکلئوتید، در حالی که در (شکل ۹ و جدول ۹). مقایسه لوپها در بخشهای مختلف 'D1-D1 نشان داد که دو سویه Neowestiellopsis sp. 4 و Neowestiellopsis sp. Alborz 6 در قسمت لوپ ابتدایی دوطرفه دارای هشت نوکلئوتید، اما سویه Neowestiellopsis sp. Alborz 2 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، Neowestiellopsis sp. Alborz s دارای ۱ توکلئوتید و جود داشت اما تعداد 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، Alborz sp. داشت و تعداد آن بین ۱ تا ۲ لوپ متغیر بود. در قسمت پایه انتهایی، ماه داشت و عداد آن بین ۱ تا ۲ لوپ متغیر بود. در قسمت پایه انتهایی،



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- پیش بینی ساختار ثانویه مارپیچ 'D1-D1 سویههای B، Alborz 2, 6, 8 لوپ دوطرفه میانی، C، 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- پیش بینی ساختار ثانویه مارپیچ Box B سویههای Neowestiellopsis sp. Alborz 2, 6, 8 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- مقايسه ساختار ثانويه Neowestiellopsis sp. Alborz 2, 6, 8 بين Box-B و D1-D1 و D1-D1 و D1-D1 و ساير سويه هاى 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

		D1-D	1′ helix		-	BOX B	
Studied strain and reference strain	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	No. of	No. of	No. of	No. of	No. of	No. of
	nucleotide	loop	loop	nucleotide	nucleotide	nucleotide	nucleotide
Neowestiellopsis sp. Alborz 6	8	1	3	10	13	7	-
Neowestiellopsis sp. Alborz 2	5	3	1	8	13	7	-
Neowestiellopsis 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 *Desmonostoc* sp. Alborz 5 و *Desmonostoc* sp. Alborz 10 مدابه دارای ۱۰ نوکلئوتید بودند (شکل ۱۰ و جدول ۱۰).

91/91

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. مالborz 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).



شکل ۱۰- پیش.بینی 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- مقايسه ساختار ثانويه I6S-23S rRNA و ساير سويههاى مشابه (Box-b) بين Desmonostoc sp. Alborz 5-10 و ساير سويههاى 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

		D1-D	1′ helix			BOX B	
Studied strain and reference strain	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	No. of	No. of	No. of	No. of	No. of	No. of
	nucleotide	loop	loop	nucleotide	nucleotide	nucleotide	nucleotide
Desmonostoc sp. Alborz 5	5	3	1	8	7	11	-
Desmonostoc 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	-

همه سویههای مورد بررسی دارای دو لوپ دوطرفه، اما در سویه AF367159.1، سه لوپ دوطرفه وجود داشت (شکل ۱۱). مقایسه

مقایسه لوپها در بخشهای مختلف 'D1-D1 نشان داد که 🔰 لوپها در بخشهای مختلف Box B نشان داد که سویه مورد مطالعه همه سویهها دارای لوپ دوطرفه ابتدایی با پنج نوکلئوتید، اما در دارای لوپ دوطرفه ابتدایی با ینج نوکلئوتید که با سایر سویههای سویه AF367159.1، لوپ دوطرفه ابتدایی دارای هفت نو کلئوتید بود. 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).



Nodularia sp. Alborz 9, MT488088.1:1457-1888, AF367166.1:1-351, MH979221.1:97-519, AF367159.1 شکل ۱۱- پیش بینی ساختار ثانویه مارپیچ /D1-D1 سویه Nodularia sp. Alborz 9 در مقایسه با سایر سویه های 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– پیش بینی 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 IdS-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

	D1-D1' helix				BOX B			
Studied strain and reference strain	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	
Nodularia 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، *Aliinostoc* sp. MK503792.1 و *Aliinostoc ge* در حالی که در سویه *morphoplasticum* و 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 وجود داشت



Aliinostoc sp. Alborz 1, Aliinostoc morphoplasticum, Aliinostoc sp. SA18, Aliinostoc tiwarii, Aliinostoc sp. SA24, Aliinostoc sp. SA30, Aliinostoc soli شکل ۱۳- پیش بینی ساختار ثانویه مارپیچ 'D1-D1 سویه 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.

Fig. 13. Predicted secondary structures for the D1-D1⁻ nelices of *Atunostoc* 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). 95/98 Archive of SID



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

شکل ۱۴- پیش بینی ساختار ثانویه مارپیچ Box B سویه Aliinostoc sp. Alborz 1 با سایر سویه های 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 – مقايسه ساختار ثانويه Aliinostoc sp. Alborz 1 و Box-B و D1-D1 و D1-D1 و Aliinostoc sp. Alborz 1 و ساير سويههاى 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

	D1-D1' helix				BOX B			
Studied strain and reference strain	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	
Aliinostoc sp. Alborz 1	8	3	1	10	8	10	-	
KY403996.1: A. morphoplasticum NOS	6	6	-	10	6	7	-	
MK503791.1: Aliinostoc sp. SA18	7	3	-	10	-	-	-	
MH497064.1: A. tiwarii LI PS	7	4	-	10	-	-	-	
MK503792.1: Aliinostoc sp. SA24	6	6	-	10	6	8	-	
MK503793.1: Aliinostoc sp. SA30	6	3	1	10	-	-	-	
MH497065.1: A. soli ZH1	5	3	1	10	-	-	-	

sp. Alborz دارای دو لوپ یکطرفه بود (شکل ۱۵). مقایسه لوپها در بخشهای مختلف Box B نشان داد که سویهها دارای لوپ یکطرفه ابتدایی با تعداد نوکلئوتیدهای متفاوت بودند. سویه لوپ یکطرفه ابتدایی با تعداد نوکلئوتیدهای متفاوت بودند. سویه کطرفه ابتدایی با تعداد که مشت نوکلئوتید و سویه *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 KT290325.1 در حالی که سویههای KT290325.1، دوطرفه داشتند، در حالی که سویههای KT290325.1 و KT290324.1 دارای دو لوپ بودند. سویه Anabaena 3 دارای ۱ لوپ و سویه 3



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

شکل 1۵- 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).



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 ی Alborz 5 / Desmonostoc sp. Alborz 10 و Alborz 2 هرکدام به صورت sp. Alborz 8 / Neowestiellopsis sp. Alborz 2 هرکدام به صورت جداگانه در کلادهای مشترک دوتایی با شباهت ۷۰ درصدی با 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 یالیندرومی

Anabaena بررسی نتایج کلاستر STRR نشان داد دو سویه strR بررسی نتایج کلاستر sp. Alborz 3 / Anabaena sp. Alborz 4 یکدیگر داشتند. سویه Aliinostoc sp. Alborz 1 با شباهت ۸۰ درصدی در کلاد مشترکی با این دو قرار گرفت. دو سویه .Desmonostoc sp جدول ۱۳ – مقايسه ساختار ثانويه Anabaena sp. Alborz 3-4 و Box-B و D1-D1 و D1-D1 و D1-D1 و Mabaena sp. Alborz 3-4 و ساير سويه هاى 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

	D1-D1' helix				BOX B			
Studied strain and reference strain	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	
Anabaena sp. Alborz 4	9	3	1	8	8	16	-	
Anabaena sp. Alborz 3	7	3	2	10	17	7	-	
EU636199.1: 1345-1833 A. circinalis ACMB13	6	3	1	10	-	-	-	
KT290325.1: A. cylindrica PCC 7122	7	2	2	10	-	-	-	
KT290324.1: A. inaequalis CCAP 1446/1A	7	2	2	10	-	-	-	
KT290328.1: Anabaena sp. SAG 28.79	7	2	2	10	-	-	-	
KT290322.1: Anabaena sp. SAG 12.82	5	3	3	6	7	7	-	
MT577724.1: Anabaena sp. It 4	7	3	1	8	9	7	-	
HQ846552.1: Anabaena sp. A7	5	3	1	10	7	10	-	
HQ846551.1: A. iyengarii RPAN70	6	3	1	10	5	11	-	
HQ846527.1: A. oscillarioides RPAN4	7	3	-	8	-	-	-	
HQ846550.1: A. oscillarioides RPAN69	-	-	-	-	6	-	5	



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

قرابت کمتری نسبت به سایر نمونهها داشتند. طبق شکل ۱۸ (سمت چپ)، anabaena sp. Alborz 3 / Anabaena sp. Alborz 3 / Anabaena sp. Alborz 3 / Anabaena sp. Alborz 4 و sp. Alborz 4 و Nodularia sp. Alborz 9 درصدی با یکدیگر construction of the sp. Alborz 5 درصدی در یک کلاد مشتر ک and 10 درصدی در یک کلاد مشتر ک Neowestiellopsis sp. Alborz 6 و Nelborz 5 sp. Alborz 8 2 Neowestiellopsis sp. Alborz 6 و Neowestiellopsis sp. Alborz 8 2 Neowestiellopsis sp. Alborz 6 و Neowestiellopsis sp. Alborz 8 2 Neowestiellopsis sp. Alborz 6 و Neowestiellopsis sp. Alborz 8 2 Neowestiellopsis sp. Alborz 7 درصدی در کلاد مشتر ک قرار گرفتند. سویه ۸۰ درصدی در Sp. Alborz 7 3 Neowestiellopsis sp. Alborz 7 در صدی در کلاد مشتر ک قرار گرفتند. سویه ۸۰ درصدی در Sp. 2007 7 بررسی نتایج کلاستر HIP AT مطابق شکل ۱۸ (سمت راست) Anabaena sp. Alborz 3 / Anabaena sp. Alborz 4 نشان داد دو سویه Alborz 4 درصدی با یکدیگر دارند. سویه 1 Aliinostoc sp. Alborz 1 با ین دو قرار گرفت. دو سویه با شباهت ۸۰ درصدی در کلاد مشترکی با این دو قرار گرفت. دو سویه Desmonostoc sp. Alborz 5 / Desmonostoc sp. Alborz 10 Neowestiellopsis sp. 2 × ۲ درصدی و Alborz 5 × 10 Valborz 2 / Neowestiellopsis sp. Alborz 8 Calothrix و Nodularia sp. Alborz 9 در کلاد مشترک با شباهت ۹۵ در محدی با هم قرار گرفتند. سویه 9 Alborz 2 در کلاد مشترک با شباهت ۶۵



شکل ۱۸ – دندرو گرام 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 HIP GC ، معلم / ۱۹ (سمت راست) Anabaena sp. Alborz 3 / Anabaena sp. درصدی داشت و دو سویه Alborz 4 با یکدیگر شباهت ۱۰۰ درصدی داشت و دو سویه Desmonostoc sp. Alborz 5 / Desmonostoc sp. Alborz 10 با Desmonostoc sp. Alborz 5 / Desmonostoc sp. Alborz 10 شباهت ۷۵ درصدی در یک کلاد مشترک با آنها قرار گرفتند. Neowestiellopsis sp. Alborz 2 / Neowestiellopsis sp. در یک کلاد مشترک و سویه ۸۵ درتری از آنها قرار گرفت. نتایج پرایمر HIP TG طبق شکل ۱۹ (سمت چپ) نشان داد Neowestiellopsis sp. Alborz 2 / Neowestiellopsis sp. Alborz 8 که دو سویه Alborz 5 درصدی به یکدیگر داشتند و سویه Alborz 6 شباهت ۱۰۰ درصدی به یکدیگر داشتند و سویه Alborz 6 درصدی با آنها در یک *Neowestiellopsis* sp. Alborz 6 *Anabaena* sp. Alborz 4 با قرابت ۹۰ درصدی با آنها در یک *Desmonostoc* sp. Alborz 4 و *Anabaena* sp. Alborz 3 *Desmonostoc* sp. Alborz 7 و سویه ۶ Alborz 7 با یکدیگر در یک کلاد مشترک و سویه ۶ *Nodularia* sp. Alborz 9 در مدی راز آنها قرار گرفت. سویه 9 *Nodularia* sp. Alborz 9 در 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.

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

نتایج کلاستر ERIC A براساس شکل ۲۰ (سمت راست) *Desmonostoc* sp. Alborz 5 و *Alborz sp. Alborz 1 و Aliinostoc* sp. Alborz 10 و *Desmonostoc* sp. Alborz 10 با شباهت ۹۰ درصدی در یک کلاد مشترک با یکدیگر و دو سویه *شباهت ۹۰ درصدی در یک کلاد مشترک با یکدیگر و دو سویه Anabaena* sp. Alborz 3 / *Anabaena* sp. Alborz 4 *Neowestiellopsis* sp. . دو سویه *Albors* sp. . نتایج کلاستر ERIC A براساس شکل ۲۰ (سمت چپ) نشان داد که Alionostoc sp. Alborz 10 و Aliinostoc sp. Alborz 1 درصدی و دو سویه / Anabaena sp. Alborz 3 با شباهت ۹۰ درصدی و دو سویه / Anabaena sp. Alborz 3 با شباهت ۹۰ درصدی و دو سویه Anabaena sp. Alborz 3 و Neowestiellopsis sp. Alborz 6 و Neowestiellopsis sp. Alborz 2 و ۸۰ درصدی با یکدیگر در یک کلاد قرار گرفتند. سویه با قرابت ۸۰ درصدی با یکدیگر در یک کلاد قرار گرفتند. سویه کمی دورتر از آنها قرار داشت. سویه Calothrix sp. Alborz 7 در فاصله دورتر و قرابت کمتری نسبت به سایر نمونهها داشت.

Alborz 6 و Alborz 2 Alborz 6 با قرابت ۸۰ درصدی در یک کلاد و سویه Neowestiellopsis sp. Alborz 8 در فاصله



شکل ۲۰– دندروگرام مرکب براساس 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

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 آزمایشهای دیگر نشان داد که سویههای متفاوتی از گونههای *Nostoc* یکسان توسط دو محقق به طور کاملا 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

سویههای سیانوباکتریها و مشکلات به وجود آمده در فیلوژنی مولکولی آنها، دانشمندان را بر آن داشت تا از روشهای مولکولی و براساس ماکرهای 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 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 (Kabirnataj et al. 2020) به توصیف گونههای جدید Desikacharya Aliinostoc و Desikacharya 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 مجدا شدند و با روش پلیفازیک مورد ارزیابی قرار گرفتند. سه گونه Desmonostoc و دو سویه دیگر به Desikacharya و به کلاد Desikacharya و دو سویه دیگر به موقعیت فیلوژنتیکی و آنالیز ژن 203-168 و ساختار ثانویه TTS، هر پنج گونه مورد مطالعه، جدید بودند و مطابق با کد بینالمللی نامگذاری جلبکها و قارچها و گیاهان نامگذاری شدند. کاسماتا و همکاران (. 2001) نشان دادند که ساختار ثانویه مناطق محافظت شده

16S-23S ITS مىتواند براى طبقەبندى مفيد باشند. اين ژن در بسیاری از آنالیزهای فیلوژنتیکی سیانوباکتریایی به طور وسیع استفاده می شوند. 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 ريبوزومي بسيار محافظت شده است. آناليزهاي فيلوژنتيكي بر پايه مارکرهای مولکولی، به ویژه I6S rRNA پایهای برای سازماندهی دوباره برخی از تیرههای سیانوباکتریها بوده است (Casamatta et al. 2005). در مطالعه حاضر، از دو مارکر ژنتیکی I6S rRNA و ITS برای شناسایی سویهها انتخاب و با روش ITS درخت فیلوژنتیکی رسم گردید که در نتیجه سویههای مشابه با حمایت بالای بوت استرب در یک کلاد مشترک قرار گرفتند.

در مطالعهای توسط سیهوونن و همکاران (Sihvonen 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 Calothrix، سیانوباکتریایی متعلق به Gloeotrichia و Tolypothrix که از لحاظ ریختشناختی مشابه بودند دریافتند که Calothrix, Gloeotrichia و Tolypothrix یک گروه منوفیلتیک 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.

مولستينوا و همكارانش (Muhlsteinova et al. 2014) از توالى ژن ITS 238 ITS به عنوان ماركر مولكولى براى طبقهبندى 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 می تواند بر ساختار ثانویه اثر بگذارد. مقایسه اپرانهایی که اصلا 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 می توان 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

ITS نشان داده شد که سویه Anabaena sp. Alborz 4 دارای یک Anabaena sp. Alborz 3 است و ناحیه V3 ندارد، اما سویه tRNA دارای دو tRNA و ناحیه V3 است. سه سویه tRNA و ناحیه 9 sp. Alborz 2, Neowestiellopsis sp. Alborz 6 و دو V3 هر سه دارای ناحیه V3 هر سه دارای ناحیه V3 و دو tRNA بودند، اما تعداد نوكلئوتيدهاي آنها با يكديگر تفاوت داشت. گُنزالس 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 ISS 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 جديد 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 BOX B تعداد نوکلئوتیدها متفاوت بودند. در این مطالعه نیز، دو سویه Desmonostoc sp. Alborz 5 و D1-D1 تنها در لوپ ابتدایی بخش 'Desmonostoc sp. Alborz 10 تفاوت داشتند، اما سویه Nodularia sp. Alborz 9 با سویههای مشابه خود تنها در تعداد نوکلئوتید پایه انتهایی متفاوت بود و در تعداد نوكلئوتيد BOX B نيز تفاوت داشتند.

ریوندی و همکاران (Rivandi et al. 2021)، به بررسی های 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 مهم ترین تفاوت سویه سمی Anabaena sp. B3 با سایر سویههای غيرسمى .Anabaena sp تعداد نوكلئوتيدهاى لوپ انتهايي 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 5 و Desmonostoc sp. Alborz 10 و Alborz 5 تنها در تعداد نوكلئوتيد

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 *Scytonema* sp. N11 و *Calothrix* sp. N42 و *Scytonema* sp. N11 مشکلساز و گیج کننده بود. چالشها زمانی به وجود آمد که از منظر ریختشناختی، به نظر می رسید این دو سویه *Calothrix* هستند، با 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 می گیرند که به عنوان *Scytonema* sp. N11 و *Calothrix* sp. N42 نام گذاری شدند.

أسريو و همكاران (Osorio-Santos et al. 2014) سويه Oculatella را جداسازی، توالی یابی و آنالیز کردند. آنالیز فیلوژنتیکی براساس ژن Oculatella 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 مجزا شد و هفت گونه جدید معرفی بیشتر ITS منجر به طبقهبندی گونه مجزا شد و هفت گونه جدید معرفی شد. آنالیز منطقه ITS در هفت گونه مجزا شد و هفت گونه جدید معرفی بیشتر ITS در هفت گونه ماه است و حداقل دو اپران دارد که بیشتر RNA و دیگری RNA ندارد. مارپیچها در اپرانهای مختلف ساختارهای مشابهی داشتند. ساختمان مارپیچ 'ID-ID مختلف ساختارهای مشابهی داشتند. ساختمان مارپیچ 'ID-ID داشت. در این مطالعه نیز، سویه Calothrix sp.Alborz 7 هر دو داشت. در آن حذف شده بود، در حالی که سویههای مشابه دارای دام در آن حذف شده بود، در حالی که سویههای مشابه دارای دو RNA مد و در سویه RNA در ایم دام دارای هر دو در RNA در آن حذف شده بود، در حالی که سویههای مشابه دارای دو RNA حفظ شده و در سویه RNA مشابه حذف گردیدهاند.

نوروزی و شالگین (Nowruzi & Shalygin 2021) موفق به شناسایی یک سویه جدید سیانوباکتری به نام *Dulcicalothrix* این alborzica sp. nov. 16S-23S ITS و rpoC1 ، rbcL و rbc2 و roc2 ISS-23S ITS انجام گردید. بررسیهای ریختشناختی نشان داد که این سویه متعلق به جنس *Calothrix* است، اما آنالیز ژن ISS rRNA نشان داد که در کلاستر *Dulcicalothrix* قرار دارد. برای تایید طبقهبندی این سویه جدید از مارکرهای rbc1 و rpoC1 ریز استفاده شد و نتایج

www.SID.ir

ساختار ثانویه Alborzica نشان داد که سویه Alborzica در مقایسه با Dulcicalothrix دارای ساختار منحصر به فرد است. در این مطالعه نیز دو ژن IGs 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 . امان مرازم این شناسایی با استفاده از ژن مزارع استان کرمانشاه شدند. این شناسایی با استفاده از ژن مارکرهای RNA-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. شُکرایی 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 اثرانگشت نگاری ژنومی مستند از هفت سویه سیانوباکتری مشابه هم را در ايران با استفاده از سه نوع توالي پاليندرومي 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 مشکل تر است. روش انگشتنگاری PCR ممکن است وسیله با ارزشی برای مطالعات تنوع و طبقهبندی سیانوباکتریهای همزیست با Azolla و تكامل بین سیانوباكترىها و میزبانان مربوطه باشد. روش مذكور همچنین، برای تاکسونومی Azolla نیز بسیار مفید است .(Thajuddin et al. 2010)

همان طور که قبلا نیز اشاره شد، تاکسونومی صحیح میبایست ترکیبی از ویژگیهای ریخت شناسی نمونه ها با روش های چندفازی شامل اطلاعات فنوتیپیک، کموتاکسونومیک و ژنوتیپی باشد. بسیاری از ویژگیهای ریخت شناختی 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 می دهد. استفاده از دو مارکر ژنتیکی ITS و ITS و ITS برای شناسایی سویهها و رسم درخت مفیدند و میتوانند به عنوان یک کلید تشخیص برای تمایز بین فیلوژنتیکی نشان داد که سویههای مشابه با حمایت بالای بوت 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 IGS rRNA و ITS و توالیهای تکرارشونده پشت سرهم را به عنوان مارکرهای مولکولی برای ارزیابی تنوع سویههای سیانوباکتری تایید می کند.

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.

استرپ در یک کلاد مشترک قرار گرفتند. به علاوه، از مطالعه حاضر نتیجه گرفته می شود که توالی های تکراری یافت شده در ژنوم سیانوباکتریها به ویژه توالیهای پالیندرومی تکراری HIP به همراه توالى هاى STRR و ERIC و STRR در كشف ارتباطات ژنومی و تعیین نوع در میان سویههای مورد مطالعه بسیار

- Driscoll, C.B., Meyer, K.A., Šulčius, 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 filamentous cyanobacteria. Journal of and 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.
- Kabirnataj, 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.

- Komárek, J. 2013. Süßwasserflora von mitteleuropa, Bd. 19/3: cyanoprokaryota. 3. Teil/3rd part: heterocytous genera. Süßwasserflora von Mitteleuropa. Spektrum Academischer 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.