گزارش جدیدی از بررسی تغییرات مورفولوژیک دو گونه *Nostoc ellipsosporum* و *Nostoc muscorum* در دو محیط کشت Allen's و Benecks در طی سیکل زندگی

بهاره نوروزی* و علی احمدی مقدم

کرمان، دانشگاه شهید باهنر، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت ۸٤/۱۲/۱٦ تاریخ پذیرش:۸۵/۱۱/۱٤

چکیده

در سالهای اخیر آرایه شناسی(تاکسونومی) جلبکهای سبزآبی بعلت تغییرات مورفولوژیک در محیط کشتهای مختلف، مورد بحث جلبک شناسان است. بمنظور تعیین یک سیستم بهتر برای آرایه شناسی(تاکسونومی) آنها، با توجه به محیط کشتهای مختلف، هدف از این تحقیق ارائه محیط کشتی است که بیشترین میزان ثبات در خصوصیات بیومتری گونه ها مانند عرض فیلامان یا تریکوم، اندازه سلول، هتروسیست و اسپور را که در محیطهای کشت بسیار متغیر ظاهر، و باعث رشد نرمال ارگانیسمها بدون بوجود آوردن هیچ تغییر مورفولوژیکی شود. در این مطالعه دو گونه خالص شده *N.ellipsosporum* و*N.muscorum* که از فراوان ترین گونه های شناسایی شده در شالیزارهای استان گلستان است در دو محیط کشت, تغییر یافته(1955) Allen's و(1939) Benecks کشت داده شد. تغییرات مورفولوژیک شش فاکتور طول و قطر هتروسیست، آکاینت و سلول رویشی از ابتدای روز تلقیح تا پایان فاز ایستایی (روز ۲۱) اندازه گیری شد: مشاهدات نشان داد که سلولهای رویشی هر دو گونه، در محیط کشت Benecks کاملاً مارپیچی و فنر مانند می شوند و این حالت تا پایان آزمایش ادامه دارد. هتروسیستها نیز در این محیط استخوانی شکل می شوند اما در محیط کشت Allen's سلولها شکل طبیعی خود را حفظ می کنند. نتایج آنالیز آماری داده های حاصل از آزمایش فاکتوریل اجرا شده در چهار چوب طرح کاملاً تصادفی، نشان داد که بین تمام پارامترهای اندازه گیری شده تفاوت معنی داری در سطح ۹۵ درصد وجود دارد. نتایج حاصل از آزمون دانکن و ترسیم دندرو گرام نیز نشان می دهد که در بیشتر خصوصیات اندازه گیری شده در دو محیط تفاوت معنی دار است. از این رو جهت بدست آوردن کشتهایی با ثبات مورفولوژیکی بیشتر محیط Allen's پیشنهاد می شود. با اینحال در بررسی حاضر کلیدهای شناسایی بر اساس تغییرات بدست آمده در هر دو محیط کشت تهیه شد.

واژه های کلیدی: تغییرات مورفولوژیک، Nostoc، Allen's ، Benecks، سیکل زندگی

* نویسنده مسئول، تلفن تماس: ۰۹۱۱۳۷۱۰۹۵٦ ، پست الکترونیک: bahare77biol@yahoo.com

مقدمه

آرایه شناسی(تاکسونومی) جلبکهای سبز- آبی در سالهای اخیر موضوعی است که اختلافات قابل توجهی را در بین جلبک شناسان بوجود آورده است. مطالعه روی ایزوله ها با استفاده از محیط کشتهای مختلف مشکلات زیادی را در شناسایی با استفاده از کلیدهای کلاسیک بعلت ایجاد واریاسیون در طول آزمایش و عدم ثبات بعضی از ویژگیهایی مورد استفاده در شناسایی می شود. از این رو لازم است تا گونه های متفاوتی را که بر اساس کلیدهای معمولی شناسایی شده اند در محیط کشتهای مختلف نیز کشت داده و تغییرات مورفولوژیک آنها را بررسی و با کلیدهای موجود مقایسه کنند و بر اساس مشاهدات جدید کلیدهای جدیدی نیز تهیه شود (۱۵). مهمترین هدف تخمین و ارزیابی یک سیستم بهتر طبقه بندی بوسیله تعیین محیط کشتهای ارجح تر است تا محیط کشتی با بیشترین

Archive of SID
www.SID.ir

میزان ثبات در خصوصیات بیومتری (Biometric) گونه ها ارائه شود، تا از رشد نرمال ارگانیسمها بدون بوجود آوردن هیچ تغییر مورفولوژیکی حمایت کند زیرا گونه ها بمقدار زیادی متغیر و در محیطهای کشت تغییر می کنند.

آزمایشات انجام شده بر ایزوله های مختلفی از آنابنا توسط محققین مختلف و بر اساس معیارهای مورفولوژیک بخوبی نشان داد که دانشمندان مختلف ایزوله های آنابنا را به نامهای مختلف خواندند. ابتدا تصور آنها این بود که شاید شرایط رشد برای ایزوله ها مختلف است اما آزمایشات دیگر نشان داد که چطور نمونه هایی از ایزوله نوستوک بوسیله دو همکار در شرایط کاملا یکسان بصورت کاملا متفاوت شناسایی شد. آزمایشات دیگری روی گونه های دیگر سیانوباکتری مانند اسکیتونما(Scytonema) ، آلوزیرا (Aulosira) ، تولیپوتریکس(Tolypothrix) ، در دو محیط کشت چو۱۰(Chu 10) و محیط کشت آلن و آرنون (Allen and Arnon) نشان داد که تغییرات مورفولوژی نمونه ها در محیط کشت موجب تردید در شناسایی گونه ها می شود (۲۵ و ۱۸).

بنابراین مهمترین و مشکل ترین وظیفه آرایه شناس (تاکسونومیست) این است که تصمیم گیری در مورد یک ویژگی مخصوص است که باید مورد توجه قرار بگیرد یا نه و این ویژگی بخصوص در آن گونه ثابت باشد. برای مثال در گونه های نوستوک این ویژگیها شامل شکل آکاینتها و سلولهای رویشی (برای نمونه فقط کروی یا فقط استوانه ای)، محل شکل گرفتن آکاینتها، شکل فیلامان (راست یا مارپیچ)، شکل هتروسیستها، اندازه و ابعاد سلولها می باشد (٤).

محیطهای کشت برای مطالعات تاکسونومی گونه های مختلف سیانوباکتر بسیار مهم است. بسیاری از شناساییها خیلی سطحی و بطور نا صحیح انجام می شود. این چنین اشتباهاتی منجر به اشتباهات زیادی در تحقیقات آزماشگاهی می شود. بنابراین باز نگری کلیدهای شناسایی بر پایه این مطالعات ضروری و اجتناب نا پذیر است.

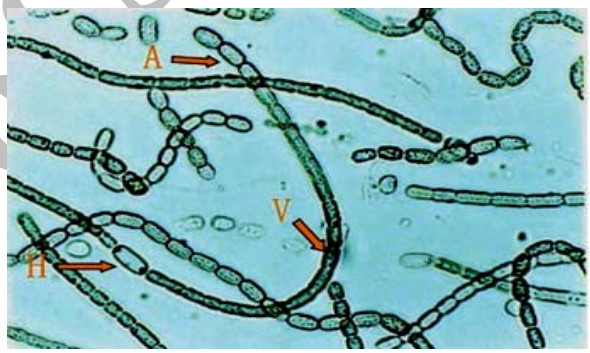
باتوجه به اینکه اغلب مطالعات اکوفیزیولوژی گیاهان بر روی گونه های زراعی گلدار صورت می گیرد امید است انجام یک سری مطالعات اکوفیزیولوژیک از قبیل بررسی تغییرات مورفولوژیک دو گونه ای که برای اولین بار از استان گلستان گزارش می شود در زمره مطالعات جدید اکوفیزیولوژی سیانوباکتریها در ایران باشد.

مواد و روشها

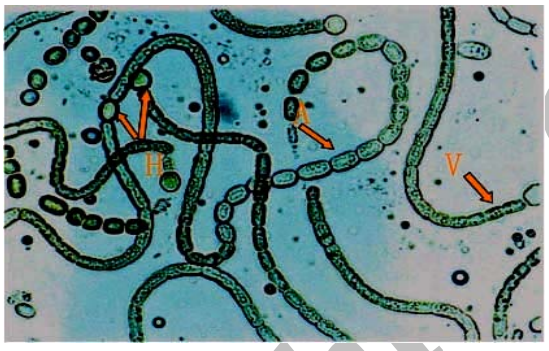
در پاییز ۱۳۸۲ از پنج شالیزار (سرخنکلاه، جلین، هاشم آباد، اوزینه، یامپی) نمونه برداری از سطح تا عمق پنج سانتیمتری سطح خاک انجام شد (۱۹ و ٢٤). سپس پنج گرم از هر نمونه خاک با محیط کشت (گرم بر لیتر)-BG 11(شامل محلول عناصر ماکروالمنت: K_2HPO_4: ۰/۰٤ گرم. $MgSO_4$: ۰/۰۷۵گرم. $CaCl_2$: ۰/۰۳٦ گرم. اسید سیتریک: ۰/۰۰٦گرم. EDTA: ۰/۰۰۱گرم. $NaCO_3$: ۰/۰۲ گرم. محلول عناصر کمیاب: ۱ میلی لیتر شامل(H_2BO_3: ۲/۸٦ گرم. $MnCl_24H_2O$: ۱/۸۱ گرم. $ZnSO_47H_2O$: ۰/۲۲۲ گرم. $NaMoO_4$: ۰/۳۹ گرم. $CuSO_45H_2O$: ۰/۰۷۹گرم. $CoSo_47H_2O$: ٤۹/٤ میلی گرم در یک لیتر آب مقطر) مخلوط و سوسپانسیون تهیه شد (۱۱، ۱۲، ۱۳، ١٤، ١٦، ۲۳ و ۲۷). نمونه خاکها در اطاقک رشد با دمای ۲۸ درجه سانتی گراد و شدت نوری ۱۵۰۰ تا ۲۰۰۰ لوکس قرار گرفت(۷ و ۱۷). این میزان شدت نور توسط لامپهای فلورسنت سفید چهل وات در فاصله چهل سانتیمتری از سطح تأمین گردید. شدت نور با دستگاه لوکس متر اندازه گیری شد. پس از دو هفته کلنیهای حاصل از سیانوباکتریهای هتروسیست دار در محیط کشت جامد BG-11 خالص سازی (٦، ۱۷، ٢٤ و ۳۱) و در نهایت شناسایی گونه های حاصل بر طبق کلیدهای شناسایی پرسکات (۲٦)، دسیکاچاری(۱۰)، آناند(۳)، آناگنوستیدیس و کومارک(۲) ، استاینر (۳۰)، ریپکا و همکاران (۲۷)،

Archive of SID
www.SID.ir

سنترا (۲۹)، واتانابه و یاماگی شی (۳۳) انجام شد. در میان ۲۰ گونه شناسایی شده دو گونه *Nostoc ellipsosporum* و*Nostoc muscorum* (نوروزی) (۲۱) (شکل ۱ و ۲) که در تمام مناطق نمونه برداری شده حضور فراوان داشتند انتخاب، ابعاد آنها اندازه گیری و کشت خالص از آنها تهیه شد. این دو گونه برای اولین بار از ایران گزارش می شوند (۲۲). بمنظور بررسی تغییر شکل مورفولوژی، دو گونه منتخب، در دو محیط کشت تغییر یافته آلن (گرم بر لیتر)(۲۹) شامل (محلول عناصر ماکروالمنت: K_2HPO_4: ۰/۰٤گرم. $MgSO_4$: ۰/۰۷۵گرم. $CaCl_2$: ۰/۰۲ گرم. اسید سیتریک: ۰/۰۰٦گرم. EDTA: ۰/۰۰۱گرم. $NaCO_3$: ۰/۰۲گرم. Na_2SiO_3. $(9H_2O)$: ۰/۰٦ گرم. $FeCL_3$: ۰/۰۰۲ گرم. محلول عناصر کمیاب: ۱ میلی لیتر شامل(H_2BO_3: ۲/۹ گرم. $MnCl_24H_2O$: ۱/۸۱ گرم. $ZnSO_47H_2O$: ۰/۲۲۲ گرم. $NaMoO_4$: ۰/۳۹ گرم. $CuSO_45H_2O$: ۰/۰۸گرم. $CoSo_47H_2O$: ۰/۰۵ گرم در یک لیتر آب مقطر) و محیط تغییر یافته بنک (گرم بر لیتر)(۲۹)شامل: ($MgSo_4$, 7 H_2o: ۰/۰۲ گرم. K_2HPO_4: ۰/۰۲ گرم. $CaCl_2$: ۰/۱ گرم. $FeCL_3$: ۲ قطره و آب مقطر: یک لیتر) کشت شد. جهت رشد نمونه های مورد مطالعه، نمکهای نیتروژنه از محیط کشتها حذف گردید. pH هر سه محیط کشت در حدود ۷/٤ تنظیم شد. یک گرم از هر نمونه وزن و به ۳ ارلن ۵۰۰ میلی لیتری تلقیح و جهت یکنواختی روی شیکر قرار گرفت.



شکل ۱: *Nostoc ellipsosporum* با بزرگنمایی ٤۰۰ X.



شکل ۲: *Nostoc muscorum* با بزرگنمایی X٤۰۰.

گاز کربنیک مصنوعاً هر روز، روزی ۱ ساعت توسط شلنگ مخصوص گاز در زیر لامینار فلو به هر ارلن داده شد. این کار هم سبب تأمین منبع CO_2 برای سیانوباکترها تأمین شود و هم ممانعت از چسبیدن نمونه ها به کف ظرف می شود (۱۷، ۲۰، ۲۸ و ۳۱). بررسی تغییرات مورفولوژیک از روز اول در زیر میکروسکپ نوری مدل (Olympus: C-7000) انجام و تا ۲۰ روز ادامه داشت. ٦ فاکتور طول هتروسیست، قطر هتروسیست، طول آکاینت، قطر آکاینت، طول سلول رویشی، قطر سلول رویشی روزانه اندازه گیری و برای هر فاکتور اندازه گیری شده، از هرفیلامان در هر ارلن۳ سلول بصورت تصادفی انتخاب گردید و در مجموع برای هر گونه و برای هر فاکتور در هر روز ۹ تکرار اندازه گیری و در خاتمه برای هر روز کلید شناسایی برای هر دو گونه در دو محیط کشت تعیین گردید. این آزمایش بصورت آزمایش ۳ فاکتوریل ۲×۲۰×۲ و در چارچوب طرح کاملا تصادفی انجام شد، که در آن ۲۰ تعداد روزها و ۲ تعداد گونه ها و تعداد محیطهای کشت است. پس از انجام آزمایشات ذکر شده داده های حاصل از هر آزمایش با نرم افزار SPSS (Version 9.0) و Excel آنالیز شد.

Archive of SID
www.SID.ir

نتایج

شرح دو گونه *N.muscorum* و *N.ellipsosporum* در محیط کشت جامد BG-11 و قبل از انتقال به محیط کشت مایع به این صورت گزارش گردید:

Nostoc muscorum

سلولها کروی یا بطور جزئی بلندتر از عرض، زیتونی رنگ، ٥-٤ میکرون عرض و۷ تا ٥/٥ میکرون طول دارند و هتروسیستها گاهی اوقات کروی ۷ -٤/٥ میکرون عرض و ٨/٥-٤ میکرون طول دارند. اسپورها مستطیلی تعداد زیادی در یک زنجیره، ٦-٥ میکرون عرض و ١١-٦/٥ میکرون طول دارند، تالوس ژلاتینی، فیلامانها در هم پیچیده، بصورت نامنظم و زیتونی تیره می باشند.

Nostoc ellipsosporum

سلولها شبیه به هم استوانه ای، سبز- آبی روشن یا زیتونی رنگند، ٤-٣/٥ میکرون عرض و ١١-٧ میکرون طول دارند. هتروسیستها گاهی اوقات کروی یا مستطیلی ٦/٥-٥ میکرون عرض و ١٢/٥-٦ میکرون طول دارند. اسپورها بیضوی یا مستطیلی ٥/٥-٥ میکرون عرض و ١٢-١٠ میکرون طول دارند. توده گیاهی ژلاتینی، وسیع، مایل به قهوه ای یا تیره رنگ است.

نتایج حاصل از آزمون واریانس یک طرفه در مورد هر یک از فاکتورهای اندازه گیری شده در طول این بیست روز نشان داد که تفاوت معنی داری در میانگین ابعاد سلولها بین روزهای مختلف وجود دارد. بنابراین با توجه به تفاوت معنی دار لازم بود تا در این تحقیق برای هر گونه هم در محیط کشت جامد و هم در محیط کشت مایع در هر روز در طول فازهای تأخیری. لگاریتمی و ثابت یک کلید مجزا نوشته شده است که در نهایت با استفاده از اعداد به دست آمده آنالیز آماری گردد. جداول آماری برای هر گونه و هر محیط کشت بصورت مجزا نشان داده شده است (جدولهای ١، ٢، ٣ و ٤).

جدول(١): نتایج حاصل از آنالیز واریانس یک طرفه مربوط به اندازه گیری شش پارامتر در گونه ***N.ellipsosporum*** در محیط کشت تغییر شکل یافته آلن (P<٠/٠٥).

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
طول هتروسیست	Between Groups	148.360	20	7.418	5.250	.000
	Within Groups	237.389	168	1.413		
	Total	385.749	188			
قطر هتروسیست	Between Groups	40.461	20	2.023	6.005	.000
	Within Groups	56.598	168	.337		
	Total	97.059	188			
طول آکاینت	Between Groups	216.501	20	10.825	9.276	.000
	Within Groups	196.047	168	1.167		
	Total	412.548	188			
قطر آکاینت	Between Groups	42.749	20	2.137	6.098	.000
	Within Groups	58.889	168	.351		
	Total	101.638	188			
طول سلول رویشی	Between Groups	78.193	20	3.910	2.003	.009
	Within Groups	327.944	168	1.952		
	Total	406.138	188			
قطر سلول رویشی	Between Groups	10.349	20	.517	5.529	.000
	Within Groups	15.722	168	9.358E-02		
	Total	26.071	188			

Archive of SID
www.SID.ir

جدول (۲): نتایج حاصل از آنالیز واریانس یک طرفه شش پارامتر در گونه *N.muscorum* در محیط کشت تغییر شکل یافته آلن (P<۰/۰۵).

Sig.	F	Mean Square	df	Sum of Squares		
.000	3.970	5.482	20	109.643	Between Groups	طول هتروسیست
		1.381	168	232.000	Within Groups	
			188	341.643	Total	
.006	2.112	1.208	20	24.163	Between Groups	قطر هتروسیست
		.572	168	96.109	Within Groups	
			188	120.272	Total	
.000	3.685	5.580	20	111.606	Between Groups	طول آکاینت
		1.514	168	254.389	Within Groups	
			188	365.995	Total	
.000	8.225	2.200	20	44.008	Between Groups	قطر آکاینت
		.268	168	44.944	Within Groups	
			188	88.952	Total	
.000	4.977	3.981	20	79.630	Between Groups	طول سلول رویشی
		.800	168	134.389	Within Groups	
			188	214.019	Total	
.000	22.969	1.884	20	37.675	Between Groups	قطر سلول رویشی
		8.201E-02	168	13.778	Within Groups	
			188	51.452	Total	

جدول(۳): نتایج حاصل از آنالیز واریانس یک طرفه شش پارامتر در گونه *N.muscorum* در محیط کشت تغییر شکل یافته بنک (P<۰/۰۵).

Sig.	F	Mean Square	df	Sum of Squares		
.000	3.740	5.032	20	100.649	Between Groups	طول هتروسیست
		1.346	168	226.069	Within Groups	
			188	326.718	Total	
.000	12.206	6.301	20	126.016	Between Groups	قطر هتروسیست
		.516	168	86.722	Within Groups	
			188	212.738	Total	
.000	8.115	16.098	20	321.960	Between Groups	طول آکاینت
		1.984	168	333.258	Within Groups	
			188	655.218	Total	
.000	8.673	2.140	20	42.794	Between Groups	قطر آکاینت
		.247	168	41.444	Within Groups	
			188	84.238	Total	
.007	2.071	1.865	20	37.310	Between Groups	طول سلول رویشی
		.901	168	151.333	Within Groups	
			188	188.643	Total	
.000	34.503	2.430	20	48.606	Between Groups	قطر سلول رویشی
		7.044E-02	168	11.833	Within Groups	
			188	60.439	Total	

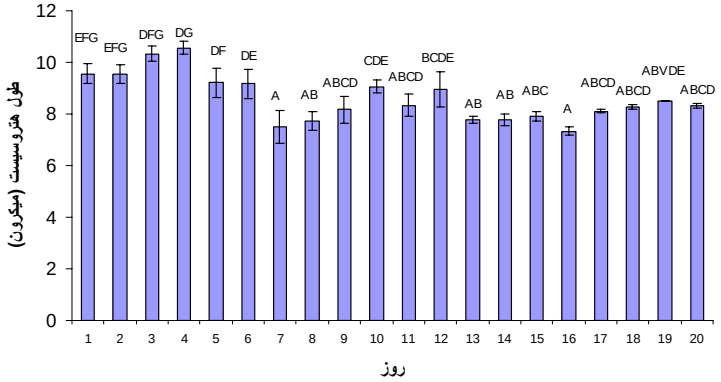
جدول(٤): نتایج حاصل از آنالیز واریانس یک طرفه شش پارامتر در گونه *N.ellipsosporum* در محیط کشت تغییر شکل یافته بنک (P<۰/۰۵).

Sig.	F	Mean Square	df	Sum of Squares		
.000	14.165	4.491	20	89.822	Between Groups	قطر هتروسیست
		.317	168	53.264	Within Groups	
			188	143.087	Total	
.000	18.560	35.015	20	700.296	Between Groups	طول آکاینت
		1.887	168	316.944	Within Groups	
			188	1017.241	Total	
.000	17.818	11.331	20	226.619	Between Groups	طول سلول رویشی
		.636	168	106.833	Within Groups	
			188	333.452	Total	
.000	16.051	1.529	20	30.574	Between Groups	قطر سلول رویشی
		9.524E-02	168	16.000	Within Groups	

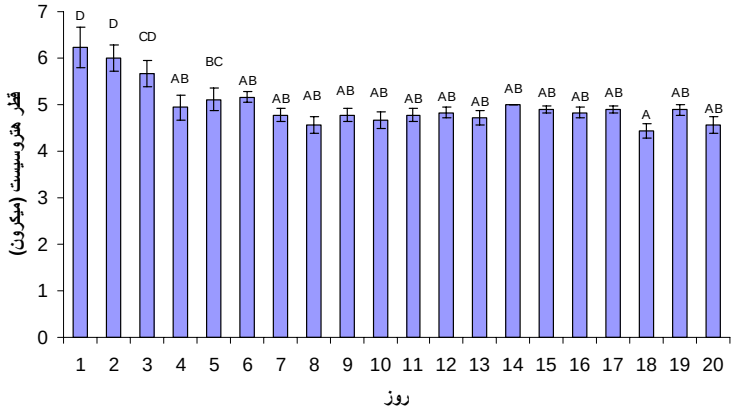
Archive of SID
www.SID.ir

			188	46.574	Total	
.000	40.276	6.287	20	125.730	Between Groups	قطر آکاینت
		.156	168	26.222	Within Groups	
			188	151.952	Total	
.000	4.177	5.732	20	114.646	Between Groups	طول هتروسیست
		1.372	168	230.556	Within Groups	
			188	345.201	Total	

نتایج حاصل از آزمون دانکن نشان داد که تغییرات قطر هتروسیست، قطر آکاینت، طول سلول رویشی و قطر سلول رویشی *N. ellipsosporum* در محیط کشت تغییر شکل یافته بنک بیشتر از آلن و تغییرات طول آکاینت، قطر آکاینت و طول سلول رویشی *N.muscorum* در محیط کشت آلن بیشتر از بنک است. در کل نتیجه می شود که گونه *N.ellipsosporum* در طول سیکل زندگیش در محیط کشت بنک بسیار تغییر پذیرتر از محیط کشت آلن و گونه *N.muscorum* در محیط کشت آلن بسیار تغییر پذیر تر از بنک است (شکلهای ۳ و ٤ . تنها دو مورد نشان داده شده است).

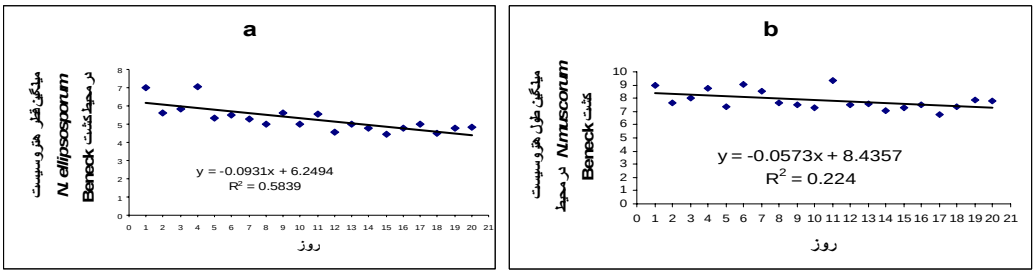


شکل ۳: نتایج حاصل از اندازه گیری طول هتروسیست با استفاده از آزمون دانکن در طول بیست روز در گونه *Nostoc ellipsosporum* در محیط کشت آلن. هر ستون میانگین حداقل ۹ تکرار است. خطوط خطا SE میانگینها هستند. ستونهایی که حروف مشابه دارند تفاوت معنی داری با هم ندارند (P<0/05).



شکل ٤: نتایج حاصل از اندازه گیری قطر هتروسیست با استفاده از آزمون دانکن طی بیست روز در گونه *Nostoc ellipsosporum* در محیط کشت آلن. هر ستون میانگین حداقل ۹ تکرار است. خطوط خطا SE میانگینها هستند. ستونهایی که حروف مشابه دارند تفاوت معنی داری با هم ندارند (P<0/05).

www.SID.ir



شکل ۵: a-b نشان دهنده کاهش ابعاد سلولها تا پایان فاز ایستایی است (تنها دو مورد نشان داده شده است).

در نهایت مجموعه اعداد بدست آمده بصورت دندروگرام برای هر گونه در هر فاکتور و در هر محیط کشتی بصورت جداگانه رسم گردید (نتایج نشان داده نشده است). نتایج حاصل از رسم دندروگرامها تغییرات ابعاد هر فاکتور اندازه گیری شده در طول سیکل زندگی را نشان می دهد. این تغییرات در مواردی در طول فازهای رشد در یک گروه و در مواردی در جند گروه قرار می گیرند که ثابت کننده این تغییرات مورفولوژی در طول سیکل زندگی است. نتایج حاصل از اندازه گیری ابعاد سلولهای دو گونه *N.ellipsosporum* و *N.muscorum* در طول سیکل زندگی با استفاده از برنامه Excel نشان داد که ابعاد تمام فاکتورهای اندازه گیری شده در طول سیکل زندگی کاهش یافته می یابد (شکلهای ۵ ، a-b. تنها دو مورد نشان داده شده است).

بحث

نتایج حاصل از بررسی تغییرات مورفولوژیک دو گونه *N.muscorum* و *N. ellipsosporum*، در دو محیط کشت مایع تغییر شکل یافته آلن و بنک، در مورد هر یک از فاکتورهای اندازه گیری شده در طول این بیست روز نشان داد که تغییرات قطر هتروسیست، قطر آکاینت، طول سلول رویشی و قطر سلول رویشی *N. ellipsosporum* در محیط کشت تغییر شکل یافته بنک بیشتر از آلن و تغییرات طول آکاینت، قطر آکاینت و طول سلول رویشی *N. muscorum* در محیط کشت آلن بیشتر از بنک است. در کل نتیجه می شود که که گونه *N. ellipsosporum* در طول سیکل زندگیش در محیط کشت بنک بسیار تغییر پذیرتر از محیط کشت آلن است و گونه *N. muscorum* در محیط کشت آلن بسیار تغییر پذیر تر از بنک است. در ضمن توجه به ترکیبات موجود در محیطهای کشت نشان می دهد که محیط آلن هم از نظر ماکرو و هم میکرو المانها غنی تر از محیط کشت بنک می باشد. بنابر این احتمال دارد که وجود ماکرو و میکرو المانها در محیط کشت آلن مسبب تغییرات مورفولوژیک کمتر در گونه *N. ellipsosporum* باشد. گونه *N. muscorum* هم که دارای تغییرات مورفولوژیک کمتری در محیط کشت بنک است احتمالاً بدلیل عدم وجود میکروالمانها و یا بعضی از ماکروالمانها باشد. این دلایل مسائلی است که برای اثبات آن نیاز به تحقیقات بیشتر روی گونه های مختلف دارد بنابراین نمی توان بطور قطع گفت که چه عاملی تأثیر گذار است. همینطور نتایج حاصل از رسم دندروگرامها تغییرات ابعاد هر فاکتور اندازه گیری شده در طول سیکل زندگی را نشان داد. این تغییرات در مواردی در طول فازهای رشد در یک گروه و در مواردی در چند گروه قرار می گیرند که ثابت کننده این تغییرات مورفولوژی در طول سیکل زندگی است. انتظار نمی رود که این تغییرات طبیعتاً در طول هر یک از فازهای رشد در یک خوشه وجود داشته باشند چون مشاهدات و اندازه گیری ابعاد سلولها در هرریسه جلبکی نه عدد و بطور کاملاً تصادفی بوده است .وجود دندروگرامها صرفاً نشان دهنده تغییرات ذکر شده در هر روز در مورد هر فاکتور در طول سیکل زندگی این دو گونه است. بنظر می رسد. برای درک بهتر تأثیر و هماهنگی تغییرات صفات مختلف مطالعات

Archive of SID
www.SID.ir

دقیقتر در حد ساختمان ژنتیکی این موجودات لازم باشد. بعنوان مثال بهتر است همبستگی و یا عدم همبستگی ژنها را مشخص کرد. این امر می تواند موضوع بسیار جالبی در تحقیقات آینده باشد.

بدلیل ایجاد تغییر در طول آزمایش و عدم ثبات بعضی از ویژگیهای مورد استفاده برای شناسایی اختلافات قابل توجهی در میان جلبک شناسان در مورد تاکسونومی آنها وجود دارد. یافتن اینکه آیا سیانوباکتریها شامل یک یا چندین ژنوتایپ هستند که باعث ایجاد مورفولوژی ثابت یا موقتی در آنها می شود کاری است که نیاز به تحقیق دقیق تری دارد. بهرحال برای شناسای نمونه ها در حال طبیعی کلیدهای کلاسیک خوب هستند اما برای نمونه های کشت شده احتیاج به سیستم متفاوتی است و برای اینکه این مشکلات تنوع مورفولوژیک در شناسایی سیانوباکتریها حل شود باید گونه ها بصورت زنده در طبیعت و در محیط کشت با یکدیگر مقایسه شود زیرا با توجه به مشاهدات حاصل از آزمایش دیده می شود که گونه ها در محیط کشت اشکال غیر معمول و غیر واقعی در مقایسه با حالت طبیعی ایجاد می کنند بنابر این پیشنهاد می شود برای اینکه اطلاعات استانداردی در مورد جمعیتهای گونه های موجود در مزارع و سویه های آزمایشگاهی داشته باشیم پس باید در کنار مشاهدات میکروسکپی جلبکهای سبز- آبی از یک سری کارهای مورفولوژیکی و سیتولوژکی با استفاده از تکنیکهای مدرن مثل مقایسه فراساختمان سلولها و مطالعه اختلاف در خصوصیات فیزیولوژیک مانند نمودار پروتئین، اسیدهای چرب، فتوهتروتروفی، میانگین ترکیبات باز و نیز خصوصیات بیوشیمیایی نیز استفاده شوند. در این رابطه می توان به تحقیقات انجام شده توسط محققین زیادی از جمله اسکولبرگ و آناگنوستیدیس (Skulberg and Anagnostidis (1985)) روی جلبک سبز- آبی اسیلاتوریا (Oscilltoria) و کوهل و همکارانش (kohl et al (1985)) روی آفانوزومنون فلس آکوآ- (Aphanozomenon flos aquae) و گراسیل و اسماردا (Gracile and Smarda et al (1988)) روی نودولاریا (Nodularia) اشاره کرد (٤، ١٥، ١٨ و ٢٥).

نتایج حاصل از آنالیز آماری نشان می دهد که ابعاد سلولها تا پایان فاز ایستایی کاهش می یابد که این کاهش در مورد بعضی از فاکتورها با شدت و شیب بیشتر و یا کمتر است. تغییرات ابعاد سلولها از فاز لگاریتمی به فاز ایستایی اینطور توضیح داده می شود که معمولاً زمانی سلولها وارد فاز لگاریتمی می شوند که سرعت رشد به میزان ثابت برسد در این مرحله تمام سلولها تقریباً زنده و دارای اندازه ثابت هستند و در نتیجه به وزن سلولها و تعداد آنها بصورت موازی افزوده می شود. سلولها در یک حالت ثابت هستند و ماده سلولی جدید با یک سرعت ثابت در حال سنتز است. تا زمانی که مواد غذایی در محیط کشت تمام شود. برای ارگانیسمهای هوازی ماده ای که محدود می شود معمولاً اکسیژن است وقتی غلظت سلول افزایش می یابد سرعت رشد کاهش خواهد یافت مگر آنکه اکسیژن با تکان دادن یا راندن هوا بدرون محیط کشت تأمین شود اما وقتی غلظت باکتریها از حدی بیشتر شود سرعت انتشار اکسیژن حتی دریک محیط هوادار نیز نمی تواند تقاضا را تأمین کند و رشد بطور پیشرونده ای کاهش می یابد و سلول وارد فاز ایستایی می شود و میزان رشد بتدریج در اثر اضافه شدن محصولات متابولیکی سمی و کم شدن مواد غذایی رو به نقصان می گذارد. در آخر کشت وارد مرحله حداکثر رشد ثابت می شود و میزان رشد به صفر می رسد. با افزایش تعداد سلولها، کمبود نور، CO_2 و کاهش محتوی پیگمانهای فتوسنتزی و در نتیجه کاهش میزان فتوسنتز، توانایی جذب ترکیبات نیتروژنه در این شرایط افزایش می یابد و سلول دچار کمبود منابع نیتروژنه می شود. در سیانوباکتریها دو ماده ذخیره کننده نیتروژن درونی وجود دارد به نامهای گرانولهای پلی پپتیدی سیانوفایسین و فیکوسیانین. این مواد در طول فاز ایستایی در محیط کشتهایی که در محدودیت نیتروژن هستند توسط پروتئازهایی که وجود آنها ثابت شده است به مصرف سلول می رسند در نتیجه ابعاد سلول

Archive of SID
www.SID.ir

کاهش می یابد(۱، ۵، ۸، ۹ و ۳۲) کاهش ابعاد سلول با توجه به نتایج و رسم نمودار کاملاً مشخص است.

ثابت شده است که معمولاً اندازه سلولها با فراهم کردن مواد غذایی و همچنین بوسیله نرخ رشد جمعیتها می تواند تحت تأثیر قرار گیرد. تجربیات نشان داده است که نرخ رشد بیشتر باعث کوچکتر شدن اندازه سلول می شود. نرخ رشد نه تنها بوسیله فراهم ساختن مواد غذایی بلکه سایر فاکتورها مانند تابش یا دما نیز تعیین می شود. در موجودات پر سلولی اضافه شدن تعداد سلولها منجر به بزرگ شدن اندازه سلول می شود ولی در موجودات تک سلولی این موضوع منتهی به اضافه شدن تعداد افراد می گردد و سلولها کوچک می شوند(۱۸). که این موضوع با توجه به نتایج حاصل از کاهش اندازه سلولها تا فاز ایستایی کاملاً قابل توجیه است. دلیل دیگر برای کاهش اندازه سلولها ممکن است دماهای متفاوت باشد در آزمایشی محققین وابستگی اندازه سلول به دماهای متفاوت را در کشتهای ۱٦ سویه از گونه های *Anabaena* را مورد مطالعه قرار دادند. آنها مشاهده کردند که سلولها در شرایط متفاوت دمایی طویل می شوند. همچنین نتیجه گرفتند زمانیکه شرایط دمایی تغییر کند عرض سلول بیشتر از طول آن کاهش می یابد. دانشمندان دیگری به نامهای هافمن و دمولین (Hoffmann & Demoulin (1985)) تنوع مورفولوژی اسکیتونماتاسه(Scytonematacae) را در محیطهای کشت مطالعه کردند و یافتند که با کاهش شدت نور طول سلولها افزایش می یابد در حالیکه عرض سلولها نسبتاً ثابت باقی می ماند. بهر حال وابستگی اندازه سلولهای جلبکهای سبز- آبی به نرخ رشد یا به شرایط محیطی در طبیعت هنوز ثابت نشده است و این جنبه از کار نیاز به تحقیق دارد (٤).

همانطور که ذکر شد در طول زمان آزمایش مشخص شد که گونه *N. ellipsosporum* در محیط کشت بنک تغییرات مورفولوژیک بسیاری از خود نشان می دهد مثلا تغییر شکل هتروسیستها از حالت استوانه ای به استخوانی و نیز موزی شکل شدن سلولهای رویشی که این تغییرات برای بیننده ای که برای اولین بار این گونه را مشاهده می کند ممکن است جالب و غیر عادی باشد و احتمال دارد با گونه دیگری اشتباه تصور شود. با توجه به مشاهدات و نتایج حاصل از آنالیز آماری محیط کشت آلن برای رشد این گونه پیشنهاد می شود. زیرا این گونه تغییرات کمتری را در این محیط نشان می دهد. در گونه *N. muscorum* تغییرات ایجاد شده همانند *N. ellipsosporum* نیست با اینحال تغییر شکل هتروسیستها از حالت کروی به استوانه ای در طول سیکل زندگی در محیط کشت آلن بسیار مشاهده می شود. همین امرسبب شد که بارها با گونه *N. ellipsosporum* اشتباه شود. در نتیجه محیط کشت بنک با تغییرات کمتر مورفولوژی برای انجام کارهای تحقیقاتی با این گونه توصیه می شود.

از مقایسات انجام شده بین شرح گونه های متفاوت دو گونه توسط افراد مختلف درکلید های شناسایی گوناگون نتیجه می شود که وجود تفاوتهایی هر چند در حد میکرون ممکن است موجب مشکلاتی در تاکسونومی این موجودات شود بنابر این پیشنهاد می شود که تاکسونومی این موجودات هم در محیط کشت جامد و هم در محیط کشت مایع بررسی شود تا بتوان گونه ای را بطور قطع شناسایی کرد و همینطور وجود شرح گونه های جدید برای این موجودات در هر محیطی چه جامد و چه مایع به نظر ضروری می رسد .با اینکار هم می توان در مورد فلور هر منطقه اشراف کامل داشت و هم می توان از وجود تغییر شکلهای مورفولوژی در هر گونه و در هر محیطی اطلاع حاصل نمود.

Archive of SID
www.SID.ir

منابع

۱- آل محمد، محمد مهدی.۱۳٦۸، میکروبیولوژی، انتشارات دانشگاه تهران، ص:۱۳۷-۱۳۲.

2- Anagnostidis, K and Komarek, J., 1999. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 4-Nostocales. Arch. Hydrobiol. /Suppl., *Algological Studies*, 50- 53, pp. 248-317.

3- Anand, N., 1990. Hand book of blue-green algae. Printed by Gajendra singh Gahlot at shiva offset press, India. 173pp.

4- Anand, N., 1988. Culture studies and taxonomy of blue-green algae-certain identification problems algological studies, 9, pp. 141-147.

5- Anand, N. 2004. Algal growth phases including determination of the growth rate and population doubling time. 10, pp. 111- 138.

6- Anand, N. 2004. Cyanobacteria culture media. Printed by Gajendra singh Gahlot at shiva offset press, India. 173pp.

7- Bharati, S. G and Giriyappanavar, B. S. 1988. Effect of Diethyl Sulphate on two nitrogen fixing Blue-green algae.*phykos*.27.p.104-109.

8- Black, J. G., 2002. Microbiology. Printed in the United States of America, Pp.136- 163.

9- Boyd, R. F., Hoerl, B. G. and Medical, B., 1991. Microbiology. Printed in the United States of America, p. 91-115.

10- Desikhachary, T. V., 1959. Cyanophyta. Indian council of agricultural research publishers, pp. 185-565.

11- Fujita, Y., Takahashi, Y., Shonai, F., Ogura, Y and Matsubara, H., 1991. Cloning nucleotide sequences and differential expression of the *nif*H and *nif* H-like (*fix* C) genes from the filamentous nitrogen-fixing Cyanobacterium plectonema boryanum. *Plant cell physiol*, 32, pp. 1093-1106.

12- Helber, J. T., Johnson, T. R., Yarbrough, L. R and Hirschbergi, R., 1988. Effect of nitrogenous compounds on nitrogenase gene expression in anaerobic culture of *Anabaena variabilis. Journal of bacteriology*, pp. 558-563.

13- Helber, J. T., Johnson, T. R., Yarbrough, L. R and Hirschbergi, R. 1988. Regulation of nitrogenase gene expression in anaerobic culture of *Anabaena variabilis. Journal of bacteriology*, pp. 552-557.

14- Herdman, M., 2004. Pasteur Culture Collection of Cyanobacteria. 6, pp. 112- 127.

15- Hoffman, L. and Demoulin, V., 1985. Morphological variability of some species Of Scytonemataceae (cyanophyceae) under different culture conditions. Bull. SOC. ROY, Bot, Belgeique 118, pp.189-197.

16- Huang, T. C and Chow, T. J., 1991. Characterization of the *Calothrix* isolates from rice fields. *Botanical bulletin of academic sinica*, Vol 33, pp.23-31.

17- Kashic, B.D., 1987. Laboratory methods for Blue-green Algae. Associated publishing co, New Delhi, pp: 17-63.

18- Komarkova, J., 1988. Morphological varation in natural populations of *Anabaena lemmermanni* in respect to existence of anabaena utermoehlii, *Algological studies*, 9, pp. 93-107.

19- Mitra, A. K., 1950. The algal flora of certain Indian soils. *The Indian journal of Agricultural science*, Vol xxI, part IV, pp: 351-373.

20- Moreno, J., Vargas, M. A., Rodriguez, H., Rivas, J and Guerreo, M. G., 2003. Outdoor cultivation of a nitrogen-fixing marine Cyanobacteria *Anabaena. Biomolecular engineering*, 20, pp. 191-197.

21- Nowruzi B and Ahmadi Moghadam A., 2006. New record of two species of heterocystus cyanobacteria (*nostocaceae*) from paddy fields of golestan province. IRAN. Journ. BOT. Institute of agriculture. Vol 11, No (2), pp.171-174.

22- Nowruzi B., 2005. Ecological study of cyanobacteria in three ecosystems paddy fields, wheat fields and a forest in Golestan province. M. Sc thesis. University of shahid Bahonar. Kerman. Iran. pp. 52- 62.

23- Olvera-Ramirez, R., Coria –Cedillo, M., Canizares-Villanueva, R., Martinez –Jeronimo, F., Ponce-Noyola, T and Rios-Leal, E., 2000. Growth evaluation and bioproducts characterization of *Calothrix sp. Bioresource Technology*, 72, pp.121-124.

24- Pandy, D. C., 1981. A study on the Algae from paddy field soils of Ballia and Ghazipur districts of Uttar Pradesh India. Nova hedwigia, IX, P. 299-334.

25- Perona, E., Aboal, M., Bonilla, I and Mateo, P., 2003. Cyanobacteria diversity in a Spanish river determined by means of isolation of cultures. Morphological Variability of isolates in relation to natural populations. *Algological studies*, 109, pp. 475-486.

26- Prescott, G. W., 1962. Algae of western Great Lakes area. Cranbrook inst. Sci publ, pp. 521-550.

Archive of SID
www.SID.ir

27- Rippka, R, Josette, D, Waterbury, J.B, Herdman, M & Roger, Y. S., 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of Cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*, Vol 111, p. 1-61.

28- Sakamoto, T and Bryant, D. A., 1999. Nitrate transport and not photoinhibition limits growth of the freshwater Cyanobacterium Synechoccus species PCC 6301 low temperature. *Plant physiology*, V 119, pp. 785-794.

29- Santra, S. C., 1993. Biology of Rice fields blue green algae. Daya publishing House, 184 pp.

30- Stanier, R. Y., and Cohen-Bazire, G., 1977. Phototrophic Prokaryotes: The Cyanobacteria. *Annual Review of Microbiology*, pp. 225-274.

31- Thiel, T., and Pratte, B., 2001. Effect on Heterocyst differentiation of nitrogen fixation in vegetative cells of the Cyanobacterium Anabaena variabilis ATCC 29413. *Journal of bacteriology*, pp.280-286.

32- Tortora, G. J., Funke, B. R and Case, C. L., 1982. Microbiology. The Benjamin/Cummings publishing company. Inc, pp. 143-172.

33- Watanabe, M., and Yamagishi, T., 1979. Fresh water algae of Papua New Guinea blue –green algae from MT-Wilhelm. Reprinted from Syo kurokawa, pp. 67-85.

New records on morphological variation of *Nostoc muscorum* and *Nostoc ellipsosporum* on Benecks, and Modified Allen's, media during their life cycle.

Nowruzi B.* and Ahmadi –Moghadam A.

Dept. of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University, Kerman, I.R. of Iran

Abstract

As the morphological traits of cyanobacteria changes in different culture media, their taxonomical position has been argued in recent years. To determine a reliable taxonomic system concerning the culture media the main target is to have the highest rate of morphological stability in the medium where dimensions of filaments, trichomes, vegetative cells, heterocysts and spores have a normal frequency. *Nostoc ellipsosporum* and *Nostoc muscorum* which are the most frequent species of paddy fields in Golestan province were cultured on Allen's and Benecks culture media. Morphological variations of length and width of heterocysts, akinetes and vegetative cells were measured from day first up to the end of the experiment (21 days) meeting the static phase of growth. Observations showed that vegetative cells of both species became reformatted on Benecks medium being spiral up to the end of experiment. Heterocystous also had a bony form while in Allen's medium the species had their natural form. The results of the statistical analysis of data obtained from factorial experiment in a completely randomized design and from Duncan test together with dendrograms showed significant differences in most measured characteristics at 95% level. Hence Allen medium is suggested to be used when less morphological variation and a normal distribution of the characteristics is expected. According to the results new taxonomic keys also were designed.

Key words: morphological variation, *Nostoc muscorum*, *Nostoc ellipsosporum*, Benecks, Modified Allen's, life cycle.

Archive of SID

www.SID.ir