Archive of SID

رستنیها ۱۷(۱): ۳۹–۲۸ (۱۳۹۵) Rostaniha 17(1): 28–39 (2016)

جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی سه گونه دیاتوم (*Bacillariophyceae*) از تالاب گمیشان براساس آنالیز فیلوژنی و توصیف فراساختار دیواره سیلیسی*

دریافت: ۱۳۹۴/۱۲/۰۳ / پذیرش: ۱۳۹۵/۰۳/۱۲

فرخنده صبا: دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، بانک میکروارگانیسم‌ها، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، جهاد دانشگاهی، تهران؛ گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

مصطفی نوروزی: استادیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا (س)، تهران، ایران

فرخ قهرمانی‌نژاد✉: استاد گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران (ghahremaninejad@khu.ac.ir)

محمد علی آموزگار: دانشیار پردیس علوم، دانشکده زیست شناسی و قطب تبارزایی موجودات زنده، بخش میکروبیولوژی، دانشگاه تهران؛ بانک میکروارگانیسم‌ها، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، جهاد دانشگاهی، تهران، ایران

مهشید صدقی: دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، بانک میکروارگانیسم‌ها، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، جهاد دانشگاهی، تهران، ایران

سید ابوالحسن شاهزاده فاضلی: دانشیار بانک میکروارگانیسم‌ها، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، جهاد دانشگاهی، تهران؛ گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه و فناوری‌های نوین زیستی، دانشگاه علم و فرهنگ، جهاد دانشگاهی، تهران، ایران

مسلم پاپی‌زاده: دانشجوی دکتری بانک میکروارگانیسم‌ها، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، جهاد دانشگاهی، تهران، ایران

چکیده

دیاتوم‌های اپیپلیک تالاب گمیشان (استان گلستان)، یکی از زیستگاه‌های با ارزش در حاشیه شرقی دریای خزر، در سال ۱۳۹۲ جداسازی، خالص‌سازی و سپس مورد شناسایی قرار گرفتند. بدین منظور، از روش‌های رقیق‌سازی سریالی و کشت خطی روی محیط کشت f/2 استفاده و کشت خالص تهیه شد. برای شناسایی جدایه‌ها، مطالعات ریزریخت‌شناسی روی لام‌های دایمی تهیه شده انجام گردید و همچنین تصاویر میکروسکوپی الکترونی نگاره مورد بررسی قرار گرفت. به منظور تکمیل روند شناسایی، بهترین توالی برای شناسایی براساس آنالیز توالی‌های موجود در GenBank انتخاب شد و پس از تکثیر قطعه کدکننده ژن SSU، مطالعات فیلوژنتیکی انجام پذیرفت. صفات ریخت‌شناسی و اطلاعات مولکولی سه گونه جدا شده بررسی شد و با تفسیر اطلاعات مشخص شد آنالیزهای فیلوژنتیک توالی SSU تایید کننده نتایج مطالعات ریخت‌شناسی می‌باشد. بر این اساس، آرایه‌های دیاتوم مورد مطالعه متعلق به گونه‌های *Fallacia pygmaea*، *Halamphora coffeiformis* و *Navicula veneta* شناسایی شدند.

واژه‌های کلیدی: باسیلاریوفیسه، جلبک، فیتوپلانکتون، کشت خالص، 18s rDNA

Isolation, purification and identification of three diatom species (*Bacillariophyceae*) from Gomishan wetland (N. Iran) using phylogeny and silica cell wall ultra-structure analysis

Received: 22.02.2016 / Accepted: 01.06.2016

Farkhondeh Saba: MSc Graduate, Microorganisms Bank, Iranian Biological Resource Center (IBRC), (ACECR), Tehran; Department of Plant Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

Mostafa Noroozi: Assistant Prof., Department of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran

Farrokh Ghahremaninejad✉: Prof., Department of Plant Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, No. 43, Mofatteh Ave., Tehran 15719-14911, Iran (ghahremaninejad@khu.ac.ir)

Mohammad Ali Amoozegar: Associate Prof., Department of Microbiology, Faculty of Biology and Center of Excellence in Phylogeny of Living Organisms, College of Science, University of Tehran, Tehran; Microorganisms Bank, Iranian Biological Resource Center (IBRC), (ACECR), Tehran, Iran

Mahshid Sedghi: MSc Graduate, Microorganisms Bank, Iranian Biological Resource Center (IBRC), (ACECR), Tehran, Iran

Seyed Abolhassan Shahzadeh Fazeli: Associate Prof., Microorganisms Bank, Iranian Biological Resource Center (IBRC), (ACECR), Tehran; Department of Molecular and Cellular Biology, Faculty of Basic Sciences and Advanced Technologies in Biology, University of Science and Culture, Tehran, Iran

Moslem Papizadeh: PhD Student, Microorganisms Bank, Iranian Biological Resource Center (IBRC), (ACECR), Tehran, Iran

Summary

Diatoms of Gomishan wetland (Golestan province, N. Iran), one of the most significant habitats in the eastern shore of the Caspian Sea, has been isolated, purified and identified during 2013. Using serial dilution and streaking on F/2 medium, pure, monoalgal and axenic cultures of the isolates were prepared. The isolates were characterized and identified using micro-morphological studies on the prepared permanent slides followed by scanning electron-microscopy. To prove the identification results, the most reliable genomic sequence fragments were investigated using GenBank database. Thus, SSU was amplified and analyzed, phylogenetically. The morphology and sequence data of three isolates were assessed which indicated that, the results of phylogenetic analyses of SSU-based sequences can support the morphological studies data. Finally, the isolates were introduced as *Fallacia pygmaea*, *Halamphora coffeiformis* and *Navicula veneta*.

Keywords: Algae, phytoplankton, pure culture, 18s rDNA

* بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول به راهنمایی دکتر فرخ قهرمانی‌نژاد و دکتر محمد علی آموزگار ارایه شده به دانشگاه خوارزمی، تهران

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

اعضای شاخه *Bacillariophyta* یا دیاتوم‌ها، به عنوان بزرگ‌ترین گروه فیتوپلانکتونی نقش قابل توجهی در حفظ حیات کره زمین دارند. این میکروارگانیسم‌های یوکاریوت مسوولیت تولید ۲۰-۲۵٪ از کل تولید اولیه جهانی را بر عهده دارند و حدود ۴۰٪ از تولید بیومس سالانه کل اقیانوس‌ها به آن‌ها اختصاص دارد. بنابراین، می‌توان گفت این گروه نقش بسیار حیاتی در برقراری چرخه‌های حیات در زیستگاه‌های مختلف ایفاء می‌نمایند. همچنین، این یوکاریوت‌ها بزرگ‌ترین و غالب‌ترین گروه میکروارگانیسم‌های دخیل در کاهش گاز گلخانه‌ای دی اکسید کربن موجود در اتمسفر هستند (Bozarth *et al.* 2009). به عنوان یک صفت شاخص، دیاتوم‌ها دارای کلروفیل a و c بوده و رنگ مشخص قهوه‌ای-طلایی آن‌ها ناشی از وجود رنگدانه‌های فرعی فوکوزانتین و بتاکارتن در پلاستیدهای آن‌هاست (Vanden Hoek *et al.* 1995). از نظر جنبه‌های کاربردی، دیاتوم‌ها ابزار مفید و ارزشمندی برای پایش کیفیت آب اکوسیستم‌های آبی می‌باشند. همچنین، این میکروارگانیسم‌ها به عنوان ذخایر ارزشمندی برای تولید محصولات زیستی از قبیل کاروتنوییدها، ویتامین‌ها، اسیدهای چرب غیراشباع ضروری، آمینواسیدها و نیز مکمل‌های غذایی در نظر گرفته می‌شوند (Vinayak *et al.* 2015).

دیاتوم‌ها گروه بزرگی از جلبک‌ها هستند که مطالعات بسیار محدودی در مورد جداسازی سویه‌های زنده و شناسایی مولکولی آن‌ها در ایران انجام شده است. از جمله این مطالعات می‌توان به مطالعه جداسازی و کشت گونه‌های بومی فیتوپلاکتونی از دهانه رودخانه‌های اروند و بهمنشیر اشاره کرد. در این مطالعه، پنج آرایه متعلق به چهار جنس *Nitzschia*، *Diatoma*، *Cyclotella* و *Amphiprora* جداسازی و سپس براساس صفات ریخت‌شناسی در سطح جنس شناسایی شدند (Masoumi Zadeh *et al.* 2007). همچنین، می‌توان به تحقیق غربال‌گری، خالص‌سازی و شناسایی دیاتوم‌های سیستم تصفیه پساب خروجی شرکت پالایش نفت کرمانشاه اشاره کرد.

در این مطالعه، تعداد ۱۳ آرایه دیاتوم متعلق به پنج جنس به اسامی *Navicula*، *Nitzschia*، *Cyclotella*، *Pinnularia* و *Fragilaria* جداسازی و براساس صفات ریخت‌شناسی مبتنی بر میکروسکوپ نوری در سطح جنس شناسایی شدند (Mohamadian *et al.* 2014). در ادامه، در مطالعه خالص‌سازی و بررسی فیلوژنی گونه *Amphora cf. coffeaeformis* جدا شده از آب‌های سواحل چابهار بر اساس توالی ژنی LSU-rDNA، گونه *Amphora coffeiformis* (C. Agardh) Kützing جداسازی و براساس ریخت‌شناسی و آنالیز توالی ژن LSU شناسایی شد (Attaran Freeman *et al.* 2012).

Bacillariophyceae، به عنوان بزرگ‌ترین رده از شاخه *Bacillariophyta* حدود ۷۰٪ گونه‌های شناخته شده دیاتوم را شامل می‌شود. دانش شناسایی آرایه‌های مختلف در حد گونه در راستای مطالعات تنوع زیستی همیشه اهمیت بسیاری داشته است (Kesici *et al.* 2013). به دلیل تنوع بسیار زیاد گونه‌های دیاتوم تفسیر اطلاعات ریخت‌شناسی برای شناسایی گونه‌ها در بعضی موارد بسیار سخت می‌باشد و از طرفی پیشرفت روز افزون روش‌های بیولوژی مولکولی و سرعت بالای این روش‌ها و همچنین درجه اطمینان قابل توجه آن‌ها سبب افزایش کاربری آن‌ها در شناسایی و مطالعه فیلوژنی دیاتوم‌ها شده است (Faramarzi *et al.* 2010). شایان ذکر است که استفاده از آنالیز توالی برای شناسایی دیاتوم‌ها در حد گونه و مطالعه فیلوژنی آن‌ها موضوع بسیار تازه‌ای محسوب می‌شود و شناسایی ریخت‌شناسی دیاتوم‌ها بهتر است با ابزارهای شناسایی مولکولی حمایت شوند (Kesici *et al.* 2013).

با توجه به اهمیت تالاب‌ها به عنوان یکی از غنی‌ترین اکوسیستم‌ها که دارای بیشترین تنوع زیستی بوده و عدم وجود اطلاعات در مورد دیاتوم‌های تالاب گمیشان، مطالعه دیاتوم‌های این منطقه در دستور کار قرار گرفت. هدف از این مطالعه، جداسازی و خالص‌سازی سویه‌های زنده دیاتوم و شناسایی آن‌ها در حد گونه و مقایسه روش‌های شناسایی ریخت‌شناسی و مولکولی این میکروارگانیسم‌ها می‌باشد. بنابراین، سه جدایه دیاتوم که از نظر پراکنش تقریبا در همه ایستگاه‌های نمونه‌برداری مشاهده شدند، با استفاده از مطالعه فراساختار دیواره سیلیسی و مقایسه با کلیدهای شناسایی و همچنین آنالیز توالی ژن SSU(18S rDNA) تا حد گونه شناسایی شدند.

روش بررسی

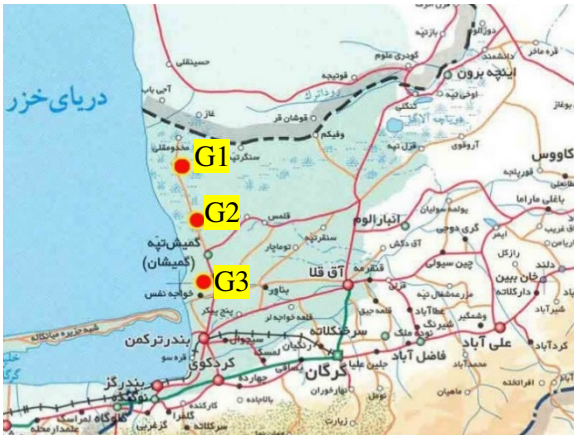
- موقعیت جغرافیایی و نمونه‌برداری

تالاب گمیشان حدود ۲۰ هزار هکتار وسعت داشته و ۲۷ متر پایین‌تر از سطح آب‌های آزاد واقع شده است. این تالاب با گسترش طولی، جنوبی-شمالی در شرق استان گلستان واقع است (Karimi 2010). این تالاب، منطقه وسیعی از اراضی شور و کم‌عمق می‌باشد که در دسته تالاب‌های دریایی ساحلی قرار می‌گیرد. عمق آب در این تالاب کاملا متغیر و وابسته به نوسانات

www.SID.ir

Archive of SID

آب دریای خزر بوده، ولی عموما دارای عمق حداقل یک متر در جنوب تا حداکثر ۲/۵ متر در نزدیکی حاشیه دریا می‌باشد. تالاب گمیشان، علاوه بر تاثیر مثبت در آب و هوای منطقه، زیستگاه بسیاری از گونه‌های جانوری و گیاهی بوده و طبق پژوهش‌های انجام شده از غنای ژنتیکی قابل توجهی برخوردار بوده و مورد توجه دانش‌پژوهان در این زمینه قرار دارد. گمیشان در سال ۱۳۸۰ به عنوان تالاب با اهمیت بین‌المللی در کنوانسیون جهانی حفاظت از تالاب‌ها به ثبت رسید و در گروه آب‌های لب‌شور طبقه‌بندی می‌شود (Karimi 2010). در این مطالعه، نمونه‌برداری تالاب گمیشان در دو نوبت انجام شد. نوبت اول در تیر ۱۳۹۲ و نوبت دوم در اسفند ۱۳۹۲ صورت گرفت. طی این نمونه‌برداری‌ها، نمونه‌های اپیپلیک از سه ایستگاه در طول تالاب گمیشان جمع‌آوری شد که تحت عنوان مناطق شمالی، مرکزی و جنوبی تالاب گمیشان نامیده شدند. مشخصات جغرافیایی نواحی فوق‌الذکر در شکل ۱ و جدول ۱ آمده است. نمونه‌های اپیپلیک از این نقاط به وسیله کاردک کوچکی به فالکن‌های استریل ۵۰ ml اضافه شده و در اسرع وقت به آزمایشگاه منتقل گردید.



شکل ۱- نقشه محدوده ایستگاه‌های نمونه‌برداری از تالاب گمیشان.
Fig. 1. Map of the sampling sites in Gomishan wetland.

جدول ۱- مختصات جغرافیایی ایستگاه‌های نمونه‌برداری

منطقه	کد نمونه	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی
شمالی	G1	N 37° 13′ 6.9″	E 53° 59′ 24″
مرکزی	G2	N 37° 9′ 1.6″	E 54° 0′ 17.9″
جنوبی	G3	N 37° 3′ 41.8″	E 54° 2′ 11.9″

- جداسازی و خالص‌سازی

در ابتدا، جمعیت‌های دیاتوم‌های موجود در هر نمونه، با میکروسکوپ نوری Olympus مدل CX31 مورد مطالعه قرار گرفت. سپس، جداسازی با استفاده از رقیق‌سازی سریالی و کشت خطی روی محیط کشت f/2 جامد حاوی ۱/۵٪ آگار انجام شد (Guillard & Ryther 1962). به منظور محدود کردن رشد باکتری‌ها، آنتی‌بیوتیک ایمی‌پنم با غلظت µg/ml ۹۸ در پلیت‌های محیط کشت اضافه گردید (Bruckner & Kroth 2009). پلیت‌ها در اتاقک کشت دیاتوم‌ها با تناوب نور- تاریکی ۱۶:۸ ساعت با میانگین شدت نور lux ۲۴۰۰ و دمای ۱۹-۱۷ درجه سلسیوس قرار داده شدند. پلیت‌ها هر روز جهت مشاهده رشد پرگنه‌ها به وسیله عدسی ۴X و ۱۰X میکروسکوپ نوری و استریو میکروسکوپ Ceti بررسی شدند. پرگنه‌های دیاتوم‌های رشد کرده به محیط کشت جامد فاقد آنتی‌بیوتیک منتقل شده و پس از ۱ تا ۲ هفته از سویه‌های به دست آمده لام دایم تهیه شد (Windler *et al.* 2012). در ادامه، از بین سویه‌های حاصله، جدایه‌هایی که به صورت تکرارپذیری از همه ایستگاه‌ها جداسازی شده بودند،

www.SID.ir

Archive of SID

برای شناسایی دقیق ریخت‌شناسی و مولکولی انتخاب شدند. سه آرایه مورد نظر تقریبا در همه ایستگاه‌ها مشاهده شدند که جزو دیاتوم‌های با پراکنش بالا در تالاب بودند. دیاتوم‌های انتخاب شده برای تهیه زیست توده به محیط کشت مایع f/2 بدون آنتی‌بیوتیک انتقال یافتند. برای آزمون‌های سنجش آلودگی باکتریایی و قارچی مقداری از کشت حاصله روی محیط جامد pepton f/2 تلقیح شده و به مدت سه روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس گرماگذاری شد و جدایه‌های axenic از xenic تمیز داده شدند (Andersen 2005). در نهایت، جدایه‌ها با کدهای IBRC-M 5050، IBRC-M 5046 و IBRC-M 5042 در بانک میکروارگانیسم‌ها، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران (IBRC) نگهداری و ثبت شدند.

- شناسایی نمونه‌ها

به منظور تهیه لام دایم و تهیه تصاویر میکروسکوپی الکترونی از فرستول‌های دیاتوم‌ها فرآیند مربوط به حذف ترکیبات آلی روی دیاتوم‌ها با استفاده از روش پاتریک و رمیر (Patrick & Reimer 1975) صورت گرفت. لام‌های دایم به وسیله چسب Naphrax تهیه گردید. برای تهیه تصاویر از میکروسکوپ Olympus مدل BX51، دارای دید DIC و مجهز به دوربین Olympus مدل DP25 استفاده گردید. برای اندازه‌گیری و توصیف صفات ریخت‌شناسی فراساختار سیلیسی ۱۰ نمونه مورد بررسی قرار گرفت.

برای تهیه تصاویر میکروسکوپ الکترونی نگاره یک قطره از نمونه‌های تمیز شده، روی لامل قرار داده و در دمای اتاق خشک شد. سپس لامل‌های آماده روی پایه آلومینیومی چسبانده و به وسیله طلا با استفاده از دستگاه اسپاترینگ رومیزی (ساخت شرکت پوشش‌های نانو ساختار) مدل DSR1 پوشانده شدند. در ادامه، تصاویر به وسیله میکروسکوپ الکترونی با ولتاژ ۲۰ KV تهیه شد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی به وسیله میکروسکوپ الکترونی نگاره مدل VEGA3 ساخت شرکت TESCAN از جمهوری چک، واقع در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه الزهرا (س) تهیه شد. در نهایت، شناسایی دیاتوم‌ها با استفاده از کلیدهای شناسایی معتبر (Lange-Bertalot 2001, Levkov 2009, Patrick & Reimer 1975, Round *et al.* 1990) انجام شد.

- استخراج ژنوم و تکثیر قطعه SSU

ژنوم جدایه‌ها با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت سیناژن به شماره DN8115C و روش توصیف شده در Saba *et al.* (2016) استخراج شد. در ادامه، توالی ژن‌های تکثیر شده در منابع بانک اطلاعاتی GenBank بررسی گردید. براساس این بررسی، مشخص شد که انواع توالی‌هایی که در شناسایی انواع دیاتوم‌ها استفاده شده است شامل قطعات ریبوزومی SSU، LSU، ITS و همچنین انواعی از ژن‌های کدکننده پروتئین شامل COI، rbcl می‌باشند (Alverson 2008). بنابراین، با بررسی غنای بانک اطلاعاتی نوکلئوتیدی GenBank برای توالی مربوطه در جنس مورد مطالعه و همچنین بررسی تکرارپذیری و امکان تکثیر ناحیه ژنی، قطعه ژنی SSU برای جنس‌های مورد نظر انتخاب گردیده و در نهایت پرایمرهای مناسب برای تکثیر کل قطعه انتخاب شدند. جهت تکثیر قطعه SSU از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در دستگاه ترموسایکلر مدل MyCyelerTM از شرکت Biorad استفاده شد. برای این منظور، از پرایمرهای U18SF-1114 (5'-ACCTGGTTGATCCTGCCAG-3') و EUK329-1114 (5'-TGATCCTTCYGCAGGTTCAC-3') استفاده شد (Brown *et al.* 2009). واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با مرحله باز شدن ابتدایی در ۹۴ درجه سلسیوس برای هفت دقیقه آغاز و با ۳۵ چرخه به ترتیب زیر انجام شد: باز شدن در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت دو دقیقه، اتصال پرایمر در دمای ۵۴ درجه سلسیوس به مدت چهار دقیقه، پلیمریزه شدن در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت دو دقیقه و یک مرحله انتهایی پلیمریزه شدن در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت هفت دقیقه (Bruder & Medlin 2007). کیفیت محصولات واکنش زنجیرهای پلیمراز روی ژل آگارز ۱٪ بررسی و توسط شرکت تکاپوزیست با استفاده از هر دو پرایمر تعیین توالی گردید.

- آنالیز توالی

نتایج تعیین توالی به دست آمده از هر دو پرایمر با استفاده از نرم‌افزارهای CLC Combined Workbench و BioEdit 7.0.9.0 مرتب گردید تا کانتیگ با طول ژن SSU (حدود ۱۷۲۰) تهیه شود. توالی نوکلئوتیدی به دست آمده در برنامه Blastn و به صورت Megablast، با روش‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت و شباهت توالی ژن SSU با اطلاعات موجود در پایگاه اینترنتی NCBI مقایسه شد. سپس با استفاده از نتایج به دست آمده از آنالیز شباهت، توالی‌های اخذ شده از GenBank به همراه توالی‌های سویه‌های تعیین توالی شده در این مطالعه و با استفاده از نرم‌افزار MEGA5 همتراز شدند و همچنین نرم‌افزار MAFFT در پایگاه EMBL برای

www.SID.ir

Archive of SID

تایید نتایج به دست آمده استفاده گردید (Katoh *et al.* 2009). در ادامه، نتایج همترازی با استفاده از روش‌های Maximum Parsimony و همچنین Neighbor Joining و با تنظیمات مختلف برای رسم درخت فیلوژنی استفاده شدند که با استفاده از نرم‌افزار MEGA5 انجام شد (Tamura *et al.* 2011). در نهایت، توالی‌های به دست آمده از این آرایه‌ها در پایگاه اطلاعاتی GenBank ثبت شد (جدول ۲).

نتیجه

- جداسازی و خالص‌سازی

در امر جداسازی سه سویه مطالعه شده در این مقاله به صورت تکرارپذیری تقریبا از همه ایستگاه‌های نمونه‌برداری جداسازی شدند و این مهم نشان‌دهنده پراکنش بالای این آرایه‌ها در تالاب گمیشان می‌باشد. جدایه‌های به دست آمده به خوبی در محیط کشت f/2 رشد کردند. استفاده از آنتی‌بیوتیک ایمی‌پنم با غلظت ۹۸ µg/ml در محیط کشت به خوبی رشد میکروارگانیسم‌های پروکاریوت را کاهش داده و فرآیند جداسازی و خالص‌سازی تسهیل نمود.

- ریخت‌شناسی

در نتیجه مطالعه ریخت‌شناسی و بررسی‌های میکروسکوپی نوری و الکترونی نگاره سه جدایه IBRC-M 5046، IBRC-M 5050 و IBRC-M 5042 به دست آمده از تالاب گمیشان به ترتیب تحت عنوان گونه‌های *Fallacia pygmaea* (Kützing) A.J. Stickle & D.G. Mann، *Halamphora coffeiformis* (C. Agardh) Levkov و *Navicula veneta* Kützing شناسایی شدند (شکل ۲). شرح ریخت‌شناسی گونه‌های به دست آمده در زیر آورده شده است. دیاتوم‌های شناسایی شده در این مطالعه، همگی در راسته *Naviculales*، بزرگ‌ترین راسته از زیررده *Bacillariophycidae* قرار دارند.

Fallacia pygmaea (Kützing) Stickle & D.G. Mann

سلول‌های *F. pygmaea* به صورت منفرد و معمولا در سطح والوی دیده می‌شوند. کلروپلاست منفرد و H شکل است و از دو صفحه بشقابی شکل که در مقابل قسمت کمربندی قرار دارند تشکیل شده است. والوها بیضوی و دارای انتهای کاملا گرد هستند (شکل ۲A). طول والو بین ۶۲-۱۰ میکرومتر و عرض آن بین ۲۴-۶ میکرومتر می‌باشد. ناحیه مرکزی باریک و مستقیم است. شیار رافه مستقیم و رشته مانند است. پوششی سیلیسی منفذدار و نازک به نام کانوپئوم استریاها را در سطح خارجی والو می‌پوشاند که در تصاویر میکروسکوپ نوری قابل تشخیص نیست (شکل ۲H). استریاها در این جنس به صورت تک‌ردیفی می‌باشند و منافذ تشکیل‌دهنده ردیف‌های استریا (areolae) به وسیله غشاء متخلخل سیلیسی بسیار ظریفی (hymen) پوشش داده شده است. همچنین، در سطح والو منطقه بدون تزیینات و چنگ شکل در وسط والو دیده می‌شود که ردیف استریاها را در دو طرف ناحیه مرکزی به دو نیمه تقسیم می‌کند (شکل ۲G). استریاها به صورت شعاعی آرایش یافته‌اند و به صورت نقطه نقطه (punctate) مشاهده می‌شوند. آرایش استریاها در ناحیه مرکزی به صورت موازی و در دو انتها به صورت شعاعی می‌باشد. تعداد ردیف استریاها در ناحیه میانی والو در طول ۱۰ میکرومتر بین ۲۸-۲۲ و در دو انتهای والو در طول ۱۰ میکرومتر بین ۳۰-۲۸ عدد می‌باشد.

Navicula veneta Kützing

والوها در گونه *N. veneta* لوزوی-نیزه‌ای با انتهای کشیده می‌باشند (شکل ۲E، ۲F). طول والو بین ۳۰-۱۳ میکرومتر و عرض آن بین ۶-۵ میکرومتر است. رافه به صورت خطی است. ناحیه مرکزی باریک و خطی می‌باشد و ناحیه مرکزی نسبتا کوچک و تقریبا متقارن است و به صورت عرضی مانند یک مستطیل عریض شده است (شکل ۲I) استریاها به صورت ضعیفی شعاعی شکل و در انتها همگرا شده و در طول ۱۰ میکرومتر و تعداد ۱۵-۱۳ استریا وجود دارند. لینولائه‌ها در تصاویر میکروسکوپی نوری نامشخص و حدودا ۳۵ عدد به طول ۱۰ میکرومتر می‌باشد (شکل ۲I).

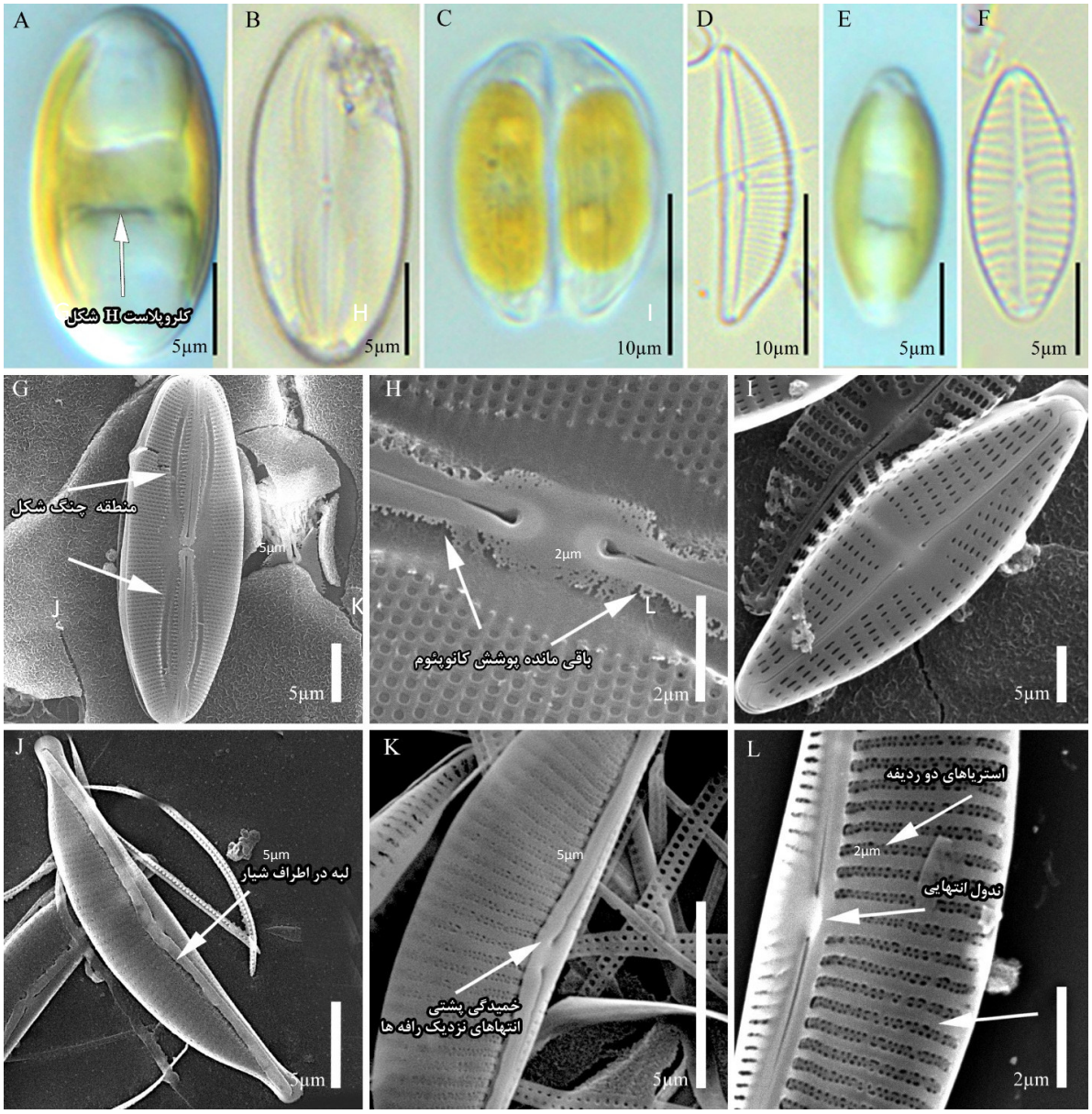
Halamphora coffeiformis (C. Agardh) Levkov

این دیاتوم دارای والو شبه نیزه‌ای است که حالت پشتی شکمی دارند و ناحیه پشتی به صورت محدب و ناحیه شکمی مستقیم و یا اندکی معقر می‌باشد. انتهای والوها کشیده و کمی به سمت شکمی خمیده شده است. طول والوها بین ۳۵-۲۳ میکرومتر و عرض آن ۷/۲-۵ می‌باشد (شکل ۲C، ۲D). در هیچیک از والوها ناحیه مرکزی وجود ندارد و از ناحیه محوری قابل تمایز نمی‌باشد. انشعابات رافه کمانی شکل بوده و انتهاهای نزدیک آن کمی خمیدگی پشتی دارد (شکل ۲J). خطوط استریاها در سراسر طول والو جهت‌گیری شعاعی دارند و در فاصله ۱۰ میکرومتر تعداد ۲۲-۱۹ عدد قرار دارد. استریاهای پشتی به صورت نقطه نقطه (punctate) نیستند و استریاهای شکمی با میکروسکوپ نوری قابل تشخیص نمی‌باشند.

www.SID.ir

Archive of SID

دو انتهای پروکزیمال رافه به سمت پشتی منحرف شده است و از درون والو دو انتهای پروکزیمال رافه به ساختاری به نام ندول انتهایی (helictoglossae) ختم می‌شوند که به وسیله تصاویر میکروسکوپ الکترونی قابل مشاهده است (شکل ۲L).



شکل ۲- A–F تصاویر میکروسکوپی نوری (DIC) از دیاتوم‌های شناسایی شده: A و B *F. pygmaea*، C و D *H. coffeiformis* و E و F *N. veneta*. G–L تصاویر میکروسکوپی الکترونی از دیاتوم‌های شناسایی شده: G و H *F. pygmaea*، I *N. veneta*، K و L *H. coffeiformis*.

Fig. 2. A–F. Microscopy images (DIC) of the diatoms identified in this study: A and B. *F. pygmaea*, C and D. *H. coffeiformis*, E and F. *N. veneta*. G–L. Scanning Electron micrographs of the diatoms identified in this study: G and H. *F. pygmaea*, I. *N. venet*, K and L. *H. coffeiformis*.

- آنالیز توالی

آنالیز شباهت توالی قطعه ژنی SSU سویه IBRC-M 5050 در بانک اطلاعاتی نوکلئوتیدی GenBank در NCBI نشان داد که سه سویه شناسایی شده از ایالات متحده آمریکا بیشترین شباهت توالی را به IBRC-M 5050 دارند که شامل کدهای دسترسی (۱۰۰٪) KJ463448، (۹۹٪) HQ912602 و (۹۹٪) KJ463449 می‌باشد (جدول ۲). مطالعه همین توالی از سویه IBRC-M 5042 در پایگاه اطلاعاتی فوق‌الذکر نشان داد که

www.SID.ir

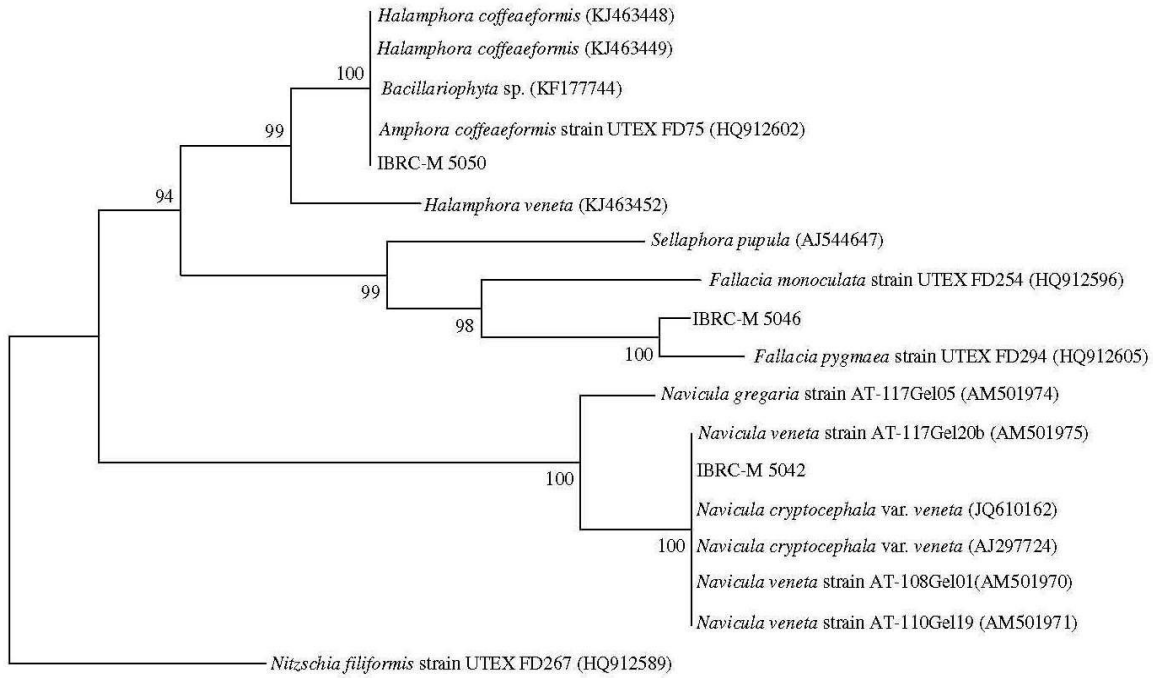
Archive of SID

سویه‌ها با کدهای دسترسی (۱۰۰٪) JQ610162، (۹۹٪) AM501970 و (۹۹٪) AJ297724 بیشترین شباهت توالی را به سویه IBRC-M 5050 دارند. همین‌طور، سویه‌ها با کدهای دسترسی (۹۹٪) AM501971 و (۹۹٪) AM501975 شباهت قابل توجهی به سویه IBRC-M 5042 نشان دادند (جدول ۳). بررسی توالی قطعه ژنی SSU سویه IBRC-M 5046 در همین پایگاه نشان داد که سویه با کد دسترسی (۹۹٪) HQ912605 بیشترین شباهت توالی را به سویه IBRC-M 5046 دارد. بررسی بیشتر نشان داد که سویه با کد دسترسی (۹۹٪) HQ912596 نیز شباهت زیادی به IBRC-M 5046 دارد (جدول ۴).

جدول ۲- مجموعه سویه‌های استفاده شده در مطالعات فیلوژنتیک (سویه‌های ثبت شده در مطالعه حاضر، به طور پررنگ مشخص شده)

کد سویه	نام علمی	کد دسترسی GenBank
UTEX FD75	*Amphora coffeaeformis*	HQ912602
GSP204-1	*Bacillariophyta* sp.	KF177744
UTEX FD294	*Fallacia pygmaea*	HQ912605
UTEX FD254	*F. monoculata*	HQ912596
IBRC-M 5046	***F. pygmaea***	**KX257362**
7977-AMPH101	*Halamphora coffeaeformis*	KJ463449*
9560-AMPH023	*H. coffeaeformis*	KJ463448*
6020-AMPH005	*H. veneta*	KJ463452
IBRC-M 5050	***H. coffeiformis***	**KX257363**
LCR-S-2-2-1	*Navicula cryptocephala* var. *veneta*	JQ610162
AT-108Gel01	*N. veneta*	AM501970
NCB	*N. cryptocephala* var. *veneta*	AJ297724
AT-110Gel19	*N. veneta*	AM501971
AT-117Gel20b	*N. veneta*	AM501975
IBRC-M 5042	***N. veneta***	**KX257364**
UTEX FD267	*Nitzschia filiformis*	HQ912589
PSEUDOCAP-1	*Sellaphora pupula*	AJ544647

* بخش بزرگی شامل ۲۱۷ نوکلئوتید از SSU در مورد این رکوردها در GenBank گزارش نشده است.



شکل ۳- درخت فیلوژنی (NJ) سویه‌ها: روابط سویه‌های IBRC-M 5050، IBRC-M 5042، IBRC-M 5046 براساس مقایسه توالی ژن SSU با نزدیکترین خویشاوندان مربوطه در جنس‌های *Navicula*، *Fallacia* و *Halamphora*.

Fig. 3. Phylogenetic tree (NJ) of the strains: IBRC-M 5050, IBRC-M 5042, IBRC-M 5046 and their close relatives in the genera *Navicula*, *Fallacia* and *Halamphora*, based on the sequence of SSU gene fragment.

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

شناسایی ریزجلبک‌ها همیشه به عنوان یک هدف مهم در راستای مطالعه تنوع زیستی تالاب‌ها مورد توجه بوده است. دیاتوم‌ها یکی از گروه‌های مهم ریزجلبک‌ها می‌باشند. علیرغم مطالعات فلورستیک انجام شده در ایران، تا به حال مطالعات محدودی روی نمونه‌های زنده دیاتوم جداسازی شده از اکوسیستم‌های آبی در ایران انجام گردیده است (Attaran Freeman *et al.* 2012, Masoumi Zadeh *et al.* 2007, Mohamadian *et al.* 2014) که این مهم لزوم توجه بیشتر به مطالعات مربوط به کشت، خالص‌سازی و شناسایی این میکروارگانیسم‌ها را نشان می‌دهد. در مطالعات انجام شده، عموما از میکروسکوپ نوری برای شناسایی ریخت‌شناسی استفاده شده است. در این مطالعه علاوه بر میکروسکوپی نوری بررسی‌های مورفومتریک، ریخت‌شناسی و فراساختاری توسط میکروسکوپ الکترونی و همچنین ابزار آنالیز توالی قطعه SSU استفاده شد. در بین مطالعات انجام شده فقط عطاران فریمان و همکاران (۱۳۹۲) شناسایی مبتنی بر توالی نوکلئوتیدی LSU را در مورد یک جدایه دیاتوم با کد دسترسی CHPA1 انجام داده‌اند.

از انواع توالی‌هایی که در شناسایی انواع دیاتوم‌ها استفاده شده است می‌توان قطعات SSU، LSU، ITS و همچنین انواعی از ژن‌های کد کننده پروتئین شامل COI، rbcl را نام برد (Alverson 2008). استفاده از هر کدام از قطعات فوق‌الذکر جهت مطالعات فیلوژنی نیازمند به تکرارپذیری واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، وجود اطلاعات توالی کافی در پایگاه‌های داده مانند NCBI و همچنین حفظ‌شدگی مناسب جهت استفاده در مطالعات فیلوژنی است. چنین فاکتورهایی سبب معرفی مارکرهای ایده‌آل جهت شناسایی دیاتوم‌ها می‌شود. همچنین، میزان حفظ‌شدگی می‌تواند متغیر بسیار تعیین‌کننده‌ای باشد که در گروه‌های بسیار گسترده‌ای از میکروارگانیسم‌ها، مانند دیاتوم‌ها شاید یک قطعه مفروض در تیره‌ها و جنس‌های مختلف حفظ‌شدگی متجانس و دلخواهی نداشته باشد تا بتوان با استفاده از آن سطوح مختلف تاکسونومیک را تفکیک داد (Alverson 2008). لذا، یک قطعه ژنومی در مواردی به تنهایی نمی‌تواند برای شناسایی جنس‌ها و گونه‌ها استفاده شود. قطعه SSU که در مقایسه با سایر قطعات ژنومی در گستره وسیعی از دیاتوم‌ها تا به حال بیشترین استفاده را داشته است و اطلاعات بسیار غنی‌تری در پایگاه‌های داده (NCBI) دارد. این قطعه بیشترین استفاده را در مباحث روابط فیلوژنی سطوح بالای تاکسونومیک دیاتوم‌ها داشته است (Alverson *et al.* 2006, Sorhannus 2004). مطالعات شباهت توالی و آنالیز فیلوژنیک توالی SSU از سه گونه شناسایی شده نشان داد که سه جدایه شناسایی شده در این مطالعه به همراه نزدیکترین توالی‌هایی که در شاخه‌های مربوط به این سه گونه قرار می‌گیرند به طور مشخص کلادهایی مستقل با حمایت بوت‌استرپ (Bootstrap value ≥98%) حاصل نمودند. بوت‌استرپ کلادهای فوق‌الذکر با تنظیمات مختلف برنامه‌های بیوانفورماتیک تغییر معنی‌داری نداشت و این نکته نشان‌دهنده ثبات اطلاعات ارایه شده می‌باشد.

صفات شاخصی که دیاتوم *F. pygmaea* را از سایر گونه‌های این جنس مجزا می‌کند، شامل آرایش چنگ، شکل روی سطح والو و وجود غشای سیلیسی نازک کانوپئوم روی والو می‌باشد که این صفات در نمونه مطالعه شده در این تحقیق به وسیله تصاویر میکروسکوپی الکترونی تشخیص داده شد. نتایج شناسایی ریخت‌شناسی جدایه IBRC-M 5046 به خوبی نتایج شناسایی مبتنی بر آنالیز توالی را در این سویه تایید کرد. با انجام مطالعات شباهت توالی و فیلوژنی، مشخص شد که اطلاعات توالی بویژه در مورد *F. pymaea* بسیار محدود می‌باشد. در بانک اطلاعاتی نوکلئوتیدی GenBank فقط می‌توان یک توالی قطعه ژنی SSU یافت که متعلق به سویه‌ای از کلکسیون UTEX با کد UTEX FD294 می‌باشند (Theriot *et al.* 2010). توالی سویه ما با کد دسترسی KX257362 دومین توالی ثبت شده از این آرایه در NCBI می‌باشد. این آرایه از رامسر، طی مطالعات فلورستیک گزارش شده است (Soltanpour-Gargari 2011). همچنین، زارعی دارکی (Zarei Darki 2011)، در مطالعه‌ای تحت عنوان "جلبک‌های اکوسیستم‌های آبی ایران" این آرایه را با نام مترادف *Navicula pygmaea* گزارش نموده است.

جنس *Fallacia* شامل تعداد زیادی گونه است که قبلا در بخش *Lyratae* (*Navicula* sect. *Lyratae*) از جنس *Navicula* با مفهوم عام (sensu lato) خود قرار داشته‌اند. دیاتوم *F. Pygmaea* همان *Navicula pygmaea* Kützing پیشین می‌باشد که در سال ۱۹۹۰ از جنس *Navicula* جدا شد (Patrick & Reimer 1975). کلروپلاست جنس *Fallacia* بسیار به جنس *Sellaphora* شبیه می‌باشد. این دو جنس به لحاظ فیلوژنتیکی قرابت بالایی دارند. همان‌طور که در درخت فیلوژنی هم دیده می‌شود، کد دسترسی AJ544647 که متعلق به جنس *Sellaphora* می‌باشد، در کنار جنس *Fallacia* قرار گرفته است (شکل ۳).

www.SID.ir

Archive of SID

در مورد شناسایی IBRC-M 5042، تصاویر میکروسکوپی الکترونی و آنالیز توالی به عنوان مکمل‌های خوبی برای شناسایی گونه مفید واقع شدند. در سطح گونه ویژگی‌های مورفومتریک، ریخت‌شناسی و فراساختاری از قبیل ریخت‌شناسی ساختار رافه و سایز و آرایش استریاها با ویژگی‌های *N. veneta* مطابقت دارد. کلیه این موارد تایید- کننده این است که سویه IBRC-M 5042 به درستی در حد گونه شناسایی شده است.

گونه *N. veneta* گونه‌ای جهان‌وطن (cosmopolitan) به شمار می‌رود و از نخستین باری که این گونه توسط Kützing در سال ۱۸۴۴ توصیف گردیده، تا به حال از زیستگاه‌های مختلفی گزارش شده است (Moro *et al.* 2010). همچنین، در مطالعات فلورستیک فلور جلبکی ایران نیز، گزارش‌های مختلفی از این آرایه وجود دارد (Afsharzadeh *et al.* 2003, Ghelich *et al.* 2008, Shams & Afsharzadeh 2007, Zarei Darki 2011). این گونه اغلب در محیط‌های آبی لب‌شور و غنی از الکترولیت مخصوصا در آب‌های یوتروف یافت می‌شود. *N. veneta* مقاوم به آلودگی بوده و معمولا در پساب‌های آلوده صنعتی غالب می‌شود. جالب توجه است که این گونه در مناطق با غلظت الکترولیتی پایین یافت نمی‌شود و این ویژگی سبب تمایز آن از *Navicula cryptocephala* Kützing می‌گردد (Lange-Bertalot 2001). براساس بررسی توالی‌های ثبت شده در GenBank نیز این گونه تا به حال از آب‌های گرم گوگردی در ایتالیا، رودخانه لزیوم در آلمان (Bruder & Medlin 2007) و همچنین از رودخانه لاسکو در مجارستان جداسازی شده است (Beszteri *et al.* 2001, Moro *et al.* 2010). همان‌طور که آنالیز فیلوژنی انجام شده در این مطالعه نشان می‌دهد، *N. veneta* مترادف *N. cryptocephala* var. *veneta* (Kützing) Rabenhorst می‌باشد (شکل ۳). لذا، جدایه‌های مختلف معرفی شده با این اسامی در یک شاخه با حمایت آماری بالا (۱۰۰/.) قرار گرفته‌اند. این امر قبلا براساس اطلاعات ریخت‌شناسی نیز ثابت شده است (Lange-Bertalot 2001). شایان ذکر است که در اواسط دهه ۱۹۰۰ براساس سیستم طبقه‌بندی Hustedt، جنس *Navicula* شامل تعداد زیادی از گونه‌های غیرمرتبط نیزه‌ای دارای دو رافه بود، ولی در ادامه تعداد زیادی از این گونه‌ها به عنوان جنس‌های جدیدی جدا شده یا این که درون جنس‌هایی که از قدیم توصیف شده بودند قرار داده شده‌اند (Round *et al.* 1990).

جدایه IBRC-M 5050، به عنوان *Halamphora coffeiformis* شناسایی گردید. جنس *Halamphora* که در سال ۱۸۹۵ توسط Cleve به عنوان یک زیرجنس از جنس *Amphora* توصیف شده است (Cleve 1895)، اخیرا به سطح جنس ارتقاء پیدا کرده است (Levkov 2009). جنس *Amphora* با مفهوم عام (sensu lato) خود شامل گروه بزرگی از دیاتوم‌های دارای رافه است که دارای تنوع بالایی در ریخت‌شناسی و اکولوژی هستند. این جنس یک گروه مونوفیلتیک را تشکیل نمی‌دهد و اعضای این گروه به صورت مستقل و پارافیلتیک روند تکامل را طی کرده‌اند (Stepanek & Kociolek 2014). تفکیک جنس *Amphora* در معنای دقیق (sensu stricto) از جنس *Halamphora* به وسیله تفاوت در صفات ریخت‌شناسی صورت گرفته است، به طوری که در صورت وجود دولبه در اطراف شیار رافه دیاتوم متعلق به جنس *Amphora* در معنای دقیق (sensu stricto) و در صورت عدم وجود و یا وجود فقط یک لبه در سمت پشتی به جنس *Halamphora* متعلق می‌باشد (شکل ۲J) (Levkov 2009). تفاوت دیگر این دو جنس در ساختار آرئولا (areolae) است. در *Amphora* در معنای دقیق (sensu stricto)، آرئولا خارجی ممکن است ساده یا پوشیده شده باشد، در حالی که در جنس *Halamphora* منافذ دارای صفحات غربالی هستند که به صورت مشخصی دارای منافذ متعدد است. مطالعه این صفات برای تفکیک این دو جنس فقط به وسیله تصاویر میکروسکوپ الکترونی امکان‌پذیر بود. وجود استریاهای دوردیفه یکی از مهمترین ویژگی‌های افتراقی در شناسایی دیاتوم *H. coffeiformis* می‌باشد.

همچنین، ردیف‌های استریا در ناحیه پشتی والوی این دیاتوم به صورت خال‌خال مشاهده نمی‌شوند. این ویژگی‌ها در مطالعات میکروسکوپی نوری قابل تشخیص نبوده و باعث شده است که گونه‌های شبیه به این گونه به اشتباه به عنوان *H. coffeiformis* معرفی و گزارش شده باشند (Levkov 2009). نام *H. coffeiformis* (C. Agardh) Kützing در حال حاضر، به عنوان مترادف برای *H. coffeaeformis* (C. Agardh) Levkov در نظر گرفته می‌شود. به هر حال، تغییر نام *A. coffeaeformis* به *H. coffeiformis* هنوز به صورت کامل توسط محققان در نظر گرفته نشده است و در بسیاری منابع این گونه با نام پیشین خود معرفی می‌شود. همچنین، این آرایه با نام مترادف *A. coffeaeformis* از اکوسیستم‌های آبی ایران گزارش‌های مختلفی (Jamaloo *et al.* 2006, Soltanpour-Gargari *et al.* 2011, Zarei Darki 2011) داشته است.

www.SID.ir

Archive of SID

References

Afsharzadeh, S., Nejadsatari, T., Rahiminejad, M.R. & Ebrahimnejad, M. 2003. Study of algal flora in Zayanderood river. Iranian Journal of Biology 14: 32–45.

Alverson, A.J. 2008. Molecular systematics and the diatom species. Protist 159: 339–353.

Alverson, A.J., Cannone, J.J., Gutell, R.R. & Theriot, E.C. 2006. The evolution of elongate shape in diatoms. Journal of Phycology 42: 655–668.

Andersen, R.A. 2005. Algal Culturing Techniques. Academic Press, 587 pp, London.

Attaran Freeman, G., Mousavi, S.I. & Naseri, F. 2012. Purification and phylogenetic study of *Amphora* cf. *coffeaeformis* isolated in Chabahar coastal waters based on gene sequences LSU-rDNA. Iranian Journal of Marine Science and Technology 3: 42–50 (In Persian).

Beszteri, B., Acs, E., Makk, J., Kovács, G., Márialigeti, K. & Kiss, K.T. 2001. Phylogeny of six naviculoid diatoms based on SSU sequences. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 51(4): 1581–1586.

Bozarth, A., Maier, U. & Zauner, S. 2009. Diatoms in biotechnology: modern tools and applications. Applied Microbiology and Biotechnology 82: 195–201.

Brown, M.V., Philip, G.K., Bunge, J.A., Smith, M.C., Bissett, A., Lauro, F.M., Fuhrman, J.A. & Donachie, S.P. 2009. Microbial community structure in the North Pacific Ocean. Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology 3: 1374–1386.

Bruckner, C.G. & Kroth, P.G. 2009. Protocols for the removal of bacteria from fresh benthic diatom cultures. Journal of Phycology 45: 981–986.

Bruder, K. & Medlin, L.K. 2007. Molecular assessment of phylogenetic relationships in selected species/genera in the naviculoid diatoms (*Bacillariophyta*). I. The genus *Placoneis*. Nova Hedwigia 85: 331–352.

Cleve, P.T. 1895. Synopsis of the Naviculoid Diatoms, Part II. Kongliga Svenska Vetenskaps-Akademiens Handlingar 27(3): 1–219.

Faramarzi, M.I., Frotanfar, H. & Shakibayi, M. 2010. Microalga Biotechnology. Tehran University of Medical Sciences (TUMS) Press, 398 pp., Tehran (In Persian).

Ghelich, A., Ramazannejad Ghadi, R. & Shabani, M. 2008. Attached algae in fiber glass tanks of Shahid Marjani Aquaculture (Agh-Ghala). Proceeding (Full paper) in the 1st National Congress on Fishery Resources of Caspian Sea. 18–19 Nov. Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources.

Guillard, R.R. & Ryther, J.H. 1962. Studies on marine planktonic diatoms. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacaea* (Cleve) Gran. Canadian Journal of Microbiology 8: 229–239.

Jamaloo, F., Falahian, F., Nejadsatari, T. & Majd, A. 2006. Study of diatoms flora in Jajrood river. Sciences and Technology of Environment 26: 98–112.

Karimi, Z. 2010. Study of flora and vegetation of International Gomishan Lagoon. Iranian Journal of Biology 23: 436–447 (In Persian with English summary).

Katoh, K., Asimenos, G. & Toh, H. 2009. Multiple alignment of DNA sequences with MAFFT. Methods in Molecular Biology 537: 39–64.

www.SID.ir

Archive of SID

Kesici, K., Tüney, İ., Zeren, D., Güden, M. & Sukatar, A. 2013. Morphological and molecular identification of pennate diatoms isolated from Urla, İzmir, coast of the Aegean Sea. Turkish Journal of Biology 37: 530–537.

Lange-Bertalot, H. 2001. Diatoms of Europe. Diatoms of the European Inland Waters and Comparable Habitats. Vol. 2. *Navicula* sensu stricto. 10 Genera separated from *Navicula* sensu lato. Frustulia. A.R.G. Gantner Verlag, K.G. Press, 526 pp., Ruggell.

Levkov, Z. 2009. *Amphora* sensu lato. *In*: Diatoms of Europe, Diatoms of the European Inland waters and comparable habitats. Vol. 5 (Lange-Bertalot, H., eds) A.R.G. Gantner Verlag, K.G. Press, 916 pp., Ruggell.

Masoumi Zadeh, S.Z., Yavari, V., Kochanian, P. & Savari, A. 2007. Isolation of native species of phytoplankton from Arvand and Bahmanshir rivers. Pajouhesh-va-Sazandegi 73: 147–154 (In Persian with English summary).

Mohamadian, E., Karimi, N., Rasekh, B., Ghasempour, H. & Dehlavi, S. 2014. Isolation, Screening and Identification of Diatoms from Kermanshah Oil Refinery Wastewater Treatment Systems. Biological Journal of Microorganism 11: 47–58 (In Persian with English summary).

Moro, I., Maistro, S., Cassaro, L., Rascio, N. & Andreoli, C. 2010. Morphology, 18S rDNA sequence and rbcL phylogeny of *Navicula veneta* (*Bacillariophyceae*) from thermal muds in Italy. Cryptogamie Algologie 31: 209–219.

Patrick, R.M. & Reimer, C.W. 1975. The Diatoms of the United States exclusive of Alaska and Hawaii. Vol. 2, Part 1. *Entomoneidaceae*, *Cymbellaceae*, *Gomphonemaceae*, *Epithemiaceae*. Academy of Natural Sciences. Pp. 1–213. Philadelphia.

Round, F.E., Crawford, R.M. & Mann, D.G. 1990. The Diatoms. Biology and Morphology of the Genera. Cambridge University Press, 747 pp., Cambridge.

Saba, F., Papizadeh, M., Khansha, J., Sedghi, M., Rasooli, M., Amoozegar, M.A., Soudi, M.R. & Shahzadeh Fazeli, S.A. 2016. A Rapid and Reproducible Genomic DNA Extraction Protocol for Sequence-Based Identification of Archaea, Bacteria, Cyanobacteria, Diatoms, Fungi and Green Algae. Journal of Medical Bacteriology 5(3–4): 22–28.

Shams, M. & Afsharzadeh, S. 2007. Taxonomic study of diatoms in Zayandeh Rood Lake. Rostaniha 8(2): 160–175 (In Persian with English summary).

Soltanpour-Gargari, A., Lodenius, M. & Hinz, F. 2011. Epilithic diatoms (*Bacillariophycae*) from streams in Ramsar, Iran. Acta Botanica Croatica 70: 167–190.

Sorhannus, U. 2004. Diatom phylogenetics inferred based on direct optimization of nuclear-encoded SSU rRNA sequences. Cladistics 20: 487–497.

Stepanek, J.G. & Kociolek, J.P. 2014. Molecular Phylogeny of *Amphora* sensu lato (*Bacillariophyta*): An investigation into the monophyly and classification of the amphoroid diatoms. Protist 165: 177–195.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution 28(10): 2731–2739.

Theriot, E.C., Ashworth, M., Ruck, E., Nakov, T. & Jansen, R.K. 2010. A preliminary multigene phylogeny of the diatoms (*Bacillariophyta*): challenges for future research. Plant Ecology and Evolution 143(3): 1–18.

www.SID.ir

Archive of SID

Vanden Hoek, C., Mann, D.G. & Jahns, H.M. 1995. Algae, an Introduction to Phycology. Cambridge University Press, 640 pp., Cambridge.

Vinayak, V., Manoylov, K.M., Gateau, H., Blanckaert, V., Hérault, J., Pencréac'h, G., Marchand, J. & Gordon, R. 2015. Diatom milking: A review and new approaches. Marine Drugs 5: 2629–2665.

Windler, M., Gruber, A. & Kroth, P.G. 2012. Purification of benthic diatoms from associated bacteria using the antibiotic imipenem. Journal of Applied Endocytobiosis and Cell Research 22: 62–65.

Zarei Darki, B. 2011. Algae of Iranian aquatic ecosystems. Esfahan. Iran. Negar Esfahan Press, 323 pp.

www.SID.ir