

## مطالعه فیلوژنی مولکولی سویه سمی *Anabaena sp. B3* جدا شده از دریاچه لواسان (تهران)\*

دریافت: ۱۴۰۰/۰۴/۳۱ / پذیرش: ۱۴۰۰/۰۵/۲۶

**مریم ریوندی:** دانشجوی کارشناسی ارشد گروه ژنتیک، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی، تهران، ایران  
**بهاره نوروزی**✉: استادیار زیست‌شناسی مولکولی سیانوباکتری‌ها، گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران (bahareh.nowruzi@srbiau.ac.ir)  
**حسین فهیمی:** استادیار گروه ژنتیک، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی، تهران، ایران

### چکیده

دریاچه لواسان واقع در شمال‌شرق تهران، اکوسیستم پیچیده‌ای متشکل از سویه‌های سیانوباکتری‌ها با توانایی تولید طیف وسیعی از ترکیبات طبیعی سمی است که ممکن است منجر به بروز مشکلات فراوان و یا حتی مرگ انسان‌ها و حیوانات شوند. با توجه به گزارش حضور سویه‌های سمی سیانوباکتریایی در دریاچه لواسان، در این مطالعه، بررسی‌های ریخت‌شناختی و فیلوژنی سویه سمی خالص‌سازی شده از آب دریاچه مذکور، با استفاده از نشانگرهای ژنی 16S rRNA و آی.تی.اس. صورت گرفت. براساس نتایج به دست آمده از درخت فیلوژنی رسم شده مبنی بر ژن 16S rRNA، سویه‌های غیرسمی با سویه سمی (*Anabaena sp. B3* (CCC B3)) درون یک کلاذ خوشه‌بندی نشدند. به علاوه، به نظر می‌رسد که توانایی تولید سم در طول زمان از بین رفته است. نتایج حاصل از آنالیز ژن آی.تی.اس. با استفاده از Mfold نشان داد که مهم‌ترین تفاوت سویه سمی *Anabaena sp. B3* با سایر سویه‌های غیرسمی *Anabaena sp.*، تعداد نوکلئوتیدهای لوپ انتهایی دو طرفه و تعداد لوپ‌های دو طرفه میانی در مارپیچ D1-D1 است. این در حالی است که ساختمان مارپیچ B Box در هیچ‌کدام از سویه‌ها تفاوتی نداشت. مطالعه حاضر، جزو نخستین تحقیقات انجام شده روی فیلوژنی مولکولی سیانوباکتریوم سمی در دریاچه لواسان است.

**واژه‌های کلیدی:** اکوسیستم، ژن‌های ساختاری، خوشه‌بندی، سیانوباکتری، 16S rRNA، Internal Transcribed Spacer (ITS)

### Molecular phylogenetic study of toxic cyanobacterium *Anabaena sp. strain B3* isolated from Lavasan Lake, Tehran (Iran)

Received: 22.07.2021 / Accepted: 17.08.2021

**Maryam Rivandi:** MSc Student of Genetic, Department of Genetics, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

**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

Lavasan Lake situated in the north-east of Tehran (Iran) is a complex ecosystem of cyanobacterial strains with an ability to produce a wide range of toxic natural compounds that may lead to many problems or even death of humans and animals. Based on the report of toxic cyanobacterial strains present in the Lavasan Lake, the morphological and phylogenetic study of the toxic strain purified from Lavasan Lake water, was performed using 16S rRNA and ITS gene markers. According to the results, the phylogenetic tree was drawn based on 16S rRNA gene, non-toxic strains with the toxic strain *Anabaena sp. strain B3* (CCC B3) were not clustered within a clade. In addition, the ability to produce toxins appears to be lost over time. The results of ITS gene analysis using Mfold showed that, the most important difference between the toxic strain *Anabaena sp. B3* with other non-toxic strains of *Anabaena sp.* has the number of nucleotides at terminal bilateral bulge and the number of loops at bilateral bulge in the D1-D1 helix. However, Box B helix structure was not different in any of the strains. This is the first report of molecular phylogeny of a toxin-producing cyanobacterium isolated from the Lavasan Lake.

**Keywords:** Cluster, ecosystem, Internal Transcribed Spacer (ITS), structural genes, 16S rRNA

\* مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده نخست به راهنمایی دکتر بهاره نوروزی ارائه شده به دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی

## مقدمه

عوامل محیطی در مقایسه با تعداد فراوانی، از ویژگی‌های ریخت‌شناختی تأثیرپذیر نیستند (Nowruzi et al. 2018b). در میان بسیاری از روش‌های مولکولی، آنالیز توالی ژن rRNA ۱۶S به عنوان وسیله‌ای مفید برای جستجوی روابط فیلوژنتیک در میان سیانوباکتری‌ها به اثبات رسیده است. در واقع، استفاده از نشانگرهای مولکولی توالی ژن‌های غیرکدکننده پروتئین نقش مهمی در استنتاج روابط فیلوژنتیکی و شناسایی سیانوباکتری‌ها دارد. آر.ان.ای. ریبوزومی یا ژن‌های رمزگذاری‌کننده، به عنوان نشانگرهای فیلوژنی در میان میکروارگانسیم‌های متنوع، به خوبی رواج دارد. به علاوه، rRNA ها، مولکول‌های قدیمی و بسیار محافظت شده هستند. ژن rRNA ۱۶S، پراکنش عمومی در پروکاریوت‌ها، ثبات عملکردی دارد که ضمن دارا بودن نواحی حفاظت شده و تنوع، دارای اندازه‌ای بزرگ و همچنین محتوای نسبتاً زیاد اطلاعات است که همه این موارد، آن را به یک ژن نشانگر خوب در فیلوژنی مبدل می‌سازد. به علاوه، توالی‌های ژن rRNA ۱۶S به آسانی روی هم قرار می‌گیرند و پایگاه اطلاعاتی بزرگی را تشکیل می‌دهند و همین امر مقایسه بین سویه‌ها را امکان‌پذیر می‌سازد. به هر حال، قدرت تفکیک‌پذیری ژن rRNA ۱۶S هنوز در حد جنس است (Nowruzi et al. 2017b).

به دلیل طبیعت محافظت شده rRNA ۱۶S و میزان تکامل و تنوع کمتر، در مقایسه با ژن‌های رمزگذاری‌کننده پروتئین، برای مطالعات فیلوژنتیکی ارگانسیم‌های به هم مرتبط، کمتر قابل استفاده می‌باشد. در نتیجه، محققان، مناطق متنوع دیگری مانند مناطق فضایی داخلی رونویسی شده 16S-23S (ITS) را مورد استفاده قرار می‌دهند. در سیانوباکتری‌ها، منطقه ITS 16S-23S، ژن‌های tRNA هم در طول و هم در توالی نوکلئوتیدی بسیار متنوع است. بنابراین، اطلاعات توالی این منطقه می‌تواند وسیله ارزشمندی برای تحقیقات فیلوژنتیکی باشد. ITS فضای درونی رونویسی شده بین rRNA ۱۶S و rRNA ۲۳S است که برای شناسایی آرایه‌ها از سطوح تیره تا گونه کاربرد دارد.

اگرچه منطقه آی.تی.اس. خود هیچ ژنی را رمزگذاری نمی‌کند، اما ممکن است شامل ژن‌های آر.ان.ای. بسیار مهم و کاربردی مانند tRNAIle و tRNAAla و یا tRNAGlu باشد (Nowruzi & Soares 2021). به علاوه، انتقال افقی ژن‌ها نیز نقش بسیار مهمی در تشکیل ساختمان ژنومیک باکتری‌ها دارد. در واقع، هم انتقال افقی ژن‌ها و هم حذف تعدادی از ژن‌ها در طول زمان منجر به پراکنش ژن‌های سمی در سویه‌های

سیانوباکتری‌ها، باکتری‌هایی گرم منفی با سابقه تکاملی بسیار طولانی و تنها موجودات پروکاریوتی که قادر به انجام فتوسنتز اکسیژنیک هستند (Price et al. 2007). تنوع در ریخت‌شناسی و زیستگاه‌ها (به عنوان مثال آب‌های شیرین، شور، خاک‌های خشک و مرطوب)، نشانگر حضور طیف وسیعی از ترکیبات طبیعی است که بقای این موجودات را در مکان‌های اکولوژیکی و رقابتی امکان‌پذیر می‌سازد (Liu et al. 2014, Jafari Porzani et al. 2021, Nowruzi et al. 2020 a,b, Nowruzi et al. 2018a). سموم تولید شده در سیانوباکتری‌ها توسط چندین کمپلکس آنزیمی به طور غیرریبوزومی تولید می‌شوند (Nowruzi et al. 2017a) و عمده‌ترین جنس‌های سیانوباکتریایی تولیدکننده سم *Microcystis*, *Planktothrix*, *Phormidium*, *Anabaena/Dolichospermum*, *Nostoc*, *Hapalosiphon* و *Fischerella* هستند (Nowruzi & Porzani 2021).

شیوع بیماری‌های کبدی و مسمومیت‌های جانوران آبی به ویژه افزایش مرگ و میر ماهی‌ها در دریاچه لواسان، منجر به انجام تحقیقات وسیعی در زمینه شناسایی سم تولید شده توسط سویه‌های سیانوباکتریایی گردید (Nowruzi & Lorenzi 2021a). در واقع، دریاچه لواسان با وجود آرایه‌های سیانوباکتریایی سمی، به ویژه در ماه‌های گرم سال، مکان مناسبی برای تکثیر سویه‌های سمی سیانوباکتری‌ها و بروز شکوفایی جلبکی است (Nowruzi & Lorenzi 2021b). بنابراین، شناسایی دقیق سویه‌های تولیدکننده سم و تشخیص نوع سم تولید شده، بسیار آگاهی‌دهنده خواهد بود (Rajabpour et al. 2019).

ریخت‌شناسی متنوع سویه‌های سیانوباکتری‌ها، مشکلات بسیاری را برای تاکسونومیست‌ها ایجاد نموده، چرا که اغلب موجب شناسایی‌های نادرست شده است. بنابراین، برای بررسی ارتباطات ژنتیکی بین سویه‌ها، توصیه می‌شود که از نشانگرهای مولکولی استفاده گردد (Nowruzi & Lorenzi 2021b). در واقع، کلیدهای شناسایی موجود به دلیل واریاسیون ایجاد شده در ویژگی‌های ریخت‌شناختی سویه‌های سیانوباکتری، امروزه نیاز به بازنگری دارند. تحقیقات جدید نشان می‌دهد که تاکسونومی صحیح باید ترکیبی از خصوصیت‌های ریخت‌شناسی نمونه‌ها با روش‌های چندفازی (polyphasic approaches) شامل اطلاعات فنوتیپیک، کموتاکسونومیک و ژنوتیپی باشد. تاکسونومی براساس توالی‌های ژنتیکی، امکان استنباط فیلوژنی موجودات را فراهم می‌سازد. در واقع، توالی‌های DNA در برابر بسیاری از

خالص سازی سیانوباکتری‌ها از کشت‌های به دست آمده، سه تا پنج بار کشت مجدد تهیه شد تا کاملا از خالص بودن آن اطمینان حاصل شود. جهت انکوباسیون، بین یک تا چهار هفته زمان در نظر گرفته شد (Nowruzi 2020, Hosseini et al. 2019). به منظور اطمینان از خالص بودن سویه‌ها، از تلقیح در محیط کشت R2ALAB163 (R2A) استفاده گردید. بعد از آماده شدن هر محیط، با سر سرنگ سترون زیر لومینار فلو، مقداری از نمونه کشت‌های خالص شده به صورت نقطه نقطه دور تا دور تشتک پتری تلقیح شد. در طول آزمایش سعی گردید از تمام سطح کشت خالص شده، نمونه برداری انجام شود. سپس تشتک‌های پتری تلقیح شده، در دمای ۲۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ تا ۷ روز و یا در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۳ روز قرار داده شد و پس از رشد، وجود و یا عدم وجود پرگنه در اطراف هر نقطه بررسی گردید (Abbaspour et al. 2020). مراحل ریخت‌شناختی سیانوباکتری‌ها، با میکروسکوپ نوری مجهز به میکرومتر مدرج عکس‌برداری گردید (شکل ۱). شناسایی‌ها براساس کلیدهای معتبر (Anagnostidis 1989 & Komárek 2020 Komárek) صورت گرفت. پارامترهای در نظر گرفته شده برای بررسی‌های ریخت‌شناسی عبارت بودند از: طول و قطر سلول‌های رویشی، هتروسیست و آکینت، شکل ریخت‌شناسی سلول انتهایی، شکل فیلامنت‌ها، فاصله بین هتروسیست‌ها و همچنین فاصله بین هتروسیست و نزدیک‌ترین آکینت (محاسبه شده به عنوان تعداد سلول‌ها). پرگنه‌های سویه‌های *Anabaena* در مجموعه کشت میکروبی هر بار یوم البرز واقع در دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات با کدهای دسترسی CCC B3, CCC B5, CCC B6 و CCC B1 قرار داده شد.

ب) شناسایی مولکولی براساس توالی 16S-23S rRNA ITS استخراج DNA به روش دستی CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) انجام گردید. برای تعیین کیفیت DNA هم از روش کیفی به کمک قرار دادن روی ژل الکتروفورز و هم به روش کمی به کمک دستگاه نانودراپ (Thermo Scientific Spectrophotometer) استفاده گردید. کیفیت مطلوب DNA استخراج شده، کیفیت بالای باندها را تضمین می‌کند. قطعات ۱۴۵۴ تا ۱۴۹۴ جفت بازی 16S-23S rRNA ITS به کمک PCR، در حجم ۵۰ میکرولیتر تکثیر گردید. محتوای محلول واکنش، پرایمرها و برنامه PCR در جدول‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است.

مختلف سیانوباکتری‌ها شده است (Tillett et al. 2001, Mikalsen et al. 2003, Jenke-Kodama et al. 2006, Zhaxybayeva et al. 2006, Moustafa et al. 2009, Szöll si et al. 2012).

در ایران، مطالعات بسیار اندکی که روی چندفازی سیانوباکتری‌ها انجام شده، بیشتر محدود به بررسی بیوسنتز ترکیبات زیست فعال در مناطق مختلف است (Nowruzi et al. 2012, 2013, Nowruzi et al. 2018c, Nowruzi et al. 2019). از آن جایی که در مطالعات اخیر توسط نوروزی و همکاران (a,b, ۲۰۲۱)، از چهار سویه مطالعه شده *Anabaena* sp. تنها یک سویه حاوی ژن کلاستر بیوسنتزکننده ana C و تولیدکننده نوروتوکسین هموآنانوکسین a بود (Nowruzi & Lorenzi 2021a)، لذا در مطالعه حاضر، بر آن شدیم تا به مطالعه فیلوژنی مولکولی و ریخت‌شناسی سیانوباکتری سمی *Anabaena* با تکثیر ژن‌های ساختاری در دریاچه لواسان بپردازیم. استراتژی استفاده شده در این مطالعه، به گسترش دانش تنوع سیانوباکتری‌ها و نقش انتقال افقی ژن‌ها در تاریخ تکاملی ترکیبات سمی در این اکوسیستم کمک به سزایی خواهد کرد.

## روش بررسی

### الف) جمع‌آوری، کشت و آنالیزهای فنوتیپیک

نمونه‌های آب از دریاچه لواسان واقع در شمال شرق تهران با مختصات جغرافیایی E ۴۴ ۳۶ ۵۱، N ۳۶ ۴۸ ۳۵، از سطح آب تا عمق ده سانتی‌متری دریاچه به کمک بطری‌های پلاستیکی جمع‌آوری گردید. نمونه‌برداری‌ها علاوه بر سیانوباکتری‌های پلانکتونی، از بنتیک و چسبیده به سطوح مختلف نیز انجام شد. هنگام نمونه‌برداری، دقت شد که قسمت فوقانی ظروف خالی بماند تا هوا به اندازه کافی وجود داشته باشد (Nowruzi & Lorenzi 2021a). محیط کشت جامد BG11 فاقد نیترات برای کشت و خالص‌سازی سویه‌های سیانوباکتری آماده گردید. pH محیط کشت مورد نظر در حد ۷/۱ تنظیم گردید. تشتک‌های پتری محتوی پرگنه‌های سیانوباکتریایی در داخل اتاقک رشد با شدت روشنایی ۴۰ تا ۶۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه و دمای  $28 \pm 2$  درجه سلسیوس قرار داده شدند (Nowruzi & Lorenzi 2021a).

به منظور جداسازی و خالص‌سازی سویه‌های مختلف *Anabaena*، مقداری از هر پرگنه با رنگ‌های مختلف در شرایط سترون و زیر لومینار فلو توسط لوپ برداشته و روی محیط کشت جامد به صورت زیگزاگ کشت داده شد. به منظور

## جدول ۱- مواد و مقادیر لازم برای واکنش PCR

Table 1. Reagents needed for the PCR reaction

ul needed/reaction	Reagent
328.5	Water ultrafilter (BioPak)
45	Buffer: 10 x (DyNAzyme™ PCR buffer, Finnzymes)
9	(dATP, dGTP, dCTP, dTTP) dNTP
22.5	Forward primer
22.5	Reverse primer
2	DNA
4.5	(DyNAzyme™ II DNA polymerase, Finnzymes) DNA polymerase 2U $\mu\text{l}^{-1}$

## جدول ۲- ژن‌های هدف، پرایمرها و برنامه PCR استفاده شده در این بررسی

Table 2. Target genes, oligonucleotide primers and PCR program used in this study

Target gene/sequence	Sequence	Thermal profile	Reference
16S rRNA	PA (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') B23S (5'-CTTCGCTCTGTGTGCCTAGGT-3')	94 °C, 3 min, 30 x (94 °C, 30 s; 55 °C, 40 s; 72 °C, 1.30 min), 72 °C, 3 min; 4 °C,	Taton <i>et al.</i> 2003
16S-23S rRNA ITS	ITS-F (5'-TGACACACCGCCCGTC-3') ITS-R (5'-CTCTGTGTGCCTAGGTATCC-3')		Iteman <i>et al.</i> 2000

ج) ترسیم درختان فیلوژنتیک و ثبت ژن جستجوی بلاست نوکلئوتید برای یافتن توالی‌های مشابه ژن 16S rRNA که در پایگاه داده‌های GenBank™ در NCBI موجود است، انجام گردید. هم‌ردیف‌سازی توالی ژن 16S rRNA به دست آمده در این بررسی به همراه دیگر توالی‌های مشابه برگرفته از GenBank با استفاده از برنامه MAFFT Ver. 7 انجام گردید. پس از انتخاب بهترین مدل، رسم درختان فیلوژنتیک با برنامه Iqtree server و با استفاده از آنالیز Maximum Likelihood انجام گردید. ویرایش درخت حاصله به کمک برنامه Figtree و Inkscape انجام شد. عملیات ثبت ژن با استفاده از نرم‌افزار Bankit انجام گردید. برای اخذ کد دسترسی توالی‌های نوکلئوتیدی توالی‌یابی شده، چهار سویه در پایگاه داده‌های (DNA Data Bank of Japan, DDBJ) ثبت شدند و به آن رمز

یا شماره‌ای ویژه همان توالی تعلق گرفت.

نتیجه - ویژگی‌های ریخت‌شناختی

سویه‌های تیره *Nostocaceae* جزو سیانوباکتری‌های رشته‌ای غیرمنشعب دارای سلول‌های تخصصی (هتروسیست و آکینت) و تال‌هایی در شکل‌های متنوع می‌باشند. مطالعه ریخت‌شناختی سویه سمی *Anabaena* sp. B3 (CCC B3) نشان داد که ریشه‌ها به رنگ سبز روشن، تریکوم‌ها راست و فاقد پیچ‌خوردگی، گاهی خمیده و بدون غلاف مشخصی بودند. هتروسیست‌ها منفرد، کروی، بینابینی و یا انتهایی و سلول انتهایی مخروطی شکل و در انتها کمی باریک‌شدگی داشتند که دارای سلول‌های رویشی استوانه‌ای شکل بودند. سلول‌های رویشی در *Anabaena* sp. B5 (CCC B5) کاملاً کشیده و هتروسیست‌ها، کروی بودند. همچنین، سلول‌های رویشی در *Anabaena* sp. B6 (CCC B6) بشکه‌ای شکل و هتروسیست‌ها، کروی تا بشکه‌ای شکل بودند. سلول‌های رویشی و هتروسیست‌ها

ژن جستجوی بلاست نوکلئوتید برای یافتن توالی‌های مشابه ژن 16S rRNA که در پایگاه داده‌های GenBank™ در NCBI موجود است، انجام گردید. هم‌ردیف‌سازی توالی ژن 16S rRNA به دست آمده در این بررسی به همراه دیگر توالی‌های مشابه برگرفته از GenBank با استفاده از برنامه MAFFT Ver. 7 انجام گردید. پس از انتخاب بهترین مدل، رسم درختان فیلوژنتیک با برنامه Iqtree server و با استفاده از آنالیز Maximum Likelihood انجام گردید. ویرایش درخت حاصله به کمک برنامه Figtree و Inkscape انجام شد. عملیات ثبت ژن با استفاده از نرم‌افزار Bankit انجام گردید. برای اخذ کد دسترسی توالی‌های نوکلئوتیدی توالی‌یابی شده، چهار سویه در پایگاه داده‌های (DNA Data Bank of Japan, DDBJ) ثبت شدند و به آن رمز یا شماره‌ای ویژه همان توالی تعلق گرفت.

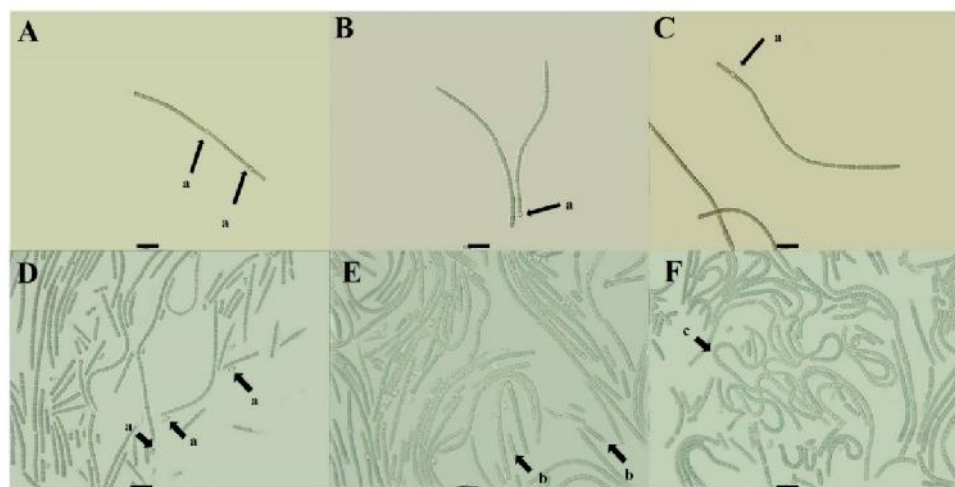
د) آنالیز ساختار ثانویه 16S-23S rRNA ITS به منظور رسم ساختار ثانویه 16S-23S rRNA ITS از وب سرور Mfold (ورژن ۲/۳) استفاده شد (Zuker, 2003). مناطق مختلف مارپیچ D1-D1، مارپیچ D2، D3، ژن tRNAIle، مارپیچ V2، ژن tRNAAla و Box B طبق

در *Anabaena* sp. B1 (CCC B1) بشکله‌ای شکل تا کشیده بودند. به علاوه، آکینت در هیچ‌کدام از سویه‌های *Anabaena* sp. مطالعه شده یافت نگردید (جدول ۳).

### جدول ۳- ویژگی‌های ریخت‌شناختی در چهار سویه *Anabaena*

**Table 3.** Morphological characteristics of the four *Anabaena* strains

Strain	Vegetative cell		Heterocyte	
	Shape	Size ( $\mu\text{m}$ )	Shape	Size ( $\mu\text{m}$ )
<i>Anabaena</i> sp. B3 (CCC B3)	Cylindrical-shaped	2.4–6.5 $\times$ 4.2–7.4	Barrel-shaped	5.0–6.7 $\times$ 6.7–7.5
<i>Anabaena</i> sp. B5 (CCC B5)	Elongated-shaped	3.4–5.2 $\times$ 5.4–6.7	Spherical-shaped	5.6–8.2 $\times$ 6.2–6.7
<i>Anabaena</i> sp. B6 (CCC B6)	Barrel-shaped	3.4–8.0 $\times$ 0.5–6.6	Spherical barrel-shaped	3.4–8.2 $\times$ 2.6–4.5
<i>Anabaena</i> sp. B1 (CCC B1)	Barrel-shaped	3.4–8.8 $\times$ 3.2–3.4	Elongated barrel-shaped	3.4–8.2 $\times$ 4.5–7.8



شکل ۱- A. سویه *Anabaena* sp. B5، B. *Anabaena* sp. B6، C. *Anabaena* sp. B1، D-F. *Anabaena* sp. B3. ویژگی‌های ریخت‌شناختی برجسته با نشانگر مشخص شده است. (a) هتروسیست‌ها، (b) هورموگونیم‌ها با تعداد سلول‌های مختلف، (c) سلول‌های رویشی (مقیاس = ۱۰ میکرومتر).

**Fig. 1.** A. *Anabaena* sp. B5, B. *Anabaena* sp. B6, C., *Anabaena* sp. B1, D-F. *Anabaena* sp. B3. (Morphological characteristics are well-spotted). (a) Heterocytes, (b) Hormogonia with different number of cells, (c) Vegetative cells (Bar = 10  $\mu\text{m}$ ).

فیلوژنتیک رسم شده با روش Maximum Likelihood. هر شاخه روابط بین آرایه‌ها از نظر نیاکان یا نسل (جد) را معین می‌کند. طول شاخه، بیانگر میزان تفاوت‌ها نسبت به نیای مشترک است. در واقع، طول شاخه تعداد تغییرهایی که در یک شاخه رخ داده را نشان می‌دهد. برای ترسیم درخت فیلوژنتیک، در مجموع، از ۱۶۰ سویه مختلف در راسته *Nostocales* استفاده گردید. درخت فیلوژنتیک ترسیم شده، نشان داد که سویه‌های

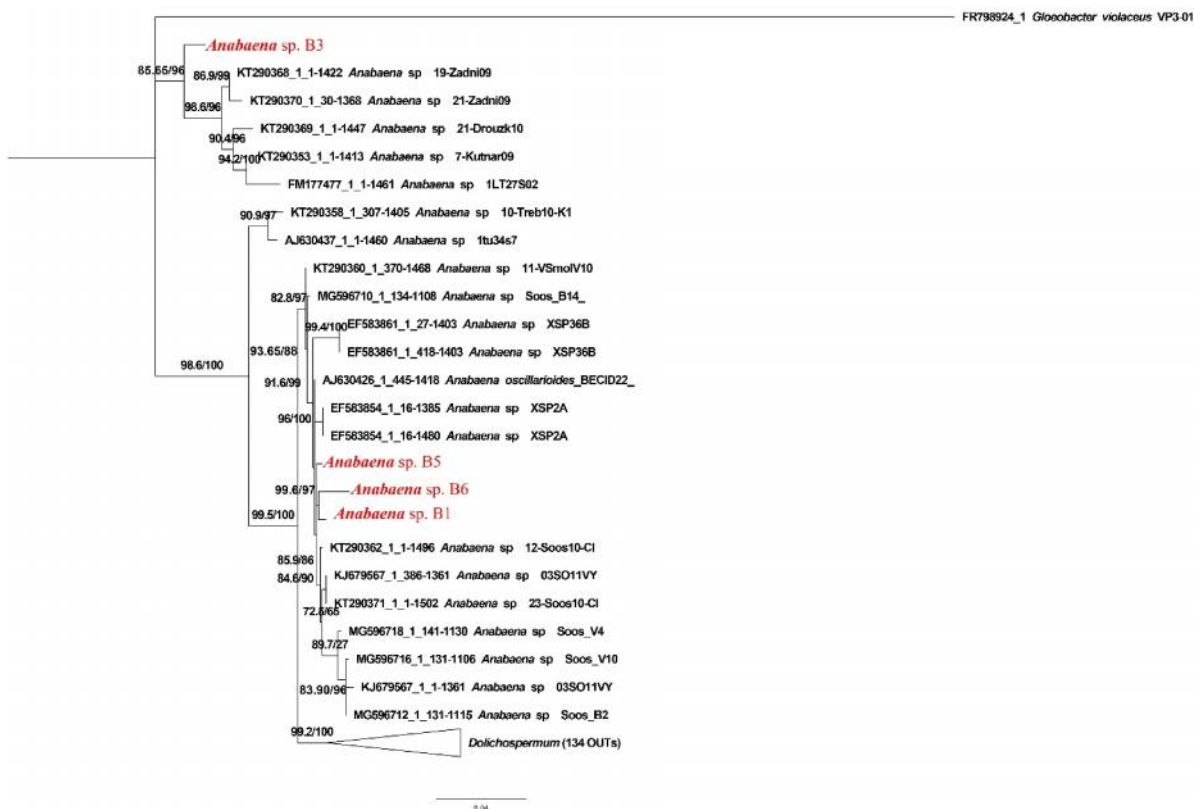
- آنالیزهای فیلوژنتیک

برای رسم درخت فیلوژنتیک، از سویه *Gloeobacter violaceus* VP3-01 (FR798924) به عنوان ریشه استفاده گردید. نتایج حاصل از ارزیابی، بهترین مدل برای ترسیم درخت، استفاده از وب سرور tree server، IQ، TVM+F+I+G4 بود. اعداد کنار هر گره انشعابی نشان‌دهنده فراوانی حاصل از آنالیز Bootstrap حاصل از ۱۰۰۰ تکرار است. با توجه به درخت



– آنالیز ساختار ثانویه 16S-23S rRNA ITS براساس ایتمن و همکاران (Iteman *et al.* 2000)، هفت منطقه مارپیچ D1-D1، مارپیچ D2، D3، ژن tRNA<sup>Ile</sup>، مارپیچ V2، ژن tRNA<sup>Ala</sup> و B Box روی ژن ITS مشخص گردید. مناطق مختلف روی مارپیچ D1-D1، به صورت لوپ انتهایی دوطرفه (A)، لوپ دوطرفه میانی (B)، لوپ یک طرفه (C) و قاعده لوپها (D) مشخص شد و مناطق مختلف روی B Box به صورت لوپ انتهایی دوطرفه (A) و لوپ دوطرفه میانی (B) مشخص گردید. مهم‌ترین تفاوت سویه سمی *Anabaena* sp. B3 با سایر سویه‌های غیرسمی *Anabaena* sp. تعداد نوکلئوتیدهای لوپ انتهایی دو طرفه و تعداد لوپ‌های دوطرفه میانی در مارپیچ D1-D1 بود (جدول‌های ۴ و ۵). این در حالی است که B Box سویه سمی *Anabaena* sp. B3 با سایر سویه‌های غیرسمی *Anabaena* sp. هیچ تفاوتی نداشت (شکل‌های ۳ و ۴).

فاقد ژن‌های سمی درون یک کلاد با قرابت فیلوژنتیک ۹۹/۶٪ قرار می‌گیرند، در حالی که سویه سمی *Anabaena* sp. B3 (CCC B3)، با سه سویه غیرسمی درون یک کلاد خوشه‌بندی نمی‌شود. در واقع، سویه سمی با حمایت بالای Bootstrap در یک شاخه جدا همراه با سویه‌های *Anabaena* sp. 19- *Anabaena* sp. 21- *Anabaena* sp. 21-Zadni09، *Zadni09*، *Drouzk10*، *Anabaena* sp. 7-Kutnar09 و *Anabaena* sp. 1LT27S02 با قرابت فیلوژنتیک ۸۵/۶۵٪ در یک کلاد قرار گرفت. آنالیزهای فیلوژنتیکی نشان‌دهنده فاصله بین سویه سمی و سویه‌های دیگر از لحاظ تکاملی بود. مقیاس نشان داده شده در شکل ۲، نشان‌دهنده ۰/۰۴ جهش به ازای هر نوکلئوتید بود. توالی‌ها در بانک ژن ژاپن با کدهای دسترسی MH453370 (strain CCC B1)، MH453372 (strain CCCB3)، MH453374 (strain CCCB5) و MH453375 (strain CCC B6) ثبت شدند.



شکل ۲– روابط فیلوژنتیکی بین چهار سویه *Anabaena* sp. مطالعه شده (بولد و هایلایت شده) و سایر سویه‌های سیانوباکتریایی مرتبط براساس توالی ژن 16S rDNA *Gloeobacter violaceus* VP3-01 به عنوان گروه خارجی (اعداد کنار هر گره، نشان‌دهنده درصد استاندارد بوت استرپ/درصد حمایت بوت استرپ برای آنالیز حداکثر بزرگ‌نمایی هستند).

**Fig. 2.** Phylogenetic relationships between studied strain of *Anabaena* sp. (bold & highlighted) and related cyanobacteria based on 16S rDNA sequences with *Gloeobacter violaceus* VP3-01 as out group (Numbers near nodes indicate standard bootstrap/%age of ultrafast bootstrap support for ML analyses).

**جدول ۴- مقایسه ساختار ثانویه 16S-23S rRNA (D1-D1' helix و Box-B helix) بین سویه سمی *Anabaena* sp. B3 با سایر سویه‌های غیرسمی *Anabaena* sp.**

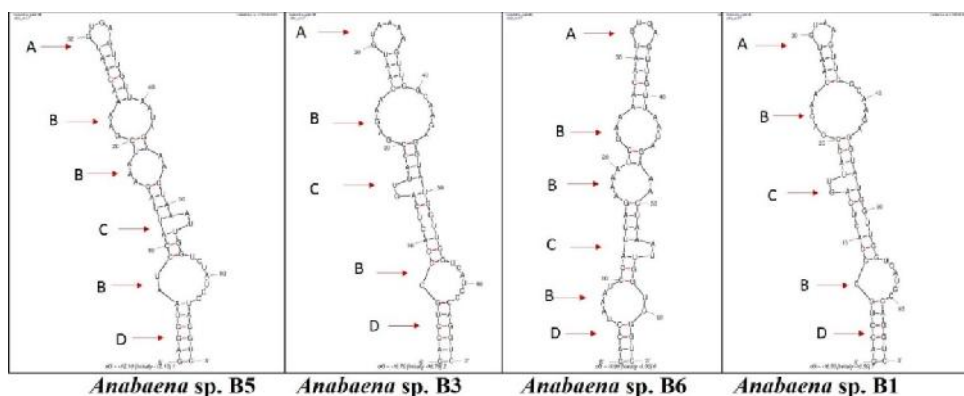
**Table 4.** Comparison of secondary structure of 16S-23S rRNA (D1-D1' helix and Box-B helix) between toxic *Anabaena* sp. B3 and other non-toxic strains of *Anabaena* sp.

Studied strain	D1-D1' helix				Box B	
	Terminal bilateral bulge (A)	Bilateral bulge (B)	Unilateral bulge (C)	Basal clamp (D)	Terminal bilateral bulge (A)	Bilateral bulge (B)
	No. of nucleotide	No. of loop	No. of loop	No. of nucleotide	No. of nucleotide	No. of nucleotide
<i>Anabaena</i> sp. B5	6	3	1	12	6	11
<i>Anabaena</i> sp. B3	8	2	1	12	6	11
<i>Anabaena</i> sp. B6	6	3	1	8	6	11
<i>Anabaena</i> sp. B1	6	2	1	12	6	11

**جدول ۵- مقایسه طول و تعداد لوپ‌های تشکیل شده در منطقه ITS سویه سمی *Anabaena* sp. B3 با سایر سویه‌های غیرسمی *Anabaena* sp.**

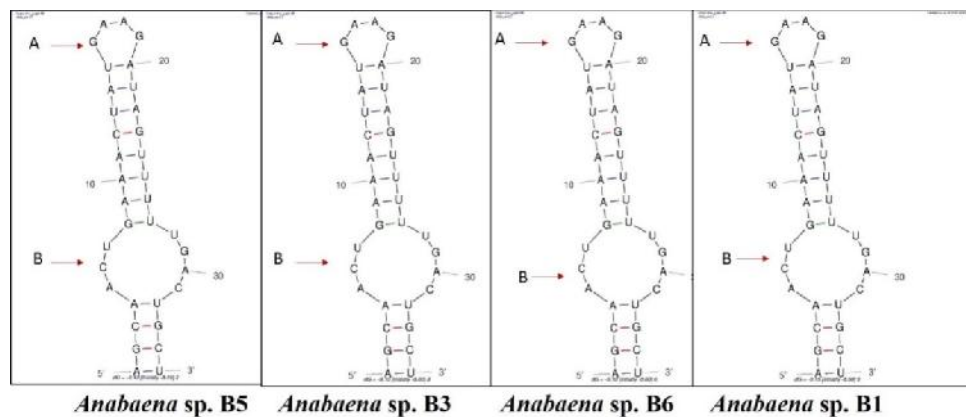
**Table 5.** Comparison of the nucleotides length of ITS regions of toxic *Anabaena* sp. B3 and other non-toxic strains of *Anabaena* sp.

Studied strain	D1-D1' helix	Spacer+D2+spacer	D3 with spacer	trRNA <sup>leu</sup> gene	Spacer+V2+spacer	TrRNA <sup>Ala</sup> gene	Pere Box B spacer	Box B
<i>Anabaena</i> sp. B5	69	113	10	74	80	73	15	30
<i>Anabaena</i> sp. B3	68	113	10	74	80	73	15	35
<i>Anabaena</i> sp. B6	64	112	10	74	80	73	15	35
<i>Anabaena</i> sp. B1	66	113	10	74	80	73	15	35



**شکل ۳- پیش‌بینی ساختار ثانویه مارپیچ D1-D1' سویه سمی *Anabaena* sp. B3 در مقایسه با سایر سویه‌های غیرسمی *Anabaena* sp. (از وب سرور M-fold، ورژن ۲/۳، دما ۳۷ درجه سلسیوس): A. لوپ انتهایی دوطرفه، B. لوپ دوطرفه میانی، C. لوپ یک‌طرفه، D. لوپ قاعده‌ای.**

**Fig. 3.** Predicted secondary structures for the D1-D1' helices of *Anabaena* sp. B3 and the other non-toxic strains *Anabaena* sp. (generated from M-fold web server, Ver. 2.3, temp. 37 °C default): A. Terminal bilateral bulge, B. Bilateral bulge, C. Unilateral bulge, D. Basal clamp.



**شکل ۴-** پیش‌بینی ساختار ثانویه مارپیچ Box B سویه سمی *Anabaena* sp. B3 با سایر سویه‌های غیرسمی *Anabaena* sp. (از وب سرور M-fold، ورژن ۲/۳، دما ۳۷ درجه سلسیوس): A. لوپ انتهایی دوطرفه، B. لوپ دوطرفه میانی.

**Fig. 4.** Predicted secondary structures for the Box B helices of *Anabaena* sp. B3 and the other non-toxic strains *Anabaena* sp. (generated from M-fold web server, Ver. 2.3, temp. 37 °C default): A. Terminal bilateral bulge, B. Bilateral bulge.

ریسه‌ای استفاده کرد. به همین ترتیب، مطالعه توالی نوکلئوتیدی ژن‌های rRNA، نشان داد که جنس‌هایی که درون یک تیره به صورت اجماع گروه‌بندی شده و دارای ژن‌های تولیدکننده baecocyte یا اندوسپور هستند، درون کلاسترها یا انشعابات مرتبط با هم، درون درختان فیلوژنتیکی، گروه‌بندی می‌شوند (Prabha & Singh 2019). نتایج تحقیق فوق نشان داد، سویه‌هایی که ژن‌های تولیدکننده یکسانی داشتند، درون یک کلاذ گروه‌بندی شدند که دقیقاً مطابق با نتایج تحقیق حاضر بود. همان‌طور که در قسمت نتایج نیز آشکار است، سویه‌های فاقد ژن‌های سمی با سویه‌های سمی درون یک گروه خوشه‌بندی نشدند.

نتایج تحقیقاتی که هم راستا با مطالعه حاضر است نشان داد، گروه‌بندی‌های ژنتیکی معمولاً توسط یک ویژگی فنوتیپیک که همان توانایی تولید نودولارین است، حمایت می‌شوند. در واقع محققان، از PCR ژن ۱۶S rRNA برای کشف سریع سویه‌های تولیدکننده نودولارین استفاده کردند که نتایج آن نشان داد، کلاستر *Nodularia spumigena* تولیدکننده سم نودولارین جدا از گونه‌های بنتیک *N. harveyana* و *N. sphaerocarpa* است (Gupta et al. 2014, Mahansaria et al. 2018). نتایج حاصل از تحقیق مذکور کاملاً هم راستا با تحقیق حاضر بود.

در مطالعه دیگری توسط سیهونن و همکاران (Sihvonon et al. 2007)، از توالی ژن 16S rRNA برای تفکیک جنس‌های مختلف استفاده کردند؛ به این ترتیب که

## بحث

در حال حاضر، پیشرفت‌های قابل توجهی در سیستماتیک راسته *Nostocales* با شرح سویه‌های مختلف صورت گرفته است (Galhano et al. 2011, Werner et al. 2012, Krienitz et al. 2013, Zapomlová et al. 2010, Hentschke et al. 2017). در این مطالعه، با استفاده از یک رویکرد چندفازی و ترکیب مطالعات ریخت‌شناختی به علاوه تجزیه و تحلیل‌های مولکولی، سویه سمی موجود در دریاچه لواسان با استفاده از ژن‌های ساختاری 16S rRNA و Internal transcribed spacer (ITS) بررسی گردید. در واقع، توالی ژن ساختاری ۱۶S rRNA به طور جزئی (partial) یا به طور کامل (full)، حاوی اطلاعات با ارزش در زمینه تعیین روابط بین موجودات پروکاریوتیک است. مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که در بسیاری از موارد، نتایج حاصل از اطلاعات توالی‌های rRNA، با تاکسونومی سنتی یعنی استفاده از مطالعات ریخت‌شناختی در سیانوباکتری‌ها مطابقت دارد. برای مثال، بعضی از گونه‌هایی که در راسته *Oscillatoriales* قرار دارند و به عنوان *Oscillatoria* spp. گروه‌بندی شدند (شامل سویه‌های *Lyngbya*, *Phormidium*, *Plectonema*, *Microcoleus* تک‌سلولی که به جنس‌های *Synechococcus*, *Synechocystis*, *Gloeocapsa* و *Gloeotheca* ارجاع داده می‌شدند، درون انشعابات مختلفی از درخت فیلوژنتیکی قرار می‌گیرند (Anand et al. 2019). نتایج این تحقیق نشان داد که چگونه می‌توان از توالی‌های rRNA به منظور تمایز جنس‌های تک‌سلولی و



*Nostocales*، اسوریو-سانتوز و همکاران ( Osorio-Santos et al. 2014)، هفت گونه جدید *Oculatella* از راسته *Pseudanabaenales*، لئون تجرا و همکاران ( León-Tejera et al. 2016)، دو سویه جدید *Cephalothrix komarekiana* sp. nov. و *Cephalothrix lacustris* sp. nov. و همکاران ( Villanueva et al. 2019)، دو سویه سیانوباکتری جدید *Brasilonema geniculatum* و *Calothrix dumus* جدا شده از سنگ‌های آهکی فلوریدای آمریکا، ماهانساریا و همکاران ( Mahansaria et al. 2018)، جنس جدید *Oxynema aestuarii* را از هندوستان، واز و همکاران ( Vaz et al. 2015)، جنس‌های جدید *Pantalaninema* gen. nov. و *Alkalinema* gen. nov. را از دریاچه شور و قلیایی، جاهوداروا و همکاران ( Jahodá ová et al. 2018)، جنس جدید *Elainella* gen. nov. و گنزالس-رزندیز و همکاران ( González-Resendiz et al. 2018)، دو گونه جدید *Phyllonema* از تیره *Rivulariaceae* را براساس توالی ژن‌های 16S rRNA و آی.تی.اس. شناسایی کردند ( Vaz et al. 2015، Cai et al. 2018، González-Resendiz et al. 2018، Shalygin Mahansaria et al. 2018، Villanueva et al. et al. 2018، 2019، León-Tejera et al. 2016، Osorio-Santos et al. 2014). به علاوه، بریتو و همکاران ( Brito et al. 2017)، با استفاده از مناطق 16S rRNA، ITS و 23S rRNA برای شناسایی جنس جدید *Pleurocapsales* جمع‌آوری شده از سواحل آتلانتیک استفاده کردند ( Brito et al. 2017). همچنین، از ژن 16S rRNA و مناطق مختلف و حفاظت شده ژن آی.تی.اس. برای بررسی جنس *Geitlerinema* و شرح جنس جدید *Anagnostidinema* gen. nov. (*Oscillatoriothycidae*) (Johansen et al. 2017) استفاده شد.

منطقه آی.تی.اس. با حضور ژن‌های tRNA در بسیاری از موارد برای تمایز دو سویه کاملا متفاوت بسیار راه‌گشا است به عنوان مثال، بویر و همکاران ( Boyer et al. 2002). از آنالیز توالی ژن 16S rRNA و مناطق آی.تی.اس.، برای فیلوژنی و تنوع ژنتیکی دو گونه سیانوباکتری خاک‌زی *Microcoleus* استفاده کردند. به این معنا که *M. vaginatus* هر دو ژن tRNA (tRNA Ile & tRNA Ala) را داشت، در حالی که سویه *M. steenstrupii*، تنها ژن tRNA Ile را دارا بود ( Boyer et al. 2002). در مطالعه دیگری توسط برندرو گومز و همکاران ( Berrendero Gómez et al. 2016)، از ساختار ثانویه آی.تی.اس. برای تشخیص سه گونه *Mastigoteuthis psychrophila* جدا شده از محیط‌های سرد، *Macrochaete santanae* جدا شده از دیوارهای مرطوب مناطق نیمه‌گرمسیری در آمریکای جنوبی و *Macrochaete*

از بررسی ۴۲ کشت سیانوباکتریایی متعلق به جنس‌های *Rivularia*، *Gloeotrichia*، *Calothrix* و *Tolypothrix* از لحاظ ریخت‌شناختی مشابه بودند دریافتند که *Calothrix*، *Gloeotrichia* و *Tolypothrix* یک گروه منوفیلیتیک را تشکیل نمی‌دهند و دارای تنوع ژنتیکی بسیار زیادی هستند. نتایج این تحقیق نشان داد که نشانگر ژنی 16S rRNA، برای تفکیک جنس‌های سیانوباکتری از کارآیی لازم برخوردار بود.

آی.تی.اس.، نشانگر مناسبی برای بررسی‌های تنوع درون گونه‌ای در سیانوباکتری‌ها است. این توالی، بسیار متنوع‌تر از توالی ژن 16S rRNA است و کاربرد زیادی برای تمایز گونه‌های مختلف درون یک جنس دارد. به عنوان مثال، رهاکووا و همکاران ( eháková et al. 2007) از تنوع ساختار ثانویه آی.تی.اس. برای مقایسه *Nostoc commune* و *Nostoc punctiforme* استفاده کردند. همچنین، بوهونیکا و همکاران ( Bohunická et al. 2015)، از توالی مذکور و مارپیچ‌های Box-B و V3 برای تشخیص چهار گونه جنس *Roholtiella* استفاده کردند. در تحقیق حاضر، نیز به منظور تفکیک بیشتر سویه تولیدکننده سم با سایر سویه‌های غیرسمی یافت شده در دریاچه لواسان از مناطق متنوع موجود در آی.تی.اس. استفاده گردید، در حالی که منطقه B Box هیچ تفاوتی را بین سویه‌های یافت شده نشان نداد. مارپیچ D1-D1، شامل تفاوت‌های قابل ملاحظه‌ای به منظور تفکیک سویه‌های مطالعه شده بود.

در همین ارتباط، تحقیقات بسیاری در زمینه شناسایی جنس‌ها و گونه‌های جدید با استفاده از ژن‌های ساختاری و عملکردی انجام شده است. برای مثال، نوروزی و شالیگین (Nowruzi & Shalygin 2021)، با استفاده از ژن نشانگرهای *rpoC1*، *rbcL* و ITS 16S-23S، موفق به شناسایی گونه جدید *Dulcicalothrix alborzica* جدا شده از مزارع استان کرمانشاه شدند. همچنین، نوروزی و سورز (Nowruzi & Soares 2021) در تحقیقات دیگری در همان استان، با استفاده از ژن نشانگرهای 16S-23S ITS rRNA و MCY، موفق به معرفی جنس جدید *Alborzia kermanshahica* gen. nov. جدا شده از مزارع منطقه یادشده شدند. مارتینز و همکاران ( Martins et al. 2016)، جنس جدید *Ancylothrix* gen. nov. از تیره *Phormidiaceae* را براساس مطالعات پلی‌فازیک و استفاده از مناطق ساختار ثانویه D1-D1 و Box-B و V3 معرفی نمودند. کای و همکاران (Cai et al. 2018)، جنس جدید *Desmonostoc danxiaense* sp. nov. از راسته *Nostocales* را از کوهستان Danxia در چین، شالیگین و همکاران (Shalygin et al. 2018) گونه جدید *Rivulariahalophila* sp. nov. از راسته

مدرن *Anabaena* توانایی تولید homoanatoxin-a را از دست داده‌اند و انتقال افقی ژن‌های سمی دیگر به سویه‌های دیگر انجام نشده است (Aráoz *et al.* 2005, Cadel-Six *et al.* 2007, Furey *et al.* 2003, Méjean *et al.* 2010, Rantala *et al.* 2019, Wood *et al.* 2007, Nowruzi & Blanco 2011). واقع، انتقال افقی ژن‌ها، معمولاً با نوترکیبی و جابه‌جایی هومولوگ‌های باقیمانده همراه است که اکنون نقش مهمی در شکل‌گیری تاریخ تکاملی پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها دارد (Zhaxybayeva *et al.* 2006). رویکرد استفاده شده در این مطالعه، منجر به شرح سویه سمی *Anabaena* sp. B3 شد که به افزایش دانش علمی در مورد تنوع سیانوباکتری‌های سمی در دریاچه لواسان کمک به سزایی می‌نماید.

*lichenoides* هم‌زیست با گل‌سنگ جدا شده از اروپا استفاده کردند (Berrendero Gómez *et al.* 2016).

نتایج حاصل از رسم درختان فیلوژنتیک پیشنهاد می‌کند که انتقال افقی ژن‌ها ممکن است نقش مهمی را در پراکنش ژن‌های بیوسنتزی سمی درون آرایه‌های *Anabaena* sp. داشته باشد. در این مطالعه، از آنالیز ژن 16S rRNA برای آشکار کردن نقش انتقال افقی ژن‌ها در تاریخ تکاملی محصولات طبیعی سمی استفاده گردید. نتایج تحقیق حاضر همچنین نشان داد، توانایی تولید ترکیب سمی homoanatoxin-a در سویه‌های آنالیز شده پراکنش وسیعی ندارد و ممکن است در نتیجه حذف انتقال افقی ژن‌های سمی به جنس‌های دیگر *Anabaena* منتقل نشده باشد. به بیان دیگر، از آنجایی که ژن‌های بیوسنتزی homoanatoxin-a در سویه سمی *Anabaena* sp. B3 قدیمی است، لذا سویه‌های

## References

- Abbaspour, S., Nowruzi, B. & Hamdi, S.M. 2020. Optimizing the cultivation conditions of *Fischerella* sp. SH. A Cyanobacterium for maximizing polysaccharide production with antibacterial activity. *Biological Journal of Microorganisms* 9(34): 23–53.
- 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.
- Aráoz, R., Nghiem, H.O., Rippka, R., Palibroda, N., de Marsac, N.T. & Herdman, M. 2005. Neurotoxins in axenic oscillatorian cyanobacteria: coexistence of anatoxin-a and homoanatoxin-a determined by ligand-binding assay and GC/MS. *Microbiology* 151(4): 1263–1273.
- Berrendero Gómez, E., Johansen, J.R., Kaštovský, J., Bohunická, M. & apková, K. 2016. Macrochaete gen. nov. (Nostocales, Cyanobacteria), a taxon morphologically and molecularly distinct from *Calothrix*. *Journal of Phycology* 52(4): 638–655.
- Bohunická, M., Pietrasiak, N., Johansen, J.R., Gómez, E.B., Hauer, T., Gaysina, L.A. & Lukešová, A. 2015. *Roholtiella*, gen. nov. (Nostocales, Cyanobacteria)- a tapering and branching cyanobacteria of the family Nostocaceae. *Phytotaxa* 197(2): 84–103.
- Boyer, S.L., Johansen, J.R., Flechtner, V.R. & Howard, G.L. 2002. Phylogeny and genetic variance in terrestrial *Microcoleus* (cyanophyceae) species based on sequence analysis of the 16s rna gene and associated 16s-23s its region 1. *Journal of Phycology* 38(6): 1222–1235.
- Brito, A., Ramos, V., Mota, R., Lima, S., Santos, A., Vieira, J., Vieira, C.P., Kaštovský, J., Vasconcelos, V.M. & Tamagnini, P. 2017. Description of new genera and species of marine cyanobacteria from the Portuguese Atlantic coast. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 111: 18–34.
- Cadel-Six, S., Peyraud-Thomas, C., Brient, L., De Marsac, N.T., Rippka, R. & Mejean, A. 2007. Different genotypes of anatoxin-producing cyanobacteria coexist in the Tarn River, France. *Applied and Environmental Microbiology* 73(23): 7605–7614.
- 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.

- Furey, A., Crowley, J., Shuilleabhain, A.N., Skulberg, O.M. & James, K.J. 2003. The first identification of the rare cyanobacterial toxin, homoanatoxin-a, in Ireland. *Toxicon* 41(3): 297–303.
- Galhano, V., De Figueiredo, D.R., Alves, A., Correia, A., Pereira, M.J., Gomes-Laranjo, J. & Peixoto, F. 2011. Morphological, biochemical and molecular characterization of *Anabaena*, *Aphanizomenon* and *Nostoc* strains (Cyanobacteria, Nostocales) isolated from Portuguese freshwater habitats. *Hydrobiologia* 663(1): 187–203.
- 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.
- Gupta, S.K., Padmanabhan, B.R., Diene, S.M., Lopez-Rojas, R., Kempf, M., Landraud, L. & Rolain, J.M. 2014. ARG-ANNOT, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genomes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58(1): 212–220.
- Hentschke, G.S., Johansen, J.R., Pietrasiak, N., Fiore, M.D.F., Rigonato, J., Sant'Anna, C.L. & Komarek, J. 2016. Phylogenetic placement of *Dapisostemon* gen. nov. and *Streptostemon*, two tropical heterocytous genera (Cyanobacteria). *Phytotaxa* 245(2): 129–143.
- Hosseini, N., Akhavan, A. & Nowruzi, B. 2019. Detection and relation of polyketide synthase (PKSs) genes with antimicrobial activity in terrestrial Cyanobacteria of Lavasan. *Iranian Journal of Medical Microbiology* 12(6): 419–431.
- 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.
- Jahodá ová, E., Dvořák, P., Hašler, P., Holušová, K. & Poulíková, A. 2018. *Elainella* gen. nov.: a new tropical cyanobacterium characterized using a complex genomic approach. *European Journal of Phycology* 53(1): 39–51.
- Jenke-Kodama, H., Börner, T. & Dittmann, E. 2006. Natural biocombinatorics in the polyketide synthase genes of the actinobacterium *Streptomyces avermitilis*. *PLoS Computational Biology* 2(10): 1210–1218.
- Johansen, J.R., Strunecký, O., Bohunická, M., apková, K., Raabová, L., Dvořák, P. & Komárek, J. 2017. A revision of the genus *Geitlerinema* and a description of the genus *Anagnostidinema* gen. nov. (Oscillatorophycidae, Cyanobacteria). *Fottea* 17(1): 114–126.
- Jafari Porzani, S., Konur, O. & Nowruzi, B. 2021. Cyanobacterial natural products as sources for antiviral drug discovery against COVID-19. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. Pp. 1–17.
- Komárek, J. 2020. Quo vadis, taxonomy of cyanobacteria. *Fottea* 20(1): 104–110.
- Komárek, J. & Anagnostidis, K. 1989. Modern approach to the classification system of Cyanophytes 4-Nostocales. *Archiv für Hydrobiologie. Supplementband. Monographische Beiträge* 82(3): 247–345.
- Krienitz, L., Dadheech, P.K. & Kotut, K. 2013. Mass developments of the cyanobacteria *Anabaenopsis* and *Cyanospira* (Nostocales) in the soda lakes of Kenya: ecological and systematic implications. *Hydrobiologia* 703(1): 79–93.
- 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.

- León-Tejera, H.P., Gonzalez-Resendiz, L., Johansen, J.R., Segal-Kischinevsky, C.L.A.U.D.I.A., Escobar, V. & Lois, L.A. 2016. Phylogenetic position reevaluation of *Kyrtuthrix* and description of a new species *K. huatulcensis* from Mexico's Pacific coast. *Phytotaxa* 278(1): 1–18.
- Mahansaria, A.P., Jaisankar, P. & Mukherjee, J. 2018. *Oxynemaestuaria* sp. nov. (Microcoleaceae) isolated from an Indian mangrove forest. *Phytotaxa* 374(1): 24–40.
- Martins, M.D., Rigonato, J., Taboga, S.R. & Branco, L.H.Z. 2016. Proposal of *Ancylothrix* gen. nov., a new genus of *Phormidiaceae* (Cyanobacteria, Oscillatoriales) based on a polyphasic approach. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66(6): 2396–2405.
- Méjean, A., Peyraud-Thomas, C., Kerbrat, A.S., Golubic, S., Pauillac, S., Chinain, M. & Laurent, D. 2010. First identification of the neurotoxin homoanatoxin-a from mats of *Hydrocoleum lyngbyaceum* (marine cyanobacterium) possibly linked to giant clam poisoning in New Caledonia. *Toxicon* 56(5): 829–835.
- Mikalsen, B., Boison, G., Skulberg, O.M., Fastner, J., Davies, W., Gabrielsen, T.M., Rudi, K. & Jakobsen, K.S. 2003. Natural variation in the microcystin synthetase operon *mcyABC* and impact on microcystin production in microcystin strains. *Journal of Bacteriology* 185(9): 2774–2785.
- Moustafa, A., Loram, J.E., Hackett, J.D., Anderson, D.M., Plumley, F.G. & Bhattacharya, D. 2009. Origin of saxitoxin biosynthetic genes in cyanobacteria. *PloS One* 4(6): 1–10.
- 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. & Porzani, S.J. 2021. Toxic compounds produced by cyanobacteria belonging to several species of the order Nostocales: A review. *Journal of Applied Toxicology* 41(4): 510–548.
- Nowruzi, B. & Lorenzi, A.S. 2021a. Production of the neurotoxin homoanatoxin-a and detection of a biosynthetic gene cluster sequence (*anaC*) from an Iranian isolate of *Anabaena*. *South African Journal of Botany* 139: 300–305.
- Nowruzi, B. & Lorenzi, A.S. 2021b. Characterization of a potentially microcystin-producing *Fischerella* sp. isolated from Ajigol wetland of Iran. *South African Journal of Botany* 137: 423–433.
- Nowruzi, B. & Shalygin, S. 2021. Multiple phylogenies reveal a true taxonomic position of *Dulcicalothrix alborzica* sp. nov. (Nostocales, Cyanobacteria). *Fottea* 21(2), 1–X. DOI: 10.5507/fof.2021.008 (In Press).
- Nowruzi, B., Sarvari, G. & Blanco, S. 2020a. The cosmetic application of cyanobacterial secondary metabolites. *Algal Research* 49: 1–14.
- Nowruzi, B., Sarvari, G. & Blanco, S. 2020b. Applications of Cyanobacteria in Biomedicine. Pp. 441–454. *In: Ko-nur, O. (ed.). Handbook of Algal Science, Technology and Medicine.* Academic Press, London.
- 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.
- Nowruzi, B., Wahlsten, M. & Jokela, J. 2019a. A report on finding a new peptide aldehyde from cyanobacterium *Nostoc* sp. Bahar m by lc-ms and marfey's analysis. *Iranian Journal of Biotechnology* 17(2): 71–78.

- Nowruzi, B., Akhavan Sepahi, A. & Soltani Savoji, G.S. 2019b. Genetic analysis of nonribosomal peptide synthesis genes (NRPSs) in natural product biosynthesis of the cyanobacterial strains of Lavasan Lake. *Biological Journal of Microorganisms* 8(30): 27–54.
- Nowruzi, B., Haghghat, S., Fahimi, H. & Mohammadi, E. 2018a. *Nostoc* cyanobacteria species: a new and rich source of novel bioactive compounds with pharmaceutical potential. *Journal of Pharmaceutical Health Services Research* 9(1): 5–12.
- Nowruzi, B., Fahimi, H. & Ordodari, N. 2018b. Molecular phylogenetic and morphometric evaluation of *Calothrix* sp. N42 and *Scytonema* sp. N11. *Rostaniha* 18(2): 210–221.
- Nowruzi, B., Blanco, S. & Nejadstari, T. 2018c. Chemical and molecular evidences for the poisoning of a duck by anatoxin-a, nodularin and cryptophycin at the coast of lake Shoormast (Mazandaran province, Iran). *International Journal on Algae* 20(4): 359–376.
- Nowruzi, B., Fahimi, H., Ordodari, N. & Assareh, R. 2017a. Genetic analysis of polyketide synthase and peptide synthase genes of cyanobacteria as a mining tool for new pharmaceutical compounds. *Journal of Pharmaceutical & Health Sciences* 5(2): 139–150.
- Nowruzi, B., Khavari-Nejad, R.A., Nejadstari, T., Sivonen, K. & Fewer, D. 2017b. A proposal for the unification of two cyanobacterial strains of *Nostoc* as the same species. *Rostaniha* 17(2): 161–172.
- Nowruzi, B., Khavari-Nejad, R.A., Sivonen, K., Kazemi, B., Najafi, F. & Nejadstari, T. 2013. Identification and toxigenic potential of a cyanobacterial strain (*Stigomena* sp.). *Progress in Biological Sciences* 3(1): 79–85.
- Nowruzi, B., Khavari-Nejad, R.A., Sivonen, K., Kazemi, B., Najafi, F. & Nejadstari, T. 2012. Identification and toxigenic potential of a *Nostoc* sp. *Algae* 27(4): 303–313.
- Osorio-Santos, K., Pietrasiak, N., Bohunická, M., Miscoe, L.H., Ková ik, 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.
- Price, G.D., Badger, M.R., Woodger, F.J. & Long, B.M. 2008. Advances in understanding the cyanobacterial CO<sub>2</sub>-concentrating-mechanism (CCM): functional components, Ci transporters, diversity, genetic regulation and prospects for engineering into plants. *Journal of Experimental Botany* 59(7): 1441–1461.
- Rajabpour, N., Nowruzi, B. & Ghobeh, M. 2019. Investigation of the toxicity, antioxidant and antimicrobial activities of some cyanobacterial strains isolated from different habitats. *Acta Biologica Slovenica* 62(2): 3–14.
- Rantala-Ylinen, A., Känä, S., Wang, H., Rouhiainen, L., Wahlsten, M., Rizzi, E., Berg, K., Gugger, M. & Sivonen, K. 2011. Anatoxin-a synthetase gene cluster of the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain 37 and molecular methods to detect potential producers. *Applied and Environmental Microbiology* 77(20): 7271–7278.
- eháková, 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.
- Shalygin, S., Pietrasiak, N., Gomez, F., Mlewski, C., Gerard, E. & Johansen, J.R. 2018. *Rivularia halophila* sp. nov. (Nostocales, Cyanobacteria):



- the first species of *Rivularia* described with the modern polyphasic approach. *European Journal of Phycology* 53(4): 537–548.
- 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.
- Szöllösi, G.J., Boussau, B., Abby, S.S., Tannier, E. & Daubin, V. 2012. Phylogenetic modeling of lateral gene transfer reconstructs the pattern and relative timing of speciations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(43): 17513–17518.
- 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.
- Tillett, D., Parker, D.L. & Neilan, B.A. 2001. Detection of toxicity by a probe for the microcystin synthetase. A gene (*mcyA*) of the cyanobacterial genus *Microcystis*: comparison of toxicities with 16S rRNA and phycocyanin operon (phycocyanin intergenic spacer) phylogenies. *Applied and Environmental Microbiology* 67(6): 2810–2818.
- Vaz, M.G.M.V., Genuario, D.B., Andreote, A.P.D., Malone, C.F.S., Sant'Anna, C.L., Barbiero, L. & Fiore, M.F. 2015. *Pantanalinema* gen. nov. and *Alkalinema* gen. nov.: novel pseudanabaenacean genera (Cyanobacteria) isolated from saline-alkaline lakes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65(1): 298–308.
- Villanueva, C.D., Garvey, A.D., Hašler, P.E.T.R., Dvořák, P.E.T.R., Poulíková, A.L.O.I.S.I.E., Norwich, A.R. & Casamatta, D.A. 2019. Descriptions of *Brasilonema geniculatum* and *Calothrix dumus* (Nostocales, Cyanobacteria): two new taxa isolated from cemetery tombstones. *Phytotaxa* 387(1): 1–20.
- Werner, V.R., Laughinghouse IV, H.D., Fiore, M.F., Sant'Anna, C.L., Hoff, C., de Souza Santos, K.R., Neuhaus, E.B., Molica, R.J.R., Honda, R.Y. & Echenique, R.O. 2012. Morphological and molecular studies of *Sphaerospermopsis torques-reginae* (Cyanobacteria, Nostocales) from South American water blooms. *Phycologia* 51(2): 228–238.
- Wood, S.A., Selwood, A.I., Rueckert, A., Holland, P.T., Milne, J.R., Smith, K.F., Smits, B., Watts, L.F. & Cary, C.S. 2007. First report of homoanatoxin-a and associated dog neurotoxicosis in New Zealand. *Toxicon* 50(2): 292–301.
- Zapomlová, E., Čeháková, K., Jezberová, J. & Komárková, J. 2010. Polyphasic characterization of eight planktonic *Anabaena* strains (Cyanobacteria) with reference to the variability of 61 *Anabaena* populations observed in the field. *Hydrobiologia* 639(1): 99–113.
- Zhaxybayeva, O., Gogarten, J.P., Charlebois, R.L., Doolittle, W.F. & Papke, R.T. 2006. Phylogenetic analyses of cyanobacterial genomes: quantification of horizontal gene transfer events. *Genome Research* 16(9): 1099–1108.
- Zuker, M. 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research* 31(13): 3406–3415.