خالص سازی و بررسی فیلوژنی گونه *Amphora cf. coffeaeformis* جدا شده از آب‌های سواحل چابهار بر اساس توالی ژنی LSU-rDNA

گیلان عطاران فریمان[۱*]، سید علی موسوی[۲]، فاطمه ناصری[۳]

۱. گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار
۲. مرکز تحقیقات شیلات چابهار
۳. شبکه دامپزشکی چابهار

چکیده

جداسازی، کشت، خالص سازی و شناسایی دقیق فیتوپلانکتون های بومی هر منطقه می تواند مبنای تحقیقات بعدی بر روی گونه ها باشد. به منظور شناسایی و بررسی فیلوژنتیکی گونه ای از جنس *Amphora* به صورت تک سلولی از خلیج چابهار جدا و خالص گردید و در محیط کشت F2S که حاوی سیلیس بود کشت داده شد. گونه ها تحت شرایط مناسب در ژرمیناتور انکوبه شدند. rDNA از سویه خالص استخراج گردید و توالی نوکلئوتیدها در بخشی از ناحیه LSU-rDNA بررسی گردید. آنالیزهای فیلوژنتیکی MP و NJ نشان داد که Bacillariophycea یک گروه مونوفایلتیک را تشکیل می‌دهد و ایزوله ایرانی در کلاد ۱ قرار گرفته و بیشترین شباهت را به *A.coffeaeformis* دارد. بررسی خصوصیات مورفولوژی هم با نتایج مولکولی مطابقت داشت.

واژگان کلیدی: چابهار، LSU-rDNA، *Amphora cf. coffeaformis*، باسیولاریوفیسه.

*نویسنده مسوول، پست الکترونیک: gilan.attaran@gmail.com

۱. مقدمه

کشت فیتوپلاتکتونها می تواند نقش مؤثری در پیشبرد تحقیقات فایکولوژی و بیولوژی و میکروبیولوژی داشته باشد. علاوه بر اینها در بررسی پتانسیل تغذیه ای، مطالعات سموم آنها و یا بررسی گونه های دارای پتانسیل بیودیزل نیاز به خالص سازی و کشت فیتوپلانکتونها بیشتر احساس می شود. پایه و اساس هر مطالعه ای در مورد فیتو پلانکتونها بر شناسایی دقیق گونه استوار می باشد. دیاتومه ها از نظر اکولوژی و اقتصادی مهمترین گروه هستند (Moniz and Kaczmarska, 2009). شناسایی گونه های آنها تنها با تکیه بر مورفولوژی بسیار دشوار می باشد، ولی امروزه آنالیز مولکولی دیدگاه تازه ای را در بررسی‌های طبقه بندی و تکاملی پیش روی ما قرار داده است (Alverson, 2008). *Amphora* متعلق به رده Bacillariophyceae یکی از جنس های بسیار متنوع در میان دیاتومه ها می باشد که دارای ۹زیر جنس است. در بعضی از منابع جنس*Amphora* مترادف جنس *Halamphora* در نظر گرفته شده است (Stepanek, 2011). اعضای این گروه شباهت نزدیکی به diatoms naviculoids دارند (lundholm *et al*., 2003; Orsini *et al*., 2004) که اغلب شناسایی آنها را دچار اشکال می کند. اگر چه دیاتومه‌ها جزء گروهی از فیتوپلانکتونها هستند که برای شناسایی گونه دربعضی موارد فقط با مطالعه خصوصیات مورفولوژی با استفاده از میکروسکوپ نوری و الکترونی می توان گونه را شنا سایی کرد (Lundholm *et al*., 2006). جنس های ناهمگون، گونه های پلی مورف وگونه های بسیار نزدیک از نظر مورفولوژی شناسایی آنها در حد گونه با متصویر مواجه خواهد شد. گونه های دیاتومه ای که درگروه نویکولئید قرار می گیرند و شباهت مورفولوژیکی بسیار نزدیک دارند می‌توانند از نظر ژنتیکی و تکاملی بسیار دور از هم باشند (Katharine *et al*., 2008) و استفاده از تکنیکهای مولکولی در این موارد می تواند در امر شناسایی گونه مؤثر واقع شود.

Amphora coffeaformis (Agardh) یکی از گونه‌های پلی مورف می باشد که در انواع زیستگاه-های آب شور، شیرین و لب شور یافت می شود و ازگونه های غالب دیاتومه های آب‌های لب شور و سواحل با پوشش جنگل‌های حرا می باشد (Archibald and Schoeman, 1984). مطالعاتی که در مورد بررسی ریخت شناسی گونه صورت گرفته تصویرهای متفاوتی را به این گونه نسبت داده اند (Lewin and Lewin, 1960; Anderson, 1975). این گونه از آب های شیرین و لب شور جنوب آفریقا توسط Cholonky در سال ۱۹۶۳ گزارش شده است ولی در اغلب مطالعاتی که در این منطقه شده بود این گونه را به نام گونه *Amphora venta var. capitates* گزارش داده بودند. در بررسی های بعدی مشخص گردید که گونه شناسایی شده *A. coffeaformis* است (Schoeman and Archibald, 1978). مطالعه جامع و کامل خصوصیات مورفولوژی گونه که بااستفاده از میکروسکوپ الکترونی توسط Archibald و Schoeman در سال ۱۹۸۴ صورت گرفت. مورفولوژی دقیق گونه مشخص گردید. تا دهه ۱۹۸۰ برای شناسایی گونه ها تنها به مورفولوژی دیاتومه ها تکیه می شد ولی بعد از آن استفاده ازتکنیک های مولکولی و بررسی توال ژنیrDNA 18S و 28S rDNA (LSU rDNA) (Medlin *et al*., 1995; Kooistra, 1996 and Medlin, 1996) کمک زیادی به شناسایی و فیلوژنی دیاتومه‌ها کرد. این مطالعات و مطالعات بعدی نشان داد که تقسیم بندی سنتی دیاتومه ها و قرار دادن گونه ها در دو گروه دیاتومه های مرکزی و دیاتومه‌هایی با محور تقارنگاهی نمی تواند صحیح باشد زیرا دارای گروه‌های بسیار پلی فایلی هستند (Bank *et al*., 2001). ناحیه LSU rDN به دلیل اینکه نواحی بسیار متغیرتری نسبت به ناحیه SSU rDNA دارد روابط فیلوژنتیک را بهتری نشان می دهد (Soltis and Soltis, 1998; Lundholm *et al*., 2002).

مطالعات اندکی از توالی ژنی دیاتومه ها وجود دارد که نشان داده اند در این ناحیه بسیار متغییر ژنی نسبت به ناحیه SSU rDNA وجود دارد از جمله می توان به مطالعات Miller و Scholin (1994)، Ben Ali و همکاران (1999) و Lundholm و همکاران (2002) اشاره نمود. جنس *Amphora* معمولاً در اغلب نمونه های پلانکتونی سواحل سیستان و بلوچستان دارای فراوانی بالایی است و به عنوان جنس آمفورا گزارش شده است (حقیقی و همکاران ۱۳۷۵، خدامی ۱۳۸۱، ۱۳۸۴، ۱۳۸۶). در این تحقیق گونه ای از این جنس برای اولین بار به صورت تک سلولی جدا گردید و با هدف شناسایی گونه ای خالص سازی گردید. توالی ژنی در نواحی قسمتی از LSU rDNA مورد بررسی قرار گرفت و توالی آن با گونه های مشابه مقایسه شد و فیلوژنی آن مشخص گردید.

۲. مواد وروش‌ها

نمونه برداری آب از سطح تا عمق ۳۰ سانتی متری از خلیج چابهار توسط بطری روتنر و همینطور دبه های پلاستیکی در پاییز ۱۳۸۹ طی چهار گشت به صورت هفتگی انجام شد. نمونه ها بلافاصله به آزمایشگاه انتقال داده شدند. در آزمایشگاه نمونه آب بلافاصله از تور پلانکتون با چشمه ۵۵ میکرون عبور داده شد تا ازخورده شدن فیتوپلانکتون ها توسط زئوپلانکتون‌ها جلوگیری شود. سپس آب نمونه ها با استفاده از فیلتراسیون معکوس به حجم ۱۰۰ سی سی رسانده شدند (Sournia 1996). به منظور جداسازی سلول مورد نظر ابتدا نمونه ها زیرمیکروسوپ بررسی اولیه شدند و در صورت مشاهده گونه هایی که مورفولوژی آن‌ها مشابه *Amphora* بود مراحل جدا سازی انجام شد. طی یک ماه نمونه برداری در هفته دوم و سوم نمونه مورد نظر درآبهای خلیج چابهار مشاهده گردید. جداسازی تک سلولی با استفاده از میکرو پیپت و یا پاستور پیپت استریل شده بر اساس روش ارائه شده توسط Attaran-Fariman در سال ۲۰۰۷ در زیر استریو میکروسکوپ نیکون مدل TF100 انجام شد. سپس تک سلولی‌های جدا سازی شده در پتری دیش حاوی ۳۰ میلی لیتر محیط کشت F2S (Guillard, 1975) کشت داده شدند و در ژرمیناتور مدل ZM200 انکوبه گردیدند. برنامه ژرمیناتور بر اساس ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، نور۲۰۰۰ لوکس، درجه حرارت ۱°c ± ۲۵° c و رطوبت ۲۵٪ تنظیم گردید. بررسی ریخت شناسی گونه خالص شده و عکس برداری با استفاده از میکروسکوپ نوری نیکون مدل ۵۰I مجهز به دوربین انجام شد.

استخراج DNA ریبوزومی استرین خالص شده براساس روش CTAB (Dolye and Doyle, 1987) انجام گردید. به منظور بررسی کیفیت و کمیت DNA استخراج شده الکتروفورز گردید. از بافر TBE و ژل آگار ۱/۵ درصد در الکتروفوز نمونه استفاده گردید و برای رنگ آمیزی ژل و از اتدیوم بروماید[1] استفاده گردید. بررسی کیفیت باندهای DNA روی ژل الکتروفورز مدل FMINgel با استفاده از دستگاه ژل داکیومنت مدل BTS-20-MS Uritec انجام گرفت (Attaran-Fariman, 2007). PCR دومین D1 ، D2 منطقه LSU rDNA ژن با استفاده از پرایمرهایD1R-F و D2C-R با توالی‌های ارائه شده توسط Scholin و همکاران (1994) و روش ارائه شده توسط Attaran-Fariman و Bolch (2007) انجام شد. محصول PCR با استفاده از کیت Q1A (Qiagen, Germany) خالص گردیدند. بعد از خالص سازی محصول PCR به منظور تعیین توالی نوکلئوتیدها از کیت Terminator Sequencing Kit (Big Dye) استفاده شد و توالی اسیدهای نوکلئویک آن‌ها در نواحی مورد نظر توسط sequencer تعیین گردید. توالی نوکلئوتیدی ایزوله ایرانی با گونه های موجود در بانک اطلاعات ژنی مقایسه گردیدند. به منظور بررسی فیلوژنی گونه از آنالیزهای Neighbor

[1] .Ethidium bromide

(NJ) Joining مدل P-distance الگـوی بـین نسـل‌هـا بـه صـورت و آنـالیز (MP) Maximum Parsimony مدل Maxi-Mini Branch and Bound استفاده گردید. نـرم افزارهـای phylip و Clastal W بـرای انجـام آنالیزهـای مولکـولی و ترسـیم درخـت فیلوژنی استفاده گردید.

۳. نتایج

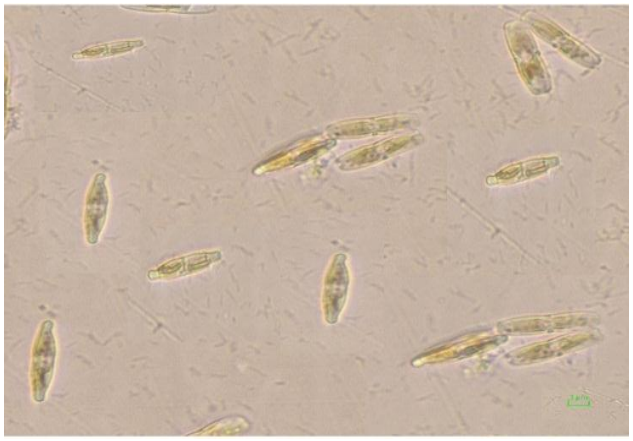
بررسی خصوصیات مورفولوژی استرین خالص شده گونه را در جنس *Amphora* قرار داد که متعلق به شاخه Ochrophyta (Cavalier-Smith) و رده Bacillariophyceae می‌باشد و در گروه پی نات[1] دیاتومه‌ها طبقه بندی می‌شود.

ایزوله خالص شده به نام CHPA1 نامگذاری گردید و با همین نام در بانک ژنی ثبت خواهد شد. سلول‌ها به رنگ طلایی قهوه‌ای و رنگ استرین در ارلن ۱۰۰ سی‌سی قهوه‌ای کم رنگ است. طول سلول‌ها بین ۱۸-۲۵ میکرومتر و عرض آن‌ها بین ۲,۵-۳ میکرومتر می باشد. این گونه ازسطح شکمی صاف تا کمی بر آمده و از سطح پشتی بر آمده است و در دو قسمت انتهایی axial area باریک‌تر و در دو انتهای آن گرد می‌شود (تصویر ۱). گونه از نظر ریخت‌شناسی بیشترین شباهت را به (Agardh) *Kützing Amphora coffeaformis* دارد. در جدول ۱ تمام گونه هایی (۱۵گونه) که توالی ژنی آنها در منطقه موردنظر شبیه ایزوله ایرانی بود با شماره ثبت آن‌ها در بانک ژنی آورده شده است. نتایج آنالیزهای مولکولی و ترسیم درخت فیلوژنی به دو روش NJ و Mp سه کلاد مشخص (Clad 1, Clad2, Clad3) نشان داد که گونه ایرانی در کلاد Amphora (کلاد ۱) قرار می‌گیرد. این کلاد با ۱۰۰ درصد بوت استرپ حمایت می شود و همانطور که تصویرهای ۲ و۳ نشان می دهد گونه ایرانی با ۸۳ و ۷۲ درصد حمایت Bootstrap گونه خواهری *A. coffeaformis* می باشد. کلادهای *Cymbella* (کلاد ۳) و *Phaeodactylum* (کلاد ۲) از ۱۰۰ درصد حمایت بوت استرپ برخوردار هستند و کلاد *Craticula* با ۸۸ درصد حمایت می شود. این کلاد رابطه خویشاوندی نزدیکی با کلاد *Cymbella* دارد. اغلب گونه‌هایی که در جنس‌های *Cymbella* و *Phaeodactylum* و *Amphora* قرار دارند علاوه بر شباهت بسیار نزدیک توالی ژنی از نظر ریخت‌شناسی هم شباهت زیادی دارند.

۴. بحث و نتیجه گیری

در آنالیز فیلوژنی ۱۵ گونه از باسیلاروفیسه که بیشترین شباهت را در توالی نوکلئوتیدها داشتند در نظر گرفته شده است و می توان گفت که ۱۵ گونه یک گروه منوفایلتیک از پی نات دیاتومه را تشکیل می دهند. هر دو آنالیز فیلوژنیMP و NJ در تصویرهای ۲ و ۳ روابط خویشاوندی مشابهی را بین دیاتومه‌ها نشان دادند. همچنین فیلوژنی حاضر با آنالیزهای فیلوژنی رده باسیلاریوفیت‌ها که توسط محققین مختلف در نواحی قسمتی از LSU rDNA و SSU rDNAانجام شده مطابقت دارد (Kooistra and Medlin, 1996; Sorhannus *et al.*, 1995; Godhe *et al.*, 2006; Kaczmarska *et al.*, 2005).

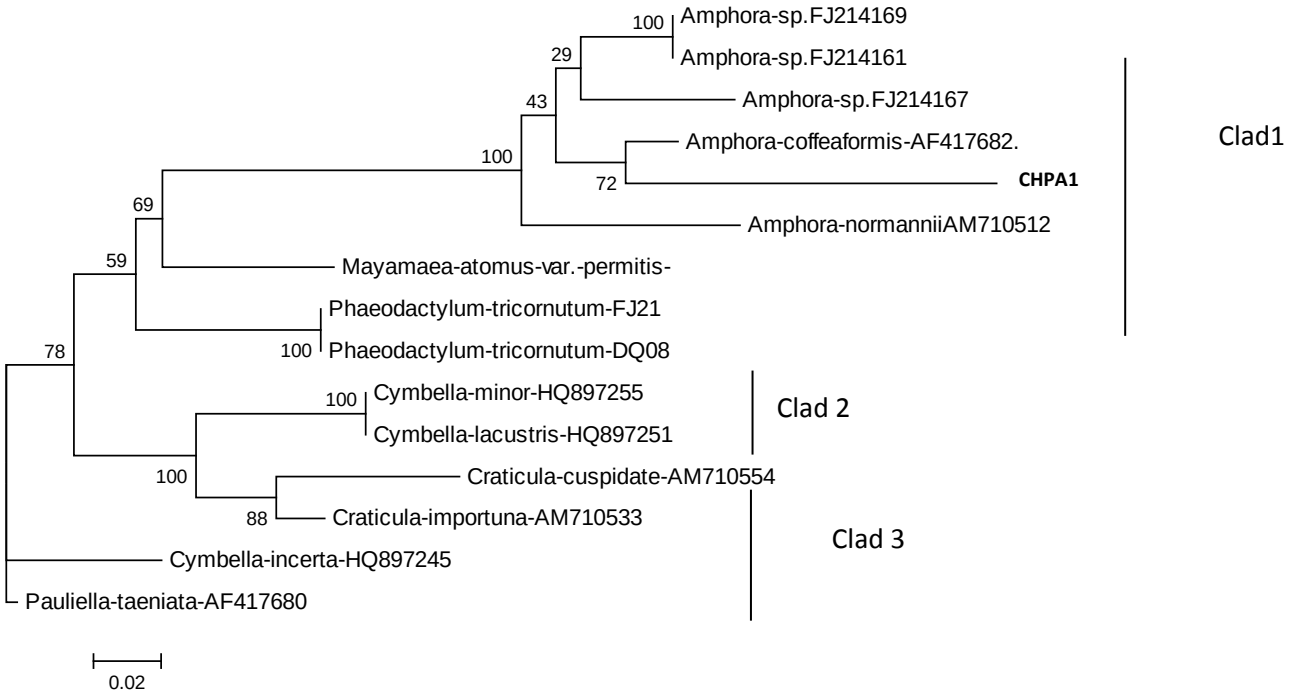
[1]. pinnate



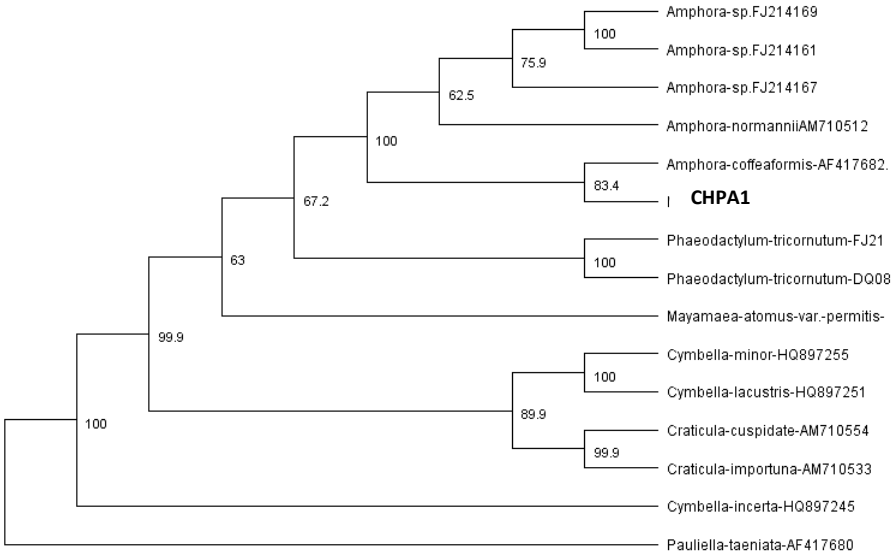
شکل ۱. گونه *A. cf. coffeaeformis* جدا و خالص شده از سواحل خلیج چابهار

جدول ۱. اسامی گونه ها و شماره ثبت آن‌ها در بانک ژنی که در آنالیز مولکولی این تحقیق استفاده شده است

نام گونه	GenBank NO.
Amphora cf. coffeaeformis	مطالعه حاضر
Amphora coffeaeformis	AF417682
Amphora sp.	FJ214167
Amphora sp.	FJ214169
Amphora sp.	FJ214161
Amphora normannii	AM710512
Pauliell taeniata	AF417680
Mayamaea atomus var. permitis	AM710524
Cymbella incerta	HQ897245
Phaeodactylum tricornutum	FJ214166
Craticula cuspidate	AM710554
Craticula importuna	AM710533
Phaeodactylum tricornutum	DQ085807
Cymbella minor	HQ897255
Cymbella lacustris	HQ897251



شکل ۲. درخت فیلوژنی *Amphoracf. cofeaformis* ایزوله CHPA1 جدا شده از سواحل جنوب شرق ایران براساس توالی ژنی در قسمتی از ناحیه LSU-rDNA با استفاده از آنا لیز NJ مدل P distans. الگوی بین نسل‌ها هموژن در نظر گرفته شد. اعداد bootstrap بر اساس ۱۰۰۰ replication است.*Pauliella taeniata* به عنوان outgroup انتخاب گردید.



شکل ۳. درخت فیلوژنی گونه *Amphora* cf. *coffeaeformis* جدا شده از سواحل جنوب شرق ایران بر اساس توالی ژنی در قسمتی از ناحیه LSU-rDNA بااستفاده از آنالیز (Mp) مدل Maxi-Mini Branch and Bound. اعدادbootstrap براساس ۱۰۰۰ replication است. *Pauliella taeniata* به عنوان outgroup انتخاب گردید.

در کلیه این مطالعات pinnate diatoms در یک گروه منوفایلتیک قرار می‌گیرد. اگرچه درpinnate دیاتومه رده Fragilariophyceae پارا فایلی وجود دارد (Round *et al*.1990) ولی رده باسیولارفیسه در کلیه مطالعات انجام شده منوفایلی را حفظ کرده است (Sims *et al*. 2006, Sorhannus *et al*. 1995,

(Theriot *et al*. 2009). در blast search ایزوله ایرانی (CHPA1) بیشترین درصد شباهت (۹۸٪) را به گونه *A.cofeaeformis* دارد و با گونه‌های دیگر از جمله *A.normani*i Rabenhorst و چند گونه که به نام Amphora sp در بانک ژنی ثبت شده اند دریک کلاد (کلاد۱) قرار گرفتند. کلاد آمفورا یک کلاد مونوفایلتیک است و گونه ها در این کلاد از نظرریخت شناسی هم بسیار شبیه هستند. اندازه طول ۲۵ -۳۵ میکرومتر برای گونه *A. cofeaeformis* گزارش شده است (Archbald and Scoeman, 1984). اندازه طول ایزوله ایرانی بین ۱۸-۲۵ میکرومتر می باشد. Kevkov در سال۲۰۰۹ اندازه سلول را بین ۱۵-۴۰ میکرومتر برای همین گونه گزارش داد. گونه ایرانی از نطر اندازه و ریخت شناسی بسیار شبیه گونه *A. normanii* با اندازه بین ۲۰-۳۰ میکرومتر است (Stepanek,2011) ولی این گونه از گونه های آب شیرین است. گونه(Mayameae atumus (Hustedt که از گونه‌های آب شیرین است به عنوان outgroup برای کلاد ۱ محسوب می شود و از نظر ریخت شناسی هم اگر چه در گروه دیاتومه هایی با تقارن شعاعی قرار می گیرد ولی خصوصیات ریخت شناسی آن شباهت کمتری به بقیه گونه های این کلاد دارد. در بررسی فیلوژنی باسیولارفیسه Lundholm در سال ۲۰۰۲ بر اساس آنالیز maximum likelihood (ML) گونه *Entomoneissp* با *A. Coffeaeformis* دریک کلاد قرار گرفتند اگرچه طول شاخه در درخت فیلو ژنی از بقیه بیشتر بوده و واگرایی بیشتری نسبت به بقیه باسیولارفیسه نشان می دهد. کلاد ۲ تصویر ۲ و ۳ دو ایزوله مختلف از *Phaoductylum tricornutum* در یک کلاد قرار گرفته‌اند. این گونه تنها گونه در جنس فائوداکتیلوم می باشد De Martino *et al*.,2007) و هر دوایزوله با ۱۰۰ درصد بوت استرپ حمایت می شوند. در مطالعات (2002) Lundholm در ناحیه مشابه با این بررسی(LSU, D1-D2) و آنالیزمولکولی MP باسیولارفیسه ها گونه *A. Coffeaeformis* و *Phaoductylum tricornutum* با ۹۴ درصد حمایت در یک گروه منوفایلتیک قرار می گیرند. کلاد ۳ یک کلاد منوفایلتیک شامل دو جنس *Cymbella* و *Carticula* است که با ۱۰۰ در صد بوت استرپ حمایت می شوند و هردو از گونه های آب شیرین هستند و از نظرریخت شناسی بسیار شبیه گونه های کلاد ۱و ۲ می باشند (Tariq Ali *et al*.,2006). نتیجه کلی این تحقیق و تحقیقات مشابه اینکه آنالیزهای مولکولی نقش مهمی درشناسایی و پیشبرد طبقه بندی دیاتومه ها دارند. این تکنیک‌ها در کنار بررسی‌های ریخت شناسی می توانند معماهایی که در رابطه با طبقه بندی گونه های دیاتومه وجود دارد را حل کند و قبل از اینکه هرگونه تفکیک جنس و یا زیر گونه در این گروه صورت بگیرد بایستی نواحی بسیار متغییر ژنی مورد بررسی فیلوژنتیکی قرار بگیرد.

منابع

حقیقی، ح.، عطاران فریمان، گ.، خدامی، ش.، و حسینی، س. ۱۳۷۵. هیدرولوژی و هیدروبیولوژی خلیج چابهار، گزارش نهایی مؤسسه تحقیقات شیلات، ۱۳۰ ص.

خدامی، ش. ۱۳۸۱. بررسی جامع اکولوژیک استخرهای پرورش میگو در منطقه گواتر، موسسه تحقیقات شیلات ایران، ۱۳۹ ص.

خدامی، ش. ۱۳۸۶. بررسی کیفیت پساب خروجی از مزارع پرورش میگو در گواتر ، مؤسسه تحقیقات شیلات ایران، ۱۴۵ ص.

خدامی، ش. ۱۳۸۴. بررسی لیمنولوژیک پایین دست رودخانه باهوکلات، مؤسسه تحقیقات شیلات ایران، ۱۲۹ ص.

Alverson, A.J. 2008. Molecular systematic and the diatom species. Protist.159(3):339-353.

Anderson, O.R. 1975. The ultrastructure and cytochemistry of resting cell formation in *Amphora coffeaeformis* (Bacillariophyceae). J. Phycol. 11:272–281.

Archibald, R.E.M. and Schoeman, F.R. 1984. *Amphora coffeaformis* (Agardh) Kutzing: a revision of the species under light and electron microscopy. S. Afr. Tydskr. Plantk. 3(2)*:* 84-102.

Attaran-Fariman, G. and Bolch, C.J.S. 2007. *Scrippsiella irregularis* sp. nov. (Dinophyceae), a new dinoflagellate from the southeast coast of Iran. Phycol. 46(5):572-582.

Attaran-Fariman, G. 2007. Dinoflagellate cysts and *Chattonella* resting stages from recent sediments of the southeast coast of Iran. PhD thesis, University of Tasmania, Australia. 318 p.

Ben Ali, A., Wuyts, J., De Wachter, R., Meyer, A. and Van de Peer, Y. 1999. Construction of a variability map for eukaryotic large subunit RNA. Nucleic Acids Res. 27:2825-2831.

Cholnoky, B.J. 1963. Beitrage zur Kenntnis der Okologie derDiatomeen des Swakop-Flusses in Sodwest-Afrika.Revto. Biol. 3:233-260.

De Martino, A., Meichenin, A., Shi, J., Pan, K.H. and Bowler, C. 2007. Genetic and phenotypic characterization of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) accessions. J. Phycol. 43:992-1009.

Doyle, J. and Doyle, L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem. Bull. 19: 11-15.

Godhe, A., Mcquoid, M.R., Karunasagar, I., Karunasagar, I. and Rehnstam-Holm, A.S. 2006. Comparison of three common molecular tools for distinguishing among geographicallyseparated clones of the diatom *Skeletonema marinoi* Sarno et Zingone (Bacillariophyceae). J. Phycol. 42: 280-291.

Guillard, R.R.L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In Smith W.L, and Chaney M. H. (eds). Culture of Marine Invertebrate Animals. Plenum Press, New York, Pp 29–60

Kaczmarska, I., Beaton, M., Benoit, A.C. and Medlin, L.K. 2005. Molecular phylogeny of selectedmembers of the order Thalassiosirales (Bacillariophyta) and evolution of the fultoportula. J. Phycol. 42: 121-138.

Katherine, A., Hubbard, G.R. and Virginia Armbrust, E. 2008, Inter and intraspecific community structure within the diatom *genus Psedo-nitzchia* (Bacillariophyceae). Phycol. 44:637–649.

Kooistra, W.H.C.F. and Medlin, L.K. 1996. Evolution of the diatoms (Bacillariophyta). IV. Areconstruction of their age from small subunit rRNA coding regions and the fossil record. Mol. Phylogenet Evol. 6: 391-407.

Levkov, Z. 2009**.** *Amphora* sensu lato. In H. Lange-Bertalot (ed). Diatoms of Europe. Volume 5.Koeltz Scientific books, 916 p.

Lewin, J.C. and Lewin, R.A. 1960. Autotrophy and heterotrophy in marine littoral diatoms. Can. J. Microbiol. 6: 127—134.

Lundholm Daugbjerg, N.N. and Moestrup, Ø. 2002. Phylogeny of the Bacillariaceae with emphasison the genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) based on partial LSU rDNA. Eur. J.Phycol. 37:115-134.

Lundholm, N., Moestrup, Ø., Kotaki, Y., Hoef-Emden, K., Scholin Cand Miller, P. 2006. Inter- and intraspecific variation of the *Pseudo-nitzschia* delicatissima complex (Bacillariophyceae) illustrated by rRNA probes, morphological data and phylogenetic analyses. J. Phycol. 42:464-481.

Lundholm, N., Moestrup, Ø., Hasle, G.R. and Hoef-Emden, K. 2003. A study of the *Pseudo -nitzschia seudodelicatissima/ cuspidate complex (Bacillariophyceae):* what is *P. pseudod*elicatissima. J. Phycol. 39: 797–813.

Medlin, L.K., Kooistra, W.H.C.F., Gersonde, R. and Wellbrock, U. 1996. Evolution of the diatoms (Bacillariophyta). II. Nuclear-encoded small-subunit rRNA sequences comparisons confirmparaphyletic origin for centric diatoms. Mol. Biol. Evol. 13: 67-75.

Moniz, M.B.J. and Kaczmarska, I. 2009. Barcoding diatoms: Is there a good marker? Mol.Ecol. Resour. 9:65-74.

Olenina, I., Hajdu, S., Edler, L., Andersson, A., Wasmund, N., Busch, S., Göbel, J., Gromisz, S., Huseby, S., Huttunen, M., Jaanus, A., Kokkonen, P., Ledaine, I. and Niemkiewicz, E. 2006. Biovolumes and size-

Tariq-Ali, S., Zarina, A.M.H. and Shameel, M. 2006. Taxonomic studies on *Navicula* (Bacillariophyta) from certain areas of the Punjab. Pak. J. Bot. 38: 435-441.

Theriot, E.C., Cannone, J.J., Gutell, R.R, Alverson, A.J. 2009. The limits of nuclear-encoded SSUrDNA for resolving the diatom phylogeny. Eur. J. Phycol. 44:277-290.

classes of phytoplankton in the Baltic Sea. Environ. Proc. No. 106.

Orsini, L., Procaccini, G., Sarno, D. and Montresor, M. 2004. Multiple rDNA ITS-types within the diatom *Pseudo-nitzschia*delicatissima (Bacillariophyceae) and their relative abundances across a spring bloom in the Gulf of Naples. Mar. Ecol. Prog. Ser. 271:87–98.

Pniewski, F.F., Friedl, T. and Latała, A. 2010. Identification of diatom isolates from the Gulf of Gdańsk: testing of species identifications using morphology, 18S rDNA sequencing and DNA barcodes of strains from the Culture Collection of Baltic Algae (CCBA). Inte. J. Oceano. Hydrobiol stud. 3: 3-20.

Round, F.E., Crawford, R., Mand Mann, D.G. 1990. The Diatoms.Biology and Morphology of the Genera. Cambridge: Cambridge University Press, 758 p

Scholin, C.A., Herzog, M., Sogin, M. and Anderson, D.M. 1994. Identifcation of group- and strain-speciec genetic markers for globally distributed *Alexandrium* (Dinophyceae). II. Sequenceanalysis of a fragment of the LSU rDNA. J. Phycol. 30:999-1011.

Schoman, F.R. and Archibald, R.E.M. 1976. The diatom flora of southern Africa. CSIR Special Report 62 p.

Sims, P.A., Mann, D.G. and Medlin, L.K. 2006. Evolution of the diatoms: insights from fossil, biological and molecular data. Phycol. 45:361-402.

Soltis, D.E. and Soltis, P.S. 1998. Choosing an approach and an appropriate gene for phylogenetic analysis. In Soltis, DE, Soltis PM, Doyle JJ (eds) .Molecular Systematic of Plants. II. DNA sequencing. Kluwer Academic Publishers, Boston, pp 1–42.

Sorhannus, U., Gasse, F., Perasso, R. and Baroin Tourancheau, A. 1995. A preliminary phylogeny ofdiatoms based on 28S ribosomal RNA sequence data. Phycol. 34:65-73.

Sournia, A. 1978. Phytoplankton manual, monographs on oceanographic methodology. UNESCO, 377 p.

Stepanek, J. 2011. *Halamphora normanii* .In Diatoms of the United States. Retrieved October, 2011.http://westerndiatoms.colorado.edu/taxa/species/halamphora_normanii.