دو فصلنامه
بیوتکنولوژی و میکروبیولوژی کاربردی
سال سوم، شماره ۱ و ۲، بهار و تابستان ۱۳۹۳

بررسی عدم تطابق تاکسونومی سنتی با روابط فیلوژنیتیک متکی بر توالی ژن ۱۶S rRNA در دو سویه *نوستوک*

بهاره نوروزی* و طاهر نژادستاری

دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران

چکیده

مطالعه در زمینه سویه‌های سیانوباکتری‌ها برای بسیاری از جوامع علمی جهان از اهمیت بسیاری برخوردار است، به خصوص راسته نوستوکالز به دلیل تثبیت نیتروژن و مشارکت در حاصلخیزی خاک‌های کشاورزی در سراسر جهان، درحالیکه سویه‌های دیگر سیانوباکتریایی به دلیل تولید توکسین مشکلات زیادی را در اکوسیستم‌های آبزی ایجاد می‌کنند. به هر حال، به رغم، اهمیت اکولوژیکی و محیطی، شناسایی و تاکسونومی بسیاری از سویه‌های سیانوباکتریایی مشکل آفرین و شک برانگیز است. چرا که بسیاری از مطالعات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی تحت تاثیر شرایط مختلف محیطی قرار می گیرد. هدف مطالعه حاضر این است که با استفاده از یک سری مطالعات چند منظوره، تفاوت‌های موجود در ویژگی‌های مورفولوژیک و ژنوتیپیک دو سویه سیانوباکتریایی جدا شده از شالیزارهای ایران را که متعلق به خانواده Nostocaceae (subsection IV. I) هستند را بررسی کند. بر اساس کلیدهای شناسایی معتبر، دو سویه به عنوان *Nostoc ellipsosporum* و *Nostoc muscorum* شناسایی شدند. موضوع زمانی بحث برانگیز شد که مطالعات انجام شده با ژنهای 16S rRNA و ITS با تاکسونومی سنتی تطابق نداشتند. نتایج توالی یابی قطعه 16S rRNA کلون شده نشان داد که رده بندی مورفولوژیکی دو سویه *نوستوک* نامعتبر است. علاوه بر آن، مطالعات فیلوژنتیکی دو سویه *نوستوک* آشکار کرد که روابط ژنتیکی با رده بندی مورفولوژیکی همخوانی ندارد. بر این اساس، نتایج نشان داد که دو سویه *نوستوک* مورد بررسی، احتمالا متعلق به یک گونه هستند.

واژه‌های کلیدی: سیانوباکتری‌ها، مورفولوژی، *Nostoc*، 16S rRNA, ITS,

مقدمه

رده‌بندی تاکسونومیک سیانوباکتری‌ها کاملا پیچیده است. در حال حاضر دو سیستم رده بندی مهم قابل دسترس وجود دارد: سیستم رده‌بندی گیاه‌شناسی و سیستم رده‌بندی باکتریولوژیکی. این سیستم‌ها از ویژگی‌های فوتیپی و ژنوتیپی سیانوباکتری‌ها، برای رده بندی تاکسونومی سیانوباکتری‌ها استفاده می کنند (۱). سیانوباکتری‌ها به‌طور سنتی بر اساس مورفولوژی شان بر طبق ICBN، رده بندی می‌شدند. تاکسونومی تنها بر اساس خصوصیت‌های مورفولوژیکی، به تنهایی در تاکسونومی فیلوژنتیک معتبر نیست، به علت این که مورفولوژی سیانوباکتری‌ها در مقایسه با سایر

* مسئول مکاتبات: bahare77biol@yahoo.com

پروکاریوت‌ها بسیار پیچیده‌تر است و بسیاری از معیارهای مورفولوژیکی در پاسخ به شرایط محیطی مختلف بسیار تغییر پذیرند (۲۰). در صورتیکه توالی‌های DNA امکان استنباط فیلوژنی موجودات را می‌دهد، در واقع توالی‌های DNA در مقایسه با بسیاری از ویژگی‌های مورفولوژیکی کمتر تاثیر پذیر هستند. تاکسونومی ژنوتیپی در کل بر اساس ژن ها و فرآورده‌های طبیعی تولید شده است (۱۸). ژن ۱٦S rRNA در باکتری ها و سیانوباکتری‌ها حفاظت شده است (۱٤). بسیاری از محققان رده بندی فیلوژنتیکی باکتریایی مدرن را به طور عمده بر اساس توالی ژن 16S rRNA انجام می دهند (۲۵، ۲٦). مناطق 16S rRNA در بسیاری از آنالیزهای فیلوژنتیکی سیانوباکتریایی به طور وسیع استفاده می‌شوند، از آنجا که این مناطق نه تنها نقش اساسی در سنتز پروتئین و کل فعالیت‌های سلول ندارند، بلکه در طول زمان، تغییرهای بسیار کمی یافتند (۵). امروزه، بیشتر تاکسونومیست‌های باکتریایی آنالیز توالی ۱٦S rRNA را وسیله ای استاندارد، قابل قبول و پایدار برای رده بندی فیلوژنتیک پروکاریوت‌ها معرفی کردند (۱۷، 7, 8). برای آنالیز قابل اطمینان ژن ۱٦S rRNA، توالی بیشتر از ۱۳۰۰ نوکلئوتید لازم است و این که تنها حداکثر، ۰/۵ درصد وضعیت‌های مبهم داشته باشد. البته توالی ژن ۱٦S rRNA روشی مناسب برای شناسایی یک سویه در سطح گونه نیست، حتی اگر توالی‌های گونه‌های مربوطه بیشتر از ۹۷ درصد شباهت را در توالی‌ها با هم داشته باشند. همین طور شباهت ژن ۱٦S rRNA بین دو موجود، دلیلی برای شباهت در کل ژنوم نیست (۲۱، ۲۲، ۲۱، ۲۳، ۲۰). ITS فضای درونی رونویسی شده بین ۱٦S rRNA و ۲۳SrRNA است که برای شناسایی تاکسون‌ها از سطح خانواده تا سطح گونه کاربرد دارد. اگرچه منطقه ITS خودش هیچ ژنی را رمزگذاری نمی‌کند، اما ممکن است شامل ژن‌های RNA های بسیار مهم و کاربردی مانند tRNA IIe و tRNA Ala و یا tRNA Glu باشد.

در این مطالعه هدف آن است که با استفاده از تکثیر ژن‌های ۱٦rRNA، ITS و انجام کلونینگ برای بدست آوردن کل قطعه ۱٦rRNA به بررسی تطابق تاکسونومی سنتی و مولکولی در دو سویه *نوستوک* بپردازیم.

مواد و روش‌ها

۱: شرایط کشت، ویژگی‌های مورفولوژیکی

در سال ۲۰۱۰ نمونه‌های خاک از ۵ شالیزار استان گلستان، ایران جمع‌آوری گردید. ۵ گرم از هر نمونه خاک وزن شد و در شرایط استریل به پتری دیش‌های استریل با مقدار مناسبی از محیط کشت مایع ($BG11_0$) (۲۱) بدون $NaNO_3$ تلقیح گردید. pH بعد از استریل کردن در حد ۱/۷ تنظیم گردید. پتری‌دیش‌ها در اتاقک کشت در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد و نور تقریبا ۱۵۰۰ تا ۲۰۰۰ لوکس برای دو هفته تلقیح شدند (۹، ۱۱). هورموگونیوم‌های کلنی‌های رشد کرده سپس در سطح اگار برای خالص‌سازی رشد کردند. اندازه‌گیری‌های مورفولوژیکی در طول سی روز با استفاده از میکروسکپ Leica DM750 P (Leica, Wetzlar, Germany) بررسی گردیدند. کشت‌ها به طور مرتب برای تعیین میزان خلوص با استفاده از هم میکروسکپ و هم با کشت روی محیط مغذی بررسی گردند.

پارامترهای زیر برای شرح مورفولوژی سیانوباکتری‌های هتروسیت دار انتخاب شد. مورفولوژی سلول‌های رویشی (شامل سلول انتهایی)، هتروسیست‌ها، آکاینت‌ها، حضور یا غیاب هتروسیست‌های انتهایی و شکل فیلامنت‌ها و تجمع آنها در کلونی‌ها (۲۰). در نهایت سویه‌ها بر طبق (۳) شناسایی شدند.

۲: استخراج DNA ژنومیک

استخراج DNA با استفاده از کیت E.Z.N.A. SP Plant DNA kit (Omega Bio-tek, Inc., Norcross, GA, USA) انجام گردید. DNA با استفاده از اسپکتروفوتومتر NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA) کیفیت سنجی شد.

۳: تکثیر PCR برای مقایسه ژن 16S rRNA و 16S±23S (ITS)

تکثیر ۱۶ پرایمر الیگونوکلئوتیدی شامل یک پرایمر فروارد و یک پرایمر ریورس برای تکثیر کامل ژن 16S rRNA انجام گردید (۱۹، ٤، ۲۰). فضای داخلی (ITS) با پرایمرهای ITS16CF و ITS23CR تکثیر شد (۱۰،۱۵). اندازه محصولات در مقایسه با DNA مارکر (λ/HinfIII + φx/HaeIII; Finnzymes) سنجیده شد. محصولات با استفاده از کیت Geneclean Turbo (Qbiogene/MP Biomedicals, Solon, OH, USA) خالص شدند.

٤: کلونینگ

از انجاییکه امکان پذیر نیست که کل محصول PCR به خصوص نواحی انتهای توالی ITS، توالی یابی شود، کلونینگ کلونینگ با استفاده از یک کیت کلونینگ TOPO Ta (Invitrogen, Carlsbad, USA) انجام گردید.

۵: توالی‌یابی و آنالیز

توالی‌یابی کامل ژن 16S rRNA دو سویه به کمک کیت توالی‌یابی BigDye Terminator v3.1 cycle (Applied Biosystems, Life Technologies, Foster City, CA, USA) انجام گردید. بررسی‌های Blast (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) ژن کامل 16S rRNA دو سویه به منظور شناسایی شباهت توالی با توالی‌های مشابه در بانک اطلاعات ژنی NCBI انجام گردید. درخت فیلوژنیتک با استفاده از روش neighbour-joining با برنامه MEGA و رژن 4.1 (۱۹) انجام گردید.

نتایج

۱: خصوصیات مورفولوژیکی دو سویه *نوستوک*

بر اساس کلید شناسایی (۳) دو سویه به عنوان *Nostoc ellipsosporum* و *Nostoc muscorum* شناسایی شدند. سویه *Nostoc ellipsosporum* دارای این خصوصیات بود: سلول ها شبیه به هم استوانه‌ای، سبز– آبی روشن یا زیتونی رنگند، ٤ –۳/۵ میکرون عرض و ۱۱–۷ میکرون طول دارند. هتروسیست ها گاهی وقت‌ها کروی یا مستطیلی، ٦/۵–۵ میکرون عرض و ۱۲/۵–٦ میکرون طول دارند. اسپورها، بیضوی یا مستطیلی، ۵/۵–۵ میکرون عرض و ۱۲–۱۰ میکرون طول دارند. توده ژلاتینی، مایل به قهوه ای یا تیره رنگ است. و سویه *Nostoc muscorum* دارای این خصوصیات گزارش گردید. سلول‌ها کروی یا به

طور جزیی بلندتر از عرض، زیتونی رنگ، ۵–٤ میکرون عرض و۷ تا ۵/۵ میکرون طول دارند و هتروسیست‌ها گاهی وقت ها کروی، ۷ –٤/۵ میکرون عرض و ۸/۵–٤ میکرون طول دارند. اسپورها مستطیلی، تعداد زیادی در یک زنجیره، ٦–۵ میکرون عرض و ۱۱–٦/۵ میکرون طول دارند، تالوس ژلاتینی، فیلامنت ها در هم پیچیده، به صورت نامنظم و زیتونی تیره هستند. دو سویه *نوستوک* می توانند به آسانی کلنی تشکیل دهند و محدودهٔ وسیعی از کلنی‌های ماکروسکوپیک با رنگ‌ها، شکل‌ها، اندازه‌ها و بافت‌های مختلف روی سطح ظرف پتری حاوی آگار شکل دهند.

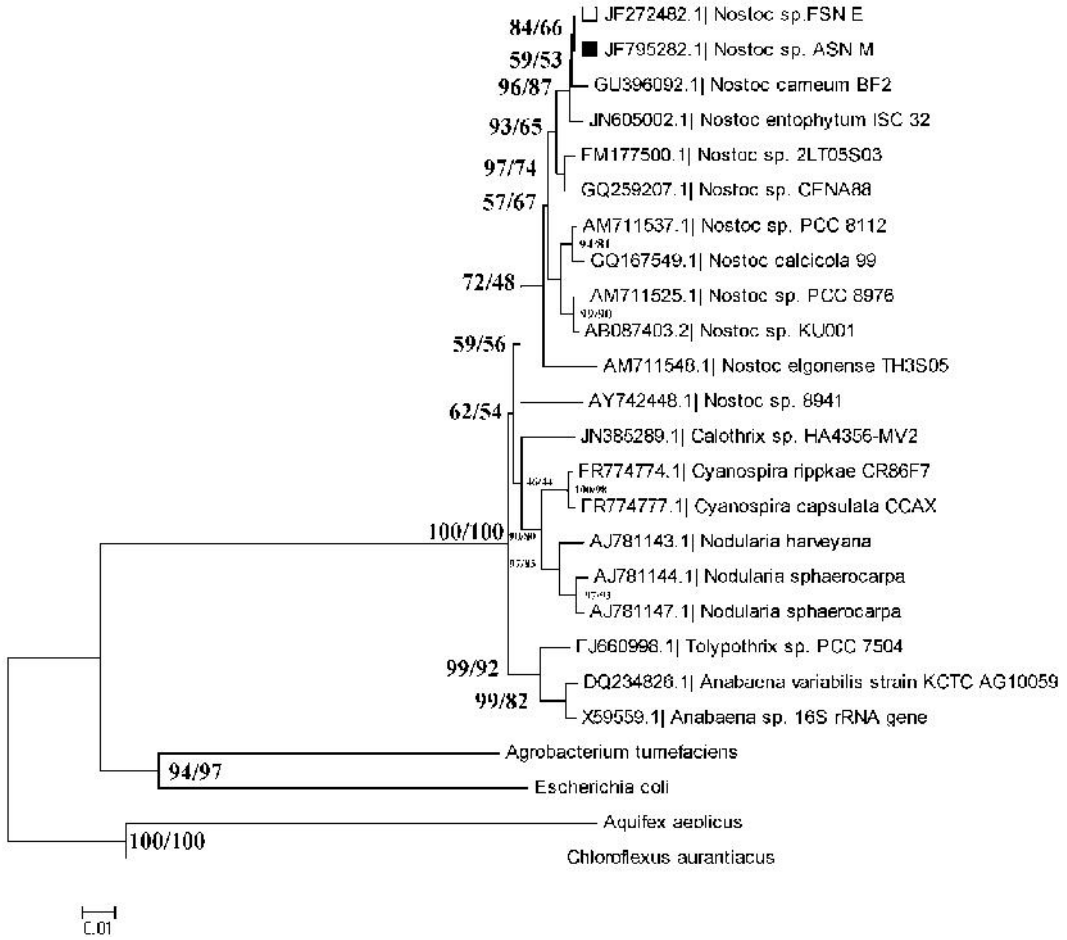
اندازه کلنی‌های کروی در هر دو سویه محدوده‌ای از ۰/۵ تا ۵ میلی متر و عمدتا 3–5 میلی‌متر در *Nostoc* sp. ASN_M اندازه گیری شده است. با گذشت زمان و پیشرفت رشد روی ظرف پتری‌ها، تغییر رنگی از قهوه‌ای روشن تا قهوه‌ای تیره در *Nostoc* sp. FSN_E دیده شد و تغییر رنگ از سبز روشن تا سبز تیره در *Nostoc* sp. ASN_M مشاهده گردید. مشاهده میکروسکوپی این کلنی‌های توپ مانند نشان داد که کلنی‌های جوان دارای فیلامنت‌های طویل هستند هر کدام با بیشتر از ۲۰ سلول رویشی و ۲ تا ۵ هتروسیست در *Nostoc* sp. FSN_E و تقریبا ۱۰–۱۵ سلول رویشی و ۲–۳ هتروسیست در *Nostoc* sp. ASN_M هستند، درحالی که کلنی‌های بالغ هر دو سویه شامل فیلامنت‌های نسبتا کوتاه و مواد غیر کریستالی است که احتمال می‌رود اگزوپلی ساکاریدها باشند.

۲: همپوشانی دو قطعه کامل *16S rRNA*

دو قطعه کامل ۱۸۱۵ جفت بازی با استفاده از هم ردیف سازی جفتی دو توالی ژن ١٦S rRNA به دست آمد. نتایج حاصل نشان داد که دو توالی تنها در پنج نوکلئوتید با یکدیگر متفاوتند و درصد شباهت آن‌ها با یکدیگر ۰/۹۹ درصد است.

۳: آنالیز فیلوژنتیکی ژن‌های 16S rRNA و ITS

بعد از هم ردیف سازی تمام توالی های گرفته شده از بانک ژن، درخت فیلوژنتیک با استفاده از دو روش Neighbour-Joining و آنالیز Maximum Likelihood با استفاده از برنامه MEGA 5 و مدل Kimura two-parameter ساخته شد. اعداد کنار هر گره انشعابی نشان دهنده فراوانی حاصل از آنالیز Bootstrap حاصل از ۱۰۰۰ تکرار به ترتیب برای دو روش Neighbour- /Maximum Likelihood Joining است. درخت ساخته شده با روش Neighbour-Joining و آنالیز Maximum Likelihood نشان می دهد که نتایج حاصل از این دو روش با یکدیگر مطابقت دارند و هر دو سویه بررسی شده در این رساله با حمایت بالای Bootstrap با گونه های جنس *Nostoc* خوشه بندی می شوند و در یک کلاد قرار می گیرند و دارای بیشترین نزدیکی با گونه *Nostoc-carneum*-BF2 هستند (59/53). مقیاس نشان داده شده در شکل ۰/۰۱ جهش را به ازای هر وضعیت اسید آمینه را نشان می دهد. (شکل یک).



شکل یک: درخت فیلوژنتیک ریشه دار حاصل از برنامه MEGA 5 را نشان می دهد.

ثبت ژن دو توالی به دست آمده در این رساله در ژن بانک

توالی های نوکلئوتیدی توالی یابی شده دو سویه بر اساس توالی ژن ١٦S rRNA در پایگاه داده های (DDBJ) با نام *Nostoc* sp. FSN_E به همراه کد دسترسی (JF272482.1) و *Nostoc* sp. ASN_M به همراه کد دسترسی (JF795282.1) ثبت شدند.

بحث و تفسیر

تنوع مورفولوژیک سیانوباکتری‌ها در محیط کشت، مشکل‌های فراوانی را در زمینه تاکسونومی آن‌ها ایجاد کرده است. در واقع تاکسونومی سیانوباکتری‌ها، در سال‌های اخیر موضوعی بوده است که اختلاف‌های قابل توجهی را در بین جلبک شناسان بوجود آورده است. بررسی روی ایزوله‌ها در محیط کشت‌های مختلف با استفاده از کلیدهای شناسایی کلاسیک که شامل توصیف کلیدهای دوتایی و اشکال انواع نمونه است، مشکل های فراوانی را به علت ایجاد تنوع در طول آزمایش و عدم ثبات بعضی از ویژگی‌هایی که برای شناسایی استفاده می شود، ایجاد کرده است. به عنوان مثال در تحقیقی شناسایی سویه‌های مختلف *Anabaena* توسط محققین مختلف بر اساس معیارهای مورفولوژیک به نام‌های متفاوت انجام گردید. ابتدا تصور آن‌ها این بود که شاید

شرایط رشد برای ایزوله‌ها مختلف بود، اما نتایج آزمایش های دیگر نشان داد که سویه‌های متفاوتی از گونه‌های *نوستوک* نیز در شرایط کاملا یکسان توسط دو محقق به طور کاملا متفاوت شناسایی شدند. آزمایش‌های دیگری روی گونه‌های دیگر سیانوباکتری‌ها از جمله *Scytonema*، *Aulosira* و *Tolypothrix* در دو محیط کشت مختلف Chu 10 (۲۰) و Allen and Arnon (۲) انجام شد و تفاوت در مورفولوژی آشکارتر گردید. بسیاری از شناسایی‌های متکی روی تنها خصوصیت‌های مورفولوژیکی بیشتر مواقع، خیلی سطحی و به طور نا صحیح انجام می‌شود و موجب بروز خطاهای زیادی در تحقیق‌های آزمایشگاهی می‌شود (۱۹، ۲٤، ۱۱). تحقیق‌های جدید نشان می‌دهد که تاکسونومی صحیح باید ترکیبی از خصوصیت‌های مورفولوژی نمونه‌ها با روش‌های چند فازی شامل اطلاعات فنوتیپیک، کموتاکسونومیک و ژنوتیپی باشد (۱۲، ۱٦، ۲۵).

بررسی توالی ژنتیک کل قطعه 16S rRNA همراه با توالی ITS در دو سویه *نوستوک*، تنها در پنج نوکلئوتید تفاوت را نشان داد و شباهت کل ۰/۹۹ درصد تخمین زده شد. در ضمن شباهت صد درصدی دو سویه در رمزگذاری یک پروتئین فرضی نیز ممکن است شاهد دیگری برای این فرضیه باشد که این دو سویه متعلق به یک گونه و دو واریته مختلف باشند. اما بر طبق نتایج FOX در سال ۱۹۹۲، شباهت حتی ۹۹ درصد دو توالی بر مبنای توالی 16S rRNA، هم نمی‌تواند دلیلی برای یکسان بودن گونه‌ها با هم باشد، زیرا تنوع بسیار فراوانی در DNAها در نواحی دیگر وجود دارد (۱۱). ITS، مارکر مناسبی برای بررسی‌های تنوع درون گونه‌ای در سیانوباکتری‌ها است (۲۰، ۱۳، ۲۰). توالی ITS بسیار متنوع تر از توالی ژن ۱٦S rRNA است. از آنجایی که نتایج حاصل از همردیف سازی توالی‌های به دست آمده از ژن 16s rRNA برای هر دو سویه دارای ۱۰۰ درصد شباهت بود، برای جستجوی تفاوت موجود بین این دو سویه به توالی‌یابی منطقه ITS با استفاده از پرایمرهای ITS پرداخته شد. بررسی‌ها نشان داده است که شباهت توالی ITS دو سویه *Pseudanabaena* sp. PCC7409 و *Limnothrix* sp. Mef 6705 حدود ۸۸٪ است، در حالی که شباهت توالی ژن ۱٦S rRNA، ۹۹/۷ درصد محاسبه گردید. طول منطقه ITS نیز در سیانوباکتری‌ها بسیار متنوع است، از این رو در آزمایش‌های تکثیر قطعه ITS در دو سویه *نوستوک*، عدم شناخت از طول دقیق قطعه مذکور همین طور بررسی دقیق ابتدا و انتهای توالی مورد نظر منجر به الحاق کل منطقه ۱٦S rRNA درون وکتور گردید. برای مثال تحقیق‌ها نشان داده است که در سویه *Anabaena crassa* طول توالی ITS ۲٦۲ جفت باز است و در *Synechococcus sp.* دارای ۷۷۱ جفت باز است.

نتایج حاصل از بررسی‌های مورفولوژیک دو سویه غالب یافت شده در اکثر شالیزارهای بررسی شده در طول سیکل زندگی از اوایل دوره رشد تا اواخر سیکل زندگی (از تشکیل هورموگونیوم تا ایجاد ریسه و فیلامنت) و استفاده از خصوصیت‌های مورفولوژیکی چون طول و قطر سلول‌های رویشی، سلول‌های آکینت و هتروسیست و مکان آن‌ها موجب شد که آن‌ها را با استفاده از کلیدهای موجود، *Nostoc ellipsosporom* و *Nostoc muscorum*

بنامیم. اما بررسی تاکسونومی دو سویه بر اساس ژن 16S rRNA همان طور که به صورت مرحله به مرحله ذکر گردید و نتایج حاصل از ساختن درخت فیلوژنتیک نشان داد که این دو سویه قسمتی از کلاستر *نوستوک* هستند و دارای بیشترین نزدیکی با *Nostoc-carneum*-BF2 با درصد بالای Bootstarping ۸۸/۹۸ هستند. در واقع این دو سویه دارای بیشترین قرابت فیلوژنتیکی با *Nostoc-carneum*-BF2 هستند و از نظر مسافتی نزدیک به *Nostoc enthophyllm* ISC 32 هستند. در کل نتایج حاصل از بررسی‌های مورفولوژیک و مولکولی تنها در حد یافتن جنس با یکدیگر مطابقت داشتند، اما نتایج حاصل از تشخیص نوع گونه با یکدیگر متفاوت بود. این مطالب آشکار می‌کند که تاکسونومی سنتی به طور کامل با روابط آشکار شده فیلوژنتیکی توسط ژن 16S rRNA در این بررسی مطابقت ندارد (٦).

در طول چند سال گذشته، جداسازی چندین متابولیت متنوع و جدید با فعالیت‌های داروشناختی جدید به عنوان مثال؛ آنتی بیوتیکی، آنزیم‌های ضد ویروسی، ضدسرطانی، ضدقارچی و همچنین ترکیب‌های بازدارنده پروتئازی و نظایر آن از سیانوباکتری ها، اهمیت استفاده از آن ها را به عنوان موجوداتی با ارزش در صنایع داروسازی آشکارتر ساخته است. لذا در مرحله تشخیص نوع متابولیت ثانویه موجود در هر سویه، شناسای دقیق نوع سویه از اهمیت بسیاری برخوردار است تا ترکیب فعال زیستی تولید شده را به آن سویه خاص نسبت دهیم.

References

1- Anagnostidis, K and Komárek, J. (1990). Modern approach to the classification system of cyanophytes. 5. Stigonematales. Arch. Hydrobiol. Suppl. Algo. Stud, 59: 1-73.

2- Allen, M. M and Arnon, D. I. (1955). Studies on nitrogen-fixing blue green algae. I. Growth and nitrogen fixation by *Anabaena cylindricaLemm*. Plant Physiol, 30: 366–372.

3- Desikachary, T. V. (1959). Cyanophyta. Indian council of agricultural research, New Delhi 1– 686.

4- Edwards U, T., Rogall, H., Blocker, M., Emde, M and Bottger, E. C. (1989). Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. Nucleic Acids Res 17: 7843- 7853.

5- Fox, G. E., Wisotzkey, J. D and Jurtshuk, P. (1992). How Close Is Close: 16s rRNA Sequence Identity May Not Be Sufficient To Guarantee Species Identity. Int J Syst Bacteriol 42: 166-170.

6- Galhano, V., de Figueiredo, D. R., Alves, A., Correia, A., Pereira, M. J., Laranjo, J. G and Peixoto, F. (2011). Morphological, biochemical and molecular characterization of *Anabaena*, *Aphanizomenon* and *Nostoc* strains (Cyanobacteria, Nostocales) isolated from Portuguese freshwater habitats. Hydrobiologia, 663:187-203.

7- Han, D., Fan, Y., Hu, Z. (2009). An evaluation of four phylogenetic Markers in *Nostoc*: implications for cyanobacterial phylogenetic studies at the intrageneric level. Curr. Microbiol; 58:170-176.

8- Hrouzek, P., Ventura, S., Lukesova, A., Mugnai, M. A., Turicchia, S. and Komárek, J. (2005). Diversity of soil Nostoc strains: phylogenetic and phenotypic variability. Algological Studies 117: 16-122.

9- Iteman, I., Rippka, R., de Marsac, N. T and Herdman, M. (2000). Comparison of conserved structural and regulatory domains within divergent 16S rRNA–23S rRNA spacer sequences of cyanobacteria. Microbiology, 146: 1275–1286.

10- Janse, I., Meima, M. A., Kardinaal, W. E and Zwart, G. (2003). High-Resolution Differentiation of Cyanobacteria by Using rRNA-Internal Transcribed Spacer

Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. Appl. Environ. Microbiol, 69: 6634–6643.

11- Kaushik, B, D. (1987). Laboratory methods for blue-green algae. Associated Publishing CO, New Delhi. P. 17–63.

12- Keswani, J and Whitman, W. B. (2001). Relationship of 16S rRNA sequence similarity to DNA hybridization in prokaryotes. Int J Syst Evol Micr IJSEM, 51: 667–678.

13- Komarek, J and Anagnostidis, K. (1989). Modern approach to the classification system of Cyanophytes, 4 – Nostocales. Arch Hydrobiol Suppl, 82: 247–345.

14- Komárek, J. (2006). Problem of the taxonomic category "species" in cyanobacteria. Algol. Stud, 109: 281-297.

15- Komarek, J. (2009). Modern taxonomic revision of planktic nostocacean cyanobacteria: a short review of genera. Hydrobiologia 639 (1): 231-243.

16- Lepere, C., Wilmotte, A and Meyer, B. (2000). Molecular diversity of *Microcystis* strains (Cyanophyceae, Chroococcales) based on 16S rDNA sequences. Syst. Georgr. Plants, 70: 275–283.

17- Nubel U, Garcia-Pichel, F and Muyzer, G (1997). PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. Appl. Environ. Microbiol 63: 3327–3332.

18- Rajaniemi, P., Hrouzek, P., Kastovska, K., Willame, R., Rantala, A., Hoffmann, L., Komárek, J and Sivonen, K. (2005). Phylogenetic and morphological evaluation of the genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Trichormus* and *Nostoc* (Nostocales, Cyanobacteria). Int J Syst Evol Micr 55: 11–26.

19- Rippka, R, Deruelles, J. J. B., Waterbury , M and Stanier, R. Y. (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. J. Gen. Microbiol 111:1-61.

20- Stein, J. (1973). Hand book of Phycological methods. Culture methods and growth measurements. Cambridge University Press, p. 448.

21- Svenning, M. M., Eriksson T., Rasmussen U. (2005). Phylogeny of symbiotic cyanobacteria within the genus *Nostoc* based on 16S rDNA sequence analyses. Archives of microbiology 183 (1): 19-26.

22- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M and Kumar, S. (2007). MEGA 4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evol 8: 1596–1599.

23- Tomioka, N and Sugiura, M. (1984). Nucleotide Sequence of the 16S-23S Spacer Region in the *rRNA* Operon from a Blue-Green Alga, *Anacystis nidnlans.* Mol Gen Genet, 193: 427—430.

24- Wang, Y and Qian, P. Y. (2009). Conservative Fragments in Bacterial 16S rRNA Genes and Primer Design for 16S Ribosomal DNA Amplicons in Metagenomic Studies. Plos One, 4: 74-101.

25- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A and Lane, D. J. (1991). 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. J. BACTERIOL, 173: 697-703.

26- Wilmotte, A. (1993). Molecular evolution and taxonomy of the cyanobacteria. In The molecular biology of cyanobacteria. D. Bryant A. (ed). Dordrecht, The Netherlands, Kluwer Academic Publishers p. 1-25.

27- Zapomělová, E. (2006). Current taxonomic issues with planktonic representatives of the genus *Anabaena* (Cyanobacteria) with special reference to their morphological features; literary review. Czch phycology, Olomouc, 6: 33-47.