J. Lake Sci.(湖泊科学),2010,**22**(2):221-226
http://www.jlakes.org. E-mail:jlakes@niglas.ac.cn

太湖与广东汤溪水库微囊藻 gyrB 基因序列分析*

刘海林,章 群**,李名立,胡 韧,雷腊梅
(暨南大学水生生物研究所,广东省水体富营养化与赤潮防治重点实验室,广州 510632)

摘 要:测定了江苏太湖和广东汤溪水库 7 株铜绿微囊藻(*M. aeruginosa*)和 1 株水华微囊藻(*M. flos-aquae*)gyrB 基因部分序列(974bp),发现 40 个变异位点,17 个简约信息位点,平均(G+C)% 为 47.8%,序列间相似性≥97.10%. 在 NJ 分子系统树上,不同种类的微囊藻混杂分布,表明基因型聚类与表型无直接关系;不同地理来源的铜绿微囊藻间遗传变异小,没有明显的地理聚群,反映出地理差异并不影响遗传上的相似性;支持暂将不同藻种归为铜绿微囊藻复合种的分类处理. gyrB 基因对微囊藻遗传差异的解析效果优于 16S rRNA,与 16S-23S ITS 和 cpcBA-IGS 等效果相当,表明 gyrB 基因可能成为研究微囊藻分类和遗传变异新的良好分子标记.
关键词:微囊藻;gyrB 基因;系统发育;太湖;汤溪水库

Sequence analysis of gyrB Gene from *Microcystis* in Lake Taihu and Tangxi Reservoir (Guangdong Province)

LIU Hailin, ZHANG Qun, LI Mingli, HU Ren & LEI Lamei
(*Institute of Hydrobiology, Jinan University, Key Laboratory for Water Eutrophi cation and Red-tide Control in Guangdong Province, Guangzhou* 510632, *P. R. China*)

Abstract: In present study, partial sequences (974bp) of gyrB gene of 7 strains of *M. aeruginosa* and 1 strain of *M. flos-aquae* from Lake Taihu (Jiangsu Province) and Tangxi Reservoir (Guangdong Province) respectively were measured, and 40 variable points and 17 parsimony informative sites were found. The mean parameter of (G+C)% was 47.8%, and the sequence similarity among them were more than 97.10%. In the Neighbor-Joining Tree, different morphorspecies were intertwined and could not be discriminated clearly, indicating that genotypes clustering had no directly relations to phenotypes. The different geographical strains didn't clustered together either, indicating that geographic differences didn't affect genetic similarity, and supporting the taxonomic treatment that different species be classified as *Microcystis aeruginosa* complex-species temporarily. The resolution effect of gyrB gene to genetic diversity of *Microcystis* was better than 16S rRNA, and was similar to 16S-23S ITS and cpcBA-IGS, suggesting that gyrB gene may be a good molecular marker in studying the taxonomy and genetic variation of Microcystis.
Keywords: *Microcystis*; gyrB; phylogeny; Lake Taihu; Tangxi Reservoir

微囊藻属(*Microcystis*)隶属蓝藻门(Cyanophyta)色球藻目(Chroococcales)微囊藻科(Microcystaceae),是广泛分布于全球淡水且在水华中出现频率最高、危害最为严重的有害蓝藻. 多数种类的微囊藻能产微囊藻毒素(Microcystins,MCs),可引发人畜鱼禽中毒甚至死亡. 微囊藻水华不仅破坏水体景观、污染空气和水质,还严重威胁着人类健康和生态安全[1]. 目前国内外有关微囊藻的研究多集中在生理、毒理、生态环保等方面,基础性的分类研究较少,而及时准确的分类鉴定,可以更好地掌握其种群组成和生长动态,对微囊藻毒素污染的预警、实时监测和防控都非常重要.

目前,微囊藻分类仍以传统的形态方法为主,但受环境条件或遗传因素影响,微囊藻的表型可能会发生变化,从形态上准确分类有一定困难. 尽管国际上已报道的微囊藻多达 50 余种,但许多种类的分类地位仍

* 国家自然科学基金项目(40106014、30770415)和广东省水利厅蓝藻治理重大项目(GDWR0604)联合资助. 2009-10-13 收稿;2009-12-01 收修改稿. 刘海林,男,1980 年生,硕士;E-mail:liuhailin2006@163.com.
** 通讯作者;E-mail:tqzhang@jnu.edu.cn.

在不断修订中.在国内现报道的约26种微囊藻中,许多种类归属不明确,甚至出现同物异名或同名异物现象[2-4].由于形态分类上的不足,微囊藻属分类仍有不少争议.分子分类反映的是物种的遗传本质,不受外界环境因素的影响,具有准确可靠、区分度高等优点,是较形态鉴定更为有效的方法.早在1978年Stanier等就提出了蓝藻的细菌学分类[5].gyrB基因编码DNA促旋酶β亚基,进化速率比rRNAs快,包含更多的遗传变异信息,是细菌种属分类的有效分子标记,但将其应用于微囊藻分类鉴定的研究报道却不多[5-7].

太湖(30°56′-31°34′N, 119°54′-120°36′E)位于长江下游长江三角洲地区,是我国太湖流域的中心和水利中枢.汤溪水库(23°53′-23°56′N, 116°49′-116°53′E)位于广东省东北部沿海,是潮汕地区最大的人工湖,水库总面积为16.67km^2,集水面积667km^2,总库容3181×10^8m^3.两水体均位于经济发达、人口密集的区域,是工农业生产、城乡用水的重要水源,兼有旅游、水产养殖、生态调节等多项功能.近年来,由于环境污染,水体富营养化加重并多次发生微囊藻水华,给当地生态环境、经济发展和居民健康造成不良影响[8-9].本研究通过对太湖与汤溪水库的微囊藻藻株作gyrB基因序列分析,比较不同地理来源的藻株间的遗传差异;结合GenBank中的同源序列来探讨gyrB基因作为微囊藻属分类的分子标记的有效性,以期为微囊藻分类和遗传多样性及微囊藻水华的监测防控等研究工作的开展提供参考.

1 材料与方法

1.1 藻株来源

实验室藻株:江苏苏州市太湖铜绿微囊藻(*M. aeruginosa*)4株(TH034、TH035、TH036、TH039),广东潮州市汤溪水库铜绿微囊藻3株(TX005、TX009、TX010)、水华微囊藻(*M. flos-aquae*)1株(TX016),由本课题组鉴定并分离培养.其它藻株来自GenBank,外类群为集胞藻(*Synechocystis* sp.)PCC6803(登录号:NC000911)(表1).

表1 本研究所分析的微囊藻种类及来源

Tab.1 The species and sources of the *Microcystis* strains used in this study

种(属)名	中文名	藻株号	序列长度	登录号	采样地点
M. aeruginosa	铜绿微囊藻	TH034	974bp	本实验	江苏苏州太湖
M. aeruginosa	铜绿微囊藻	TH035	974bp	本实验	江苏苏州太湖
M. aeruginosa	铜绿微囊藻	TH036	967bp	本实验	江苏苏州太湖
M. aeruginosa	铜绿微囊藻	TH039	974bp	本实验	江苏苏州太湖
M. aeruginosa	铜绿微囊藻	TX005	974bp	本实验	潮州汤溪水库
M. aeruginosa	铜绿微囊藻	TX009	974bp	本实验	潮州汤溪水库
M. aeruginosa	铜绿微囊藻	TX010	974bp	本实验	潮州汤溪水库
M. aeruginosa	铜绿微囊藻	NIES843	974bp	AP009552	日本茨城[10]
M. aeruginosa	铜绿微囊藻	Gy10380	967bp	AB014974	日本[11]
M. aeruginosa	铜绿微囊藻	Gy10381	967bp	AB014975	日本[11]
M. aeruginosa	铜绿微囊藻	PCC7806	974bp	AM778946	荷兰[12]
M. flos-aquae	水华微囊藻	TX016	974bp	本实验	潮州汤溪水库
M. wesenbergii	惠氏微囊藻	NIES104	974bp	AB074771	日本东京[13]
M. wesenbergii	惠氏微囊藻	Gy10418	974bp	AB014989	日本[11]
M. ichthyoblabe	鱼害微囊藻	TAC136	416bp	AB325130	日本长野[13]
M. ichthyoblabe	鱼害微囊藻	TAC146	416bp	AB325131	日本北海道[14]
M. viridis	绿色微囊藻	Gy10417	974bp	AB014988	日本[11]
M. viridis	绿色微囊藻	NIES102	416bp	AB325096	日本茨城[15]
M. novacekii	挪氏微囊藻	T20-3	416bp	AB325109	泰国佛统府[2]
M. novacekii	挪氏微囊藻	TL2	416bp	AB325108	泰国春武里[2]

1.2 DNA提取纯化及PCR扩增

藻株DNA的提取和纯化、PCR反应及产物检测的方法参照文献[16].PCR扩增和测序引物为gyrBF:5'-CGATGAGGCCGTAGCGGGTTACTG-3';gyrBR:5'-CTCTTTCGCTACAATCAGCCA-3',由上海博亚生物公司合

成. PCR 反应体系(20μl):10 × ExTaq Buffer 2.0μl,dNTP 1.5μl,引物 8μmol/L,DMSO 1.5μl,ExTaq DNA 聚合酶(5U/μl)0.5U,DNA 模板 1μl,其余用双蒸水补足.

1.3 序列测定及数据处理

将纯化的 PCR 产物送至北京六合华大基因科技有限公司进行正、反向测序. 序列经 ClustalX1.83 比对后,利用 MEGA4.0 软件进行碱基组成分析,并计算遗传距离、序列相似性等. 结合 GenBank 下载的同源藻株序列,用 MEGA4.0 Kimura 2-parameter 模型,构建邻接(Neighbor-Joining,NJ)树. 邻接树的评估采用 Boot-Straping 法,1000 次重复抽样检验.

2 结果与分析

2.1 gyrB 基因序列分析

2.1.1 序列碱基组成　藻种室分离培养的 8 株微囊藻 gyrB 基因序列经 ClustalX 1.83 比对后,截取有效序列长度 974bp,经 MEGA4.0 分析发现变异位点 40 个(占序列总长的 4.1%),简约信息位点 17 个,转换数 10,颠换数 4,转换/颠换比为 2.7,平均(A+T)%(52.2%)>(G+C)%(47.8%).7 株铜绿微囊藻间变异位点 30 个,简约信息位点 10 个,平均(G+C)% 为 47.6%,转换/颠换比为 4.1. 本研究中 8 株微囊藻间的(G+C)% 最大差值为 1.1%,参照《细菌分子遗传学分类鉴定法》,若 2 个不同菌株间(G+C)% 差值小于 2%,则不能区分物种,故依据 gyrB 基因序列的(G+C)% 含量不能区分微囊藻不同藻种[17].

2.1.2 藻株间遗传变异　内类群不同种间序列相似性为 96.7% -99.3%,其中本实验室测定的 7 株铜绿微囊藻间序列相似性为 97.2% -100%. 汤溪水库水华微囊藻 TX016 与 7 株铜绿微囊藻间的序列平均相似性为 97.6%,种间遗传差异不大. 铜绿微囊藻种内序列相似性为 98.5%,其余藻种种内序列相似性为 99% -99.5%. 太湖铜绿微囊藻藻株间的序列相似性为 97.5% -100%. 太湖铜绿微囊藻 TH035、TH036 及汤溪水库的 3 株铜绿微囊藻 TX005、TX009、TX010 序列间相似性为 100%. 汤溪水库 TX005、TX009、TX010 与太湖 TH035、TH036、TH039 序列间相似性均在 99.10% 以上,表明太湖与汤溪水库铜绿微囊藻株间无明显遗传差异.

2.2 系统发育分析

以集胞藻(*Synechocystis* sp.)PCC6803 作外类群构建的微囊藻 NJ 系统树见图 1.

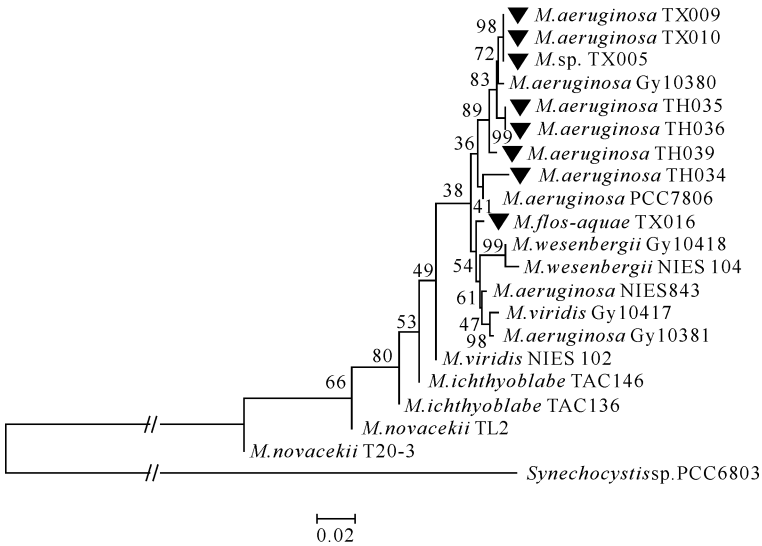

图 1 不同微囊藻藻株 gyrB 基因邻接(NJ)系统树

(标尺每刻度代表 0.02 的进化距离,节点旁数值表示 1000 次重复 Bootstrap 值的百分数;▼表示本实验室藻株)

Fig. 1 Neighbor-Joining Tree based on sequences of gyrB gene of different *Microcystis* strains

在 NJ 树中,15 株微囊藻聚类成 Clade1,Clade1 由 SubClade1 和 SubClade2 组成. SubClade1 内全部为铜绿微囊藻,包含了本实验室的 7 株铜绿微囊藻藻株和 GenBank 下载的藻株 Gy10308 和 PCC7806,但分支支持率仅为 36%;而铜绿微囊藻 NIES843、Gy10381 则在 SubClade2 内,与汤溪水库水华微囊藻 TX016 和 GenBank 中下载的水华微囊藻 Gy10417 以及惠氏微囊藻 Gy10418、NIES104 聚类,分支支持率为 54%. 绿色微囊藻 Gy10417 和铜绿微囊藻 Gy10381 聚类的支持率为 98% 且序列相似性为 99.6%,表明基因型的聚类与表型无直接联系,同种微囊藻可能具有不同的基因型,具有同一基因型的微囊藻可能具有着不同表型. Clade1 以外的 5 个不同种类藻株形成不同的分支.

3 讨论

3.1 关于微囊藻的形态分类

尽管 Hanman、Lopez-Rodas、Gugger、侯燕松等学者[18-21]曾用胺类、抗体、脂肪酸、光合色素等细胞组分作为生理生化指标,应用在藻类分类研究上,但目前微囊藻的分类仍以形态特征为主. 微囊藻种间及种内的表型受生理生态等因素影响可能会发生变化,出现某些过渡类型或复合型,仅依据形态特征而被误归为不同种属或亚种是很有可能的. 此外,受表型多变性的影响,研究者个人经验的不同也会在不同种类的划分上产生分歧. Otsuka 等报道不同种类的微囊藻细胞直径无论在种间还是种内都有重叠现象;不同种类单藻株在实验室继代培养时,细胞形状、大小及排列方式等会有所改变,形成的群体可能会出现原地域内并不常见的形态变型或过渡类型,不同种类无法直接区分,认为形态分类不完全可靠[2,13]. 在本研究中,不同地理来源的太湖和汤溪水库铜绿微囊藻,在形态上无明显差异,但未聚类在一起,同样表明形态分类可能并不可靠.

3.2 不同分子标记的比较与微囊藻的物种有效性

同工酶分析易受生活环境和发育阶段的影响,对微囊藻种间、种内关系的区分效果并不明显[22]. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)分析虽能得到遗传信息与某些表型的对应关系,但并不能有效区分藻种[23]. 16S rRNA 基因较为保守,不宜作微囊藻种下水平的分类研究[24]. 陈月琴、Otsuka 等报道不同微囊藻形态种间 16S-23S ITS(360bp)序列相似性为 94.8% 和 93.3%-100%,铜绿微囊藻种内序列相似性为 95.9%[13,25]. 章群等报道不同地域的微囊藻种间 cpcBA-IGS(Phycocyani Intergenic Spacer)(568bp)序列相似性为 93.5%-100%[26],与 Wu 等报道的种间 cpcBA-IGS(680bp)序列相似性(94.0%-99.8%)接近[27]. 在本研究中,微囊藻 gyrB 基因(974bp)种间序列相似性≥96.7%,铜绿微囊藻种内序列相似性为 98.5%. gyrB 基因与 16S-23S ITS、cpcBA-IGS 序列较 16S rRNA 基因的突变频率高,包含的遗传信息更丰富,种内与种间序列相似性上均低于 16S rRNA(99% 和 99.7%)[28],较 16S rRNA 基因具有更高的解析度. 由于 16S-23S ITS 和 cpcBA-IGS 序列较短,碱基插入缺失较多,可能会影响序列间的比对,ITS 专一性引物因 16S、23S rDNA 基因较强的保守性而较难设计,藻蓝蛋白基因间隔区 cpcBA-IGS 在藻类分类研究中有一定的种属局限性[29];gyrB 基因序列长,无插入缺失,其解析效果与 16S-23S ITS 和 cpcBA-IGS 序列相当,表明 gyrB 有可能成为研究微囊藻分类和遗传变异新的良好分子标记.

gyrB 基因与其他分子标记均未能有效区分不同种类的微囊藻,支持了 Neilan 提出的微囊藻分子分类与形态无直接相关性的观点[30];但并不排除聚类混杂的不同形态种本就属同一个种群的可能性. 鉴于多种分子标记均未有效区分微囊藻的不同种类,本研究支持暂将聚类混杂的不同藻种归为铜绿微囊藻复合种的分类处理[28,31].

3.3 不同地理来源的藻株遗传差异分析

Komárek、Prakash 等研究表明许多蓝藻类群并非全球性广泛分布而是具有一定的地域性[32-33]. Wu 等报道了中国华南、华中、华北地区不同藻种间存在着地理分化[27]. 在本研究中,太湖与汤溪水库铜绿微囊藻间序列相似性≥99.10%,聚类在 SubClade1 内;荷兰铜绿微囊藻 PCC7806 和日本铜绿微囊藻 Gy10380、Gy10381、NIES843 与中国 7 株铜绿微囊藻间的序列相似性为 97.0%-99.5%;铜绿微囊藻不同地理株聚类混杂,均未表现明显的遗传差异和地理结构,与 Casamatta 等提出的蓝藻类群地理上的差异与遗传上的相似性并无直接关联的观点一致[34].

4 小结

微囊藻水华是当前淡水水体环境研究的热点问题,微囊藻作为危害性极大的水华藻类,对其准确分类鉴定对后续的生理生态研究和水环境监测起着非常重要的作用. 由于本文分析的微囊藻种类、数量以及涉及地理范围有限,且目前已报道的多种分子标记均未能有效区分不同种类的微囊藻,考虑到单一分子标记分析可能有失偏颇,建议综合运用多种分子标记甚至作基因组学分析研究微囊藻的遗传变异,解决目前微囊藻分类研究中长期存在的争议.

5 参考文献

[1] 雷腊梅,宋立荣. 微囊藻及其毒素的分子生物学研究进展. 自然科学进展,2002,**12**(4):350-355.

[2] Otsuka S,Suda S,Li RH *et al*. Morphological variability of colonies of *Microcystis* morphospecies in culture. *Journal of General and Applied Microbiology*,2000,**46**: 39-50.

[3] Komárek J,Komárková J. Review of the European *Microcystis*-morphospecies(Cyanoprokaryotes) from nature. *Czech Phycology*,2002,**2**: 1-24.

[4] 虞功亮,宋立荣,李仁辉. 中国淡水微囊藻属常见种类的分类学讨论——以滇池为例. 植物分类学报,2007,**45**(5):727-741.

[5] Stanier R,Sistrom W,Hansen T *et al*. Proposal to place the nomenclature of the cyanobacteria(blue-green algae)under the rules of the international codel of nomenclature of bacteria. *Int J Syst Bacteriol*,1978,**28**: 335-336.

[6] Hopewell R,Oram M,Briesewitz R *et al*. DNA cloning and organization of the *Staphylococcus aureus* gyrA and gyrB Genes: Close Homology among Gyrase Proteins and Implications for 4-Quinolone Actionan Resistance. *Journal of Baeteriology*,1990,**172**(6): 3481-3484.

[7] Kupfer M,Kuhnert P,Korczak BM *et al*. Genetic relationships of *Aeromonas* strains inferred from 16S rRNA,gyrB and rpoB gene sequences. *Int J Syst Bacteriol*,2006,**56**: 2743-2751.

[8] Guo Lucie. Doing battle with the green monster of Taihu Lake. *Science*,2007,**317**: 1166.

[9] 赵孟绪,韩博平. 汤溪水库蓝藻水华发生的影响因子分析. 生态学报,2005,**25**(7):1554-1561.

[10] Kaneko T,Nakajima N, Okamoto S *et al*. Complete genomic structure of the bloom-forming toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* NIES-843. *Dna Research*,2007,**14**: 1-10.

[11] Hamada T. Use of gyrB gene, pufL and pufM genes and 16S rRNA sequence analysis to investigate phylogeny of photosynthetic bacteria. Published Only in Database,2002.

[12] Frangeul L,Quillardet P, Castets AM *et al*. Highly plastic genome of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806, a ubiquitous toxic freshwater cyanobacterium. *BMC Genomics*,2008,**9**: 274.

[13] Otsuka S,Suda S,Li RH *et al*. Pylogenetic relationships between toxic and non-toxic strains the genus *Microcystis* based on 16S to 23S internal transcribed spacer sequence. *FEMS Microbiology Letters*,1999,**172**: 15-21.

[14] Otsuka S,Suda S,Li RH *et al*. Characterization of morphospecies and strains of the genus *Microcystis* (Cyanobacteria) for a reconsideration of species classification. *Phycological Research*,1999,**47**: 189-197.

[15] Tanabe Y,Kasai F, Watanabe MM. Multilocus sequence typing (MLST) reveals high genetic diversity and clonal population structure of the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Microbiology*,2007,**153**: 3695-3703.

[16] 钱开诚,陈 迪,林少君等. 两株淡水微囊藻的藻蓝蛋白基因间隔序列(PC-IGS)分析. 生态科学,2005,**24**(2):150-153.

[17] 林万明. 细菌分子遗传学分类鉴定法. 上海:上海科学技术出版社,1990: 104.

[18] Hanman K,Miyagawa K,Matsuzaki S. Ocuurrence of sym-homospermidine as the major polyamine in nitrogen-fixing cyanobacteria. *Biochem Biophys Res Comm*,1983,**112**:606-613.

[19] López-Rodas V, Costas E. Characterization of morphospecies and strains of *Microcystis* (Cyanobacteria) from natural populations and laboratory clones using cell probes (lectins and antibodies). *Journal of Phycology*,1997,**33**(3):446-454.

[20] Gugger M,Lyra C,Suominen I *et al.* Cellular fatty acids as chemotaxonomic markers of the generaAnabaena,Aphanizomenon,Microcystis,Nostoc and Planktothrix(cyanobacteria). *Int J Syst Evol Microbiol*,2002,**52**:1007-1015.

[21] 侯燕松,梁 威,张丽萍等. 基于光合色素的化学分类法在淡水藻类研究中的应用. 长江流域资源与环境,2009,**18**

(6):563-567.

[22] Kato T, Watanabe MF, Watanabe M. Allozyme divergence in *Microcystis*(Cyanophyceae) and its taxonomic inference. *Arch Hydrobiol*ogia, 1991, **64**: 129-140.

[23] Nishihara H, Miwa H, Watanabe M *et al*. Random amplified polymorphic DNA analyses for discriminating genotypes of *Microcystis* cyanobacteria. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1997, **61**: 1067-1072.

[24] Seo PS, Yokota A. The phylogenetic relationships of cyanobacteria inferred from 16S rRNA, gyrB, rpoC1 and rpoD1 gene sequences. *Journal of General and Applied Microbiology*, 2003, **49**(3): 191-203.

[25] 陈月琴,何家菀,庄　丽等. 二种淡水微囊藻 rDNA 16S－23S 基因间隔区的序列测定与分析. 水生生物学报,1999, **23**(1): 41-46.

[26] 章　群,杨浩文,顾继光. 广东省典型水库微囊藻 cpcBA-IGS 序列分析. 见:韩博平等主编. 水库蓝藻与蓝藻毒素分布与检测. 北京:中国环境科学出版社,2006: 83-117.

[27] WU ZX, Gan NQ, Song LR. Genetic diversity: geographical distribution and toxin profiles of *Microcystis* strains (Cyanobacteria) in China. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2007, **49**(3): 262-269.

[28] Otsuka S, Suda S, Li RH *et al*. 16S rDNA sequences and phylogenetic analyses of *Microcystis* strains with and without phycoerythrin. *FEMS Microbiology Letters*, 1998, **164**: 119-124.

[29] Bolch CJS, Blackburn SI. Isolation and purification of Australian isolates of the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* Kütz. *Journal of Applied Phycology*, 1996, **8**: 5-13.

[30] Neilan BA. The molecular evolution and DNA profiling of toxic cyanobacteria. *Curr Issues Mol Biol*, 2002, **4**: 1-11.

[31] Yoshida M, Yoshida T, Satomi M *et al*. Intra-specific phenotypic and genotypic variation in toxic cyanobacterial *Microcystis* strains. *Journal of Applied Microbiology*, 2008, **105**: 407-415.

[32] Komárek J, Anagnostidis K. Cyanoprokaryota 1. Teil: Chroococcales. In: Ettl H, Gartner G, Heynig H eds. Süβwasserflora von Mitteleuropa 19/1. Ulm: Gustav Fischer, 1999: 164-190.

[33] Prakash S, Lawton LA, Edwards C. Stability of toxigenic *Microcystis* blooms. *Harmful Algae*, 2009, **8**: 377-384.

[34] Casamatta DA, Vis ML, Sheath RG. Cryptic species in cyanobacterial systematics: a case study of *Phormidium retzii* (Oscillatoriales) using RAPD molecular markers and 16S rDNA sequence data. *Aquatic Botany*, 2003, **77**: 295-309.