

규조류 *Skeletonema pseudocostatum* Medlin (Thalassiosirales, Bacillariohyta)의 형태적 특징과 분자계통학적 위치

한경하¹, 이 준², 박준상³, 윤주연¹, 김현정^{1,4}, 곽경윤¹, 오석진⁴, 신현호^{1,*}

¹한국해양과학기술원 해양시료도서관, ²한국생명공학연구원 생물자원센터

³한국해양과학기술원 생명공학연구센터, ⁴부경대학교 해양학과

Morpho-molecular characterization of diatom *Skeletonema pseudocostatum* (Thalassiosirales, Bacillariophyta) from the Korean coast

Kyong Ha Han¹, Zhun Li², Joon Sang Park³, Joo Yeon Youn¹, Hyun Jung Kim^{1,4},
Kyeong Yoon Kwak¹, Seok Jin Oh⁴ and Hyeon Ho Shin^{1,*}

¹Library of Marine Samples, Korea Institute of Ocean Science and Technology, Geoje 53201, Republic of Korea

²Biological Resource Center, Korean Collection for Type Cultures, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Jeongseup 56212, Republic of Korea

³Marine Biotechnology Research Center, Korea Institute of Ocean Science & Technology, Busan 49111, Republic of Korea

⁴Department of Oceanography, Pukyong University, Busan 48513, Republic of Korea

*Corresponding author

Hyeon Ho Shin
Tel. 055-639-8440
E-mail. shh961121@kiost.ac.kr

Received: 5 November 2019

Revised: 3 January 2020

Revision accepted: 15 January 2020

Abstract: Morphology of a strain of unspecified *Skeletonema* species established from Korean coast was examined by light, fluorescence and scanning electron microscopy, and SSU (small subunit) and LSU (large subunit) rDNA of the strain were also sequenced. The specimen was characterized by solitary or short chains, and each cell contained 1–2 chloroplasts. The valve face was slightly convex, and the terminal fulcrum processes (TFPPs) were open and showed narrow distal ends that could be truncated or spiny with claw-like protrusions. The basal part of the TFPPs was tubular and oblique to the cell axis. The intercalary fulcrum processes (IFPPs) were also narrow, completely open, and joined in a 1 : 1 junction. Occasionally, one IFPP was connected with two opposing IFPPs. The morphological features of the specimen were identical to those of *Skeletonema pseudocostatum*. Molecular phylogeny based on SSU rDNA revealed that the Korean strain is nested within a clade comprising *S. pseudocostatum* and *S. tropicum*. However, based on D1–D2 LSU rDNA sequences, a clade including *S. pseudocostatum* and a Korean strain was separated from the *S. tropicum* clade. This indicates that the Korean strain can be identified as *S. pseudocostatum*. This species represents the first record from Korean coastal waters.

Keywords: *Skeletonema*, morphology, SSU rDNA, LSU rDNA, phylogeny

서 론

Skeletonema 속은 바베이도스 주변의 에오세 후기 퇴적물로부터 관찰된 *Skeletonema barbadense* Grev.을 기준종 (type species)으로 하여 명명되었다 (Greville 1865). Greville (1866)은 홍콩 연안에서 발견된 돌말류 표본과 요크셔 연안의 해초류 (ascidian)의 위장에서 발견된 표본이 동일한 종임을 확인하고, 그 종을 *Melosira costata* Grev.로 명명하였다. 이후 Cleve (1873)는 자바해로부터 관찰된 *M. costata*와 *S. brabadense*의 형태적 유사성을 확인하고, *M. costata*를 *S. costatum* (Grev.) Cleve으로 재명명 하였다.

Skeletonema 속의 형태적 특징은 ‘받침돌기 (fulcrum process)에 의해 세포 간에 연결되어 형성되는 사슬 군체’로서 분명하게 정의되지만 (Hasle 1973; Round et al. 1990), 속 내 종을 구별할 수 있는 형태적 특징이 모호할 뿐 아니라, 형태적 변이 때문에, 대부분의 *Skeletonema* 종의 보고는 *S. costatum*으로서 기록되어 왔다 (e.g. Jung et al. 2009). 하지만, 최근에 *Skeletonema* 종의 분자계통학적 분석을 통한 결과는 속 내 다수의 숨은종 (cryptic species)의 발견과 함께 다수의 신종 보고를 이끌었고 (Sarno et al. 2005, 2007), 현재 전 세계 보고된 *Skeletonema* 속 내 종수는 21종으로 알려져 있다 (Guriy and Guiry 2019).

S. pseudocostatum Medlin은 받침돌기 외부형태, 입술돌기 (rimoportula process)의 위치와 유전적 차이에 의해 *S. costatum*과 구별된다 (Medlin et al. 1991). 그리고, Sarno et al. (2005)은 *S. pseudocostatum*의 둘레띠 (cingular band), 받침돌기 등의 형태적 특징을 구체적으로 기재하여 다른 종과의 형태적 차이를 보고하였다. 이후 *S. pseudocostatum*은 유럽 (이탈리아, 네덜란드), 남아메리카 (브라질), 아프리카 (이집트), 아시아 (중국, 일본), 오스트리아, 뉴질랜드 등 전 세계 연안에서 다수 보고되어 왔으나 (Sarno et al. 2005; Bergesch et al. 2009; Kaeriyama et al. 2011; McCarthy 2013; Veen et al. 2015), 국내 연안에서의 출현은 보고된 바 없다.

국내에서 *Skeletonema* 속의 분류는 광학현미경하에 사슬형태의 군체를 형성하는 것에 따라 *S. costatum*으로 동정되어 왔다. Jung et al. (2009)은 국내 연안에 출현하는 *Skeletonema* 종들을 대상으로 주사전자현미경을 이용하여 구체적인 형태적 특징을 관찰하였다. 그 결과, *S. dohrnii*, *S. marioni*, *S. subsalsum*, *S. tropicum* 등 4종을 확인하였지만 기존에 빈번하게 보고되어 온 *S. costatum*의 출현은 확인하지

못했다. 따라서, 국내 연안에서 출현하는 *Skeletonema* 종은 구체적인 형태 분석과 함께 분자계통학적 연구를 통해 동정을 명확히 할 필요가 있다.

본 연구는 한국해양과학기술원의 해양식물플랑크톤 기탁등록보존기관에서 보존하고 있는 *Skeletonema* 속의 배양주 (strain)를 이용하여 종의 형태적 특징과 계통분류학적 특성을 분석하였다. 그 결과, 분석 종이 국내에서는 기록되어 있지 않은 *S. pseudocostatum*으로 확인되어, 그 출현을 기록한다.

재료 및 방법

1. *Skeletonema pseudocostatum*의 배양주 (strain) 정보

*S. pseudocostatum*은 1998년 5월 8일에 육지도 (34°38' 30.2"N, 128°16'22.7"E)에서 20 μm 망목 크기의 식물플랑크톤 네트를 수평 예인하여 채집되었다. *S. pseudocostatum*의 단일 군체는 모세관 방법으로 분리하였고, 온도 20°C, 염분 33 psu 및 광량 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 하에 f/2 배지에서 배양하였다. 단일 분리된 종주는 미세조류은행에서 보관, 관리되어왔으나, 현재는 한국해양과학기술원 해양시료도서관에 위치한 해양식물플랑크톤 기탁등록보존기관에 해당 종이 이관되어 배양주 LIMS-PS-0848로 등록하여 보존하고 있다.

2. 형태적 분석

*S. pseudocostatum*의 군체 (chain) 길이와 모양, 엽록체 구조 등의 형태적 특징은 광학현미경 (Primo Vert, Zeiss, Germany)과 형광현미경 (Axio Imager 2; Zeiss, Germany)으로 관찰하였고, 돌기 (process)의 구조와 위치 등의 미세구조는 전계방출형 주사전자현미경 (JSM7600, Jeol, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다. 주사전자현미경 관찰을 위해 *S. pseudocostatum* 배양주는 최종농도 2%인 Lugol 용액으로 고정한 후, 에탄올 시리즈 (10, 30, 50, 70, 90, 99, 99%)로 시료를 15분씩 탈수하였고, 임계점 건조법 (critical point drying method) (Spi-DryTM Regular Critical Point Dryer, SPI Supplies, West Chester, PA, USA)을 통해 건조하였다. 건조된 시료는 aluminum stub에 고정하고 백금코팅 (platinum)

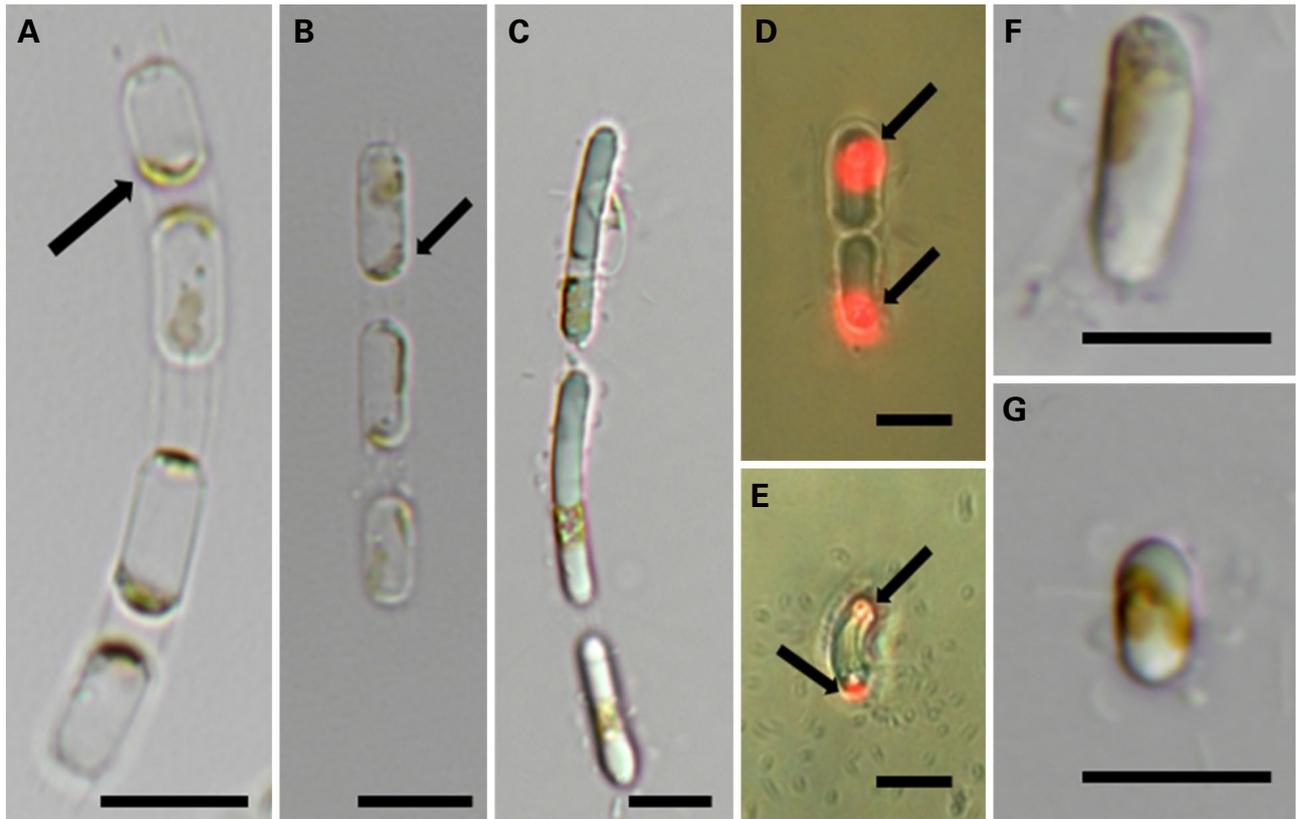


Fig. 1. Light and fluorescence micrographs of *Skeletonema pseudocostatum* (LIMS-PS-0848). (A-E) Colony with 1-2 chloroplasts in each cell (arrows); (F, G) single cell. Scale bars: A-G = 10 μ m.

하여 5~15 Kv, 8.0 mm working distance 하에서 관찰하였다.

3. 분자생물학적 분석

*S. pseudocostatum*의 Genomic DNA (gDNA) 추출을 위해 대수성장기의 배양주 1 mL을 1.5 mL tube에 분주하여 원심분리기로 침전시킨 후 상등액을 제거하고 세포만 농축하여 -20°C의 냉동실에 보관하였다. 농축된 배양주의 gDNA은 DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA)를 사용하여 매뉴얼에 따라 추출되었다. Small subunit (SSU) rDNA 유전자 부위의 염기서열 분석을 위해 forward primer: SSU11+ (5'-TGATCCTGCCAGTAGTCATACGCT-3'), reverse primer: SSU1147-(5'-AGTTTCAGCCTTGCGACCATAC-3')을 사용하였고 (Alverson *et al.* 2007), large subunit (LSU) rDNA는 forward primer: LSU DIR (5'-ACCCGCTGAATTTAAGCATA-3'), reverse primer: LSU R2 (5'-ATTCGGCAGGTGAGTTGTTAC-3')를 이용하여 (Takano and Horiguchi 2006), PCR

을 수행하였다. PCR 반응액의 경우 5 μ L 10X Ex Taq Buffer (Mg²⁺ plus), 1.25 U Ex Taq polymerase (Takara, Japan), 1 μ M primer 및 1 μ L DNA을 주입하여 최종 50 μ L가 되도록 하였고, PCR 수행조건은 pre-denature는 95°C에서 2분, denature는 95°C에서 20초, annealing은 55°C에서 1분, elongation은 72°C에서 1분씩 30회 반복 후, post-elongation은 72°C에서 5분간 실시하였다 (T100TM Thermal Cycler; Bio-Red, Hercules, CA). PCR 산물은 1% agarose gel에 전개하고 Midori Green Advance (NIPPON Genetics, Co., Ltd., Tokyo, Japan)로 염색하여 UV 하에서 DNA 밴드를 확인하였고, QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Valencia, CA)를 사용하여 PCR 산물을 정제한 후 ABI PRISM[®] 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems, USA)을 사용하여 염기서열을 분석하였다.

4. 분자계통학적 분석

*S. pseudocostatum*의 SSU rDNA 염기서열은 Alverson *et*

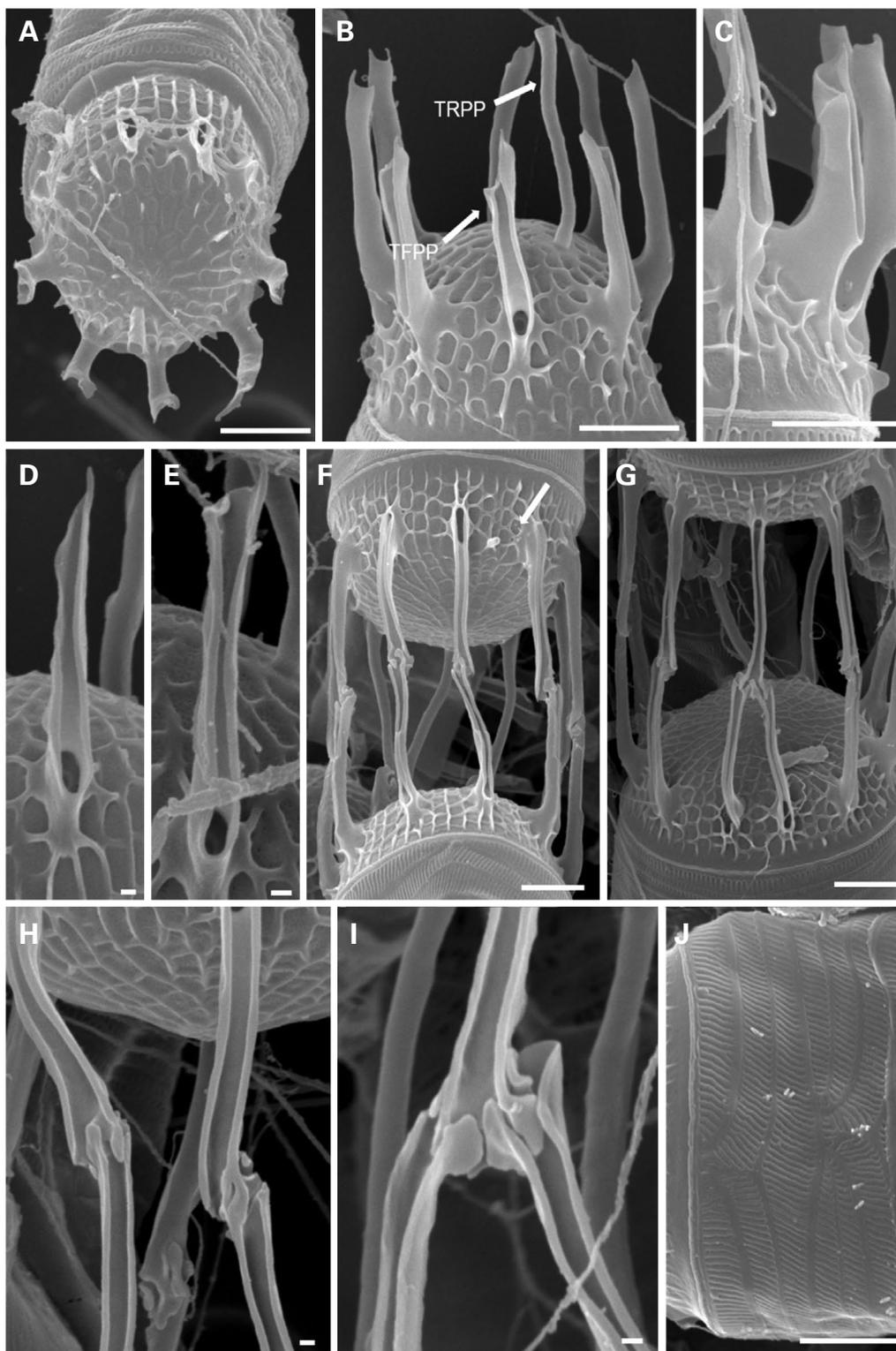


Fig. 2. Scanning electron micrographs of *Skeletonema pseudocostatum* (LIMS-PS-0848). (A) Terminal valve with subcentral TRPP; (B) terminal valve with TFPPs and TRPP; (C) detail of a terminal valve; (D, E) detail of TFPPs showing spiny ends; (F) intercalary valves with 1 : 1 IFPP junctions and IRPP (arrow); (G) intercalary valves with 1 : 2 IFPP junctions; (H) detail of 1 : 1 IFPP junctions; (I) detail of a 1 : 2 IFPP junction; (J) singular band. Scale bars: A–C, F–J = 1 μ m; D, E = 0.1 μ m.

Table 1. Morphological comparison of *S. pseudocostatum* to other *Skeletonema* species

Species	Chloroplast number	TFPP ^a		IFPP ^b joints	IRPP ^c	Reference
		Tip shape	Tip width			
<i>S. pseudocostatum</i>	1–2	Claw-like, truncated, or spiny	Narrow	1 : 1	Short	This study
<i>S. pseudocostatum</i>	1–2	Claw-like, truncated, or spiny	Narrow	1 : 1	Short	Sarno <i>et al.</i> (2005)
<i>S. dornhii</i>	1–2	Dentate	Flared	1 : 2	Short	Sarno <i>et al.</i> (2005)
<i>S. grethae</i>	1–2	Claw-like, truncated, or spiny	Narrow	1 : 1	Short	Sarno <i>et al.</i> (2005)
<i>S. japonicum</i>	1–4	Truncated or claw-like	Narrow	1 : 2	Short	Sarno <i>et al.</i> (2005)
<i>S. marinoi</i>	1–2	Dentate	Flared	1 : 2	Short	Sarno <i>et al.</i> (2005)
<i>S. menzelii</i>	1–2	Spiny	Narrow	–	Short	Sarno <i>et al.</i> (2005)
<i>S. subsalsum</i>	1–2	Hook-like	Narrow	1 : 2	Long	Sarno <i>et al.</i> (2005)
<i>S. tropicum</i>	1–7	Claw-like or truncated	Narrow	1 : 2	Short	Sarno <i>et al.</i> (2005)

^a: Terminal fuloportula process, ^b: Intercalary fuloportula process, ^c: Process of the intercalary rimoportula

al. (2005) 및 Sarno *et al.* (2005)을 참고하여 총 40개, LSU rDNA는 Sarno *et al.* (2005)을 참고하여 총 36개의 정렬된 염기서열 정보를 추가한 후 MEGA v. 7.0.26 프로그램을 사용하여 매뉴얼로 정렬하였다. 정렬된 염기서열의 적합한 유전자 모델을 찾기 위해 MEGA v. 7.0.26 프로그램에서 Modeltest를 수행하였고, 최적 모델은 SSU rDNA의 경우 TIM3+G (A:C:G:T=0.2867:0.1822:0.2397:0.2914; p-inv=0; gamma shape=0.3090), LSU rDNA는 GTR+I (A:C:G:T=0.2573:0.1962:0.2932:0.2534; p-inv=0.6370; gamma shape=0)을 선정하여 MEGA v. 7.0.26 프로그램을 사용하여 최대유사분석(Maximum-likelihood analysis; ML)을 분석하였다. 그리고, 계통수의 유연 관계를 평가하기 위해 1,000회의 bootstrap을 수행하였다. 베이지 추론(Bayesian Inference; BI)은 MrBayes 3.1.2를 사용하였고, 분석이 완료된 이후에는 분석결과를 바탕으로 하여 각 종 간의 계통유연관계를 밝히는 분자계통도를 작성하였고, 분자계통도의 확인은 MEGA 프로그램으로 수행하였다.

결과 및 고찰

1. *Skeletonema pseudocostatum*의 형태적 특징

*Skeletonema pseudocostatum*의 둘레면 보기(girdle view)에서 엽록체는 1~2개이고, 세포의 말단에 위치해 있다(Fig. 1A~E). 각 세포는 길게 돌출한 가장자리 받침돌기에 의해 사슬 형태로 연결되었고 직선이나 곡선의 군체를 형

성하였다(Fig. 1A~C). 군체는 2~6개의 세포로 구성되어 있고, 뚜껑(valve)의 직경은 6~17.3 μm ($n=50$)로, 같은 배양주 내에서도 세포마다 길이 차이를 보였으며, 단일 세포로 존재할 때에도 길이 차이를 확인할 수 있었다(Fig. 1F, G).

주사전자현미경을 이용한 *S. pseudocostatum*의 관찰 결과, 뚜껑은 원형이고(Fig. 2A), 뚜껑면(valve face)은 평평하거나 살짝 볼록했다(Fig. 2A, B). 말단세포의 가장자리 받침돌기 끝(terminal fuloportula process; TFPP)은 갈라지거나 갈고리 모양이고(Fig. 2B~D), 길이는 $1.67 \pm 0.5 \mu\text{m}$ ($n=36$)이며, 개수는 8.10 ± 1.1 개로 뚜껑의 크기에 따라 다양했다(Fig. 2B, C). 한 개의 말단세포 입술돌기(terminal rimoportula process; TRPP)는 뚜껑면 중앙으로부터 살짝 벗어나 위치해 있었고(Fig. 2A, B), 두꺼운 원통형의 나팔관 모양이며, 길이가 $1.1 \pm 0.6 \mu\text{m}$ ($n=6$)이었다(Fig. 2B). 그리고, 연결세포 받침돌기(intercalary fuloportula process; IFPP)는 일반적으로 1:1 결합으로 맞물려 있으나(Fig. 2F~H), 1:2 결합도 종종 관찰되었다(Fig. 2I). 망목은 poroid이고, 방사상으로 배열하며 1 μm 당 13개($n=4$)이다(Fig. 2J).

Sarno *et al.* (2005, 2007)의 분석 결과에 의하면, *Skeletonema* 속은 종에 따라 TFPP와 TRPP의 개수 및 길이, IFPP 결합, 둘레면 모양 등의 형태가 다르다. 이에 따라 *S. pseudocostatum*을 포함한 8종의 *Skeletonema*의 미세구조를 비교하였다(Table 1). *S. pseudocostatum*은 TFPP가 끝이 갈라지거나, 갈고리 또는 가시 모양인 것이 *S. grethae*, *S.*

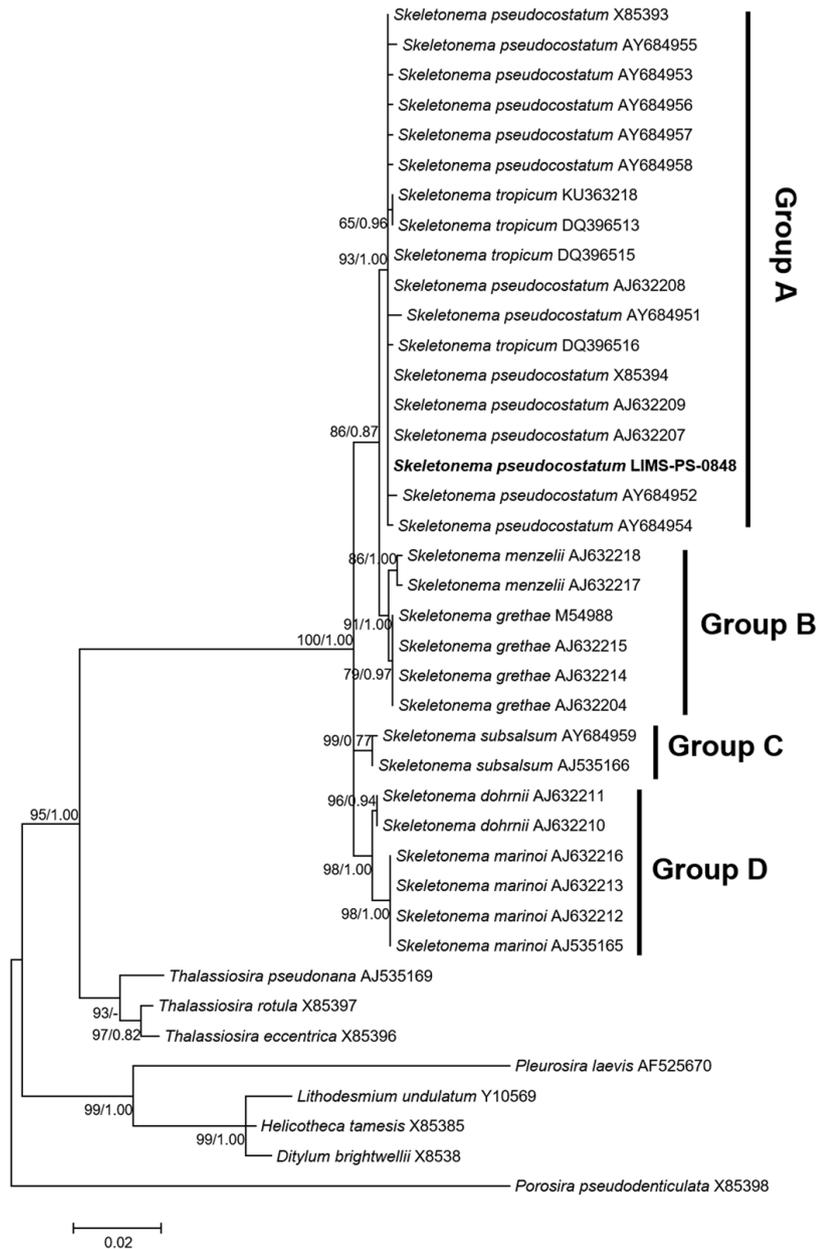


Fig. 3. Maximum-likelihood (ML) tree showing the phylogenetic position of *Skeletonema pseudocostatum* based on partial nuclear-encoded SSU rDNA sequences. *Pleurosira laevis* (AF525670), *Lithodesmium undulatum* (Y10569), *Helicotheca tamesis* (X85385), *Ditylum brightwellii* (X8538) and *Porosira pseudodenticulata* (X85398) was selected as the outgroup. The numbers on each node are the bootstrap values (%) and the Bayesian Posterior Probability (PP). Only bootstrap values above 50 and PP above 0.7 are shown. Scale bar = number of nucleotide substitutions per site.

japonicum, *S. menzeli*, *S. tropicum*과 유사한 형태적 특징을 보인다(Table 1). 하지만, 이 종들은 TFPPs의 형태, 규산화 정도, 균체모습, 엽록체수 등에 의해 *S. pseudocostatum*으로 부터 구별된다. *S. grethae*은 TFPPs의 형태적 차이에 의해 *S. pseudocostatum*과 구별되고, *S. japonicum*은 단단한 규산

질각과 상대적으로 큰 기공에 의해 구별되며, *S. menzeli*은 단일세포로 관찰된다는 것에서 차이를 보이고, *S. tropicum*은 엽록체의 수가 많고, 더 긴 균체를 형성한다는 것에서 *S. pseudocostatum*과 다르다(Sarno *et al.* 2005). 이처럼 종에 따라 일부 종은 서로 비슷한 형태적 특징을 가지기도

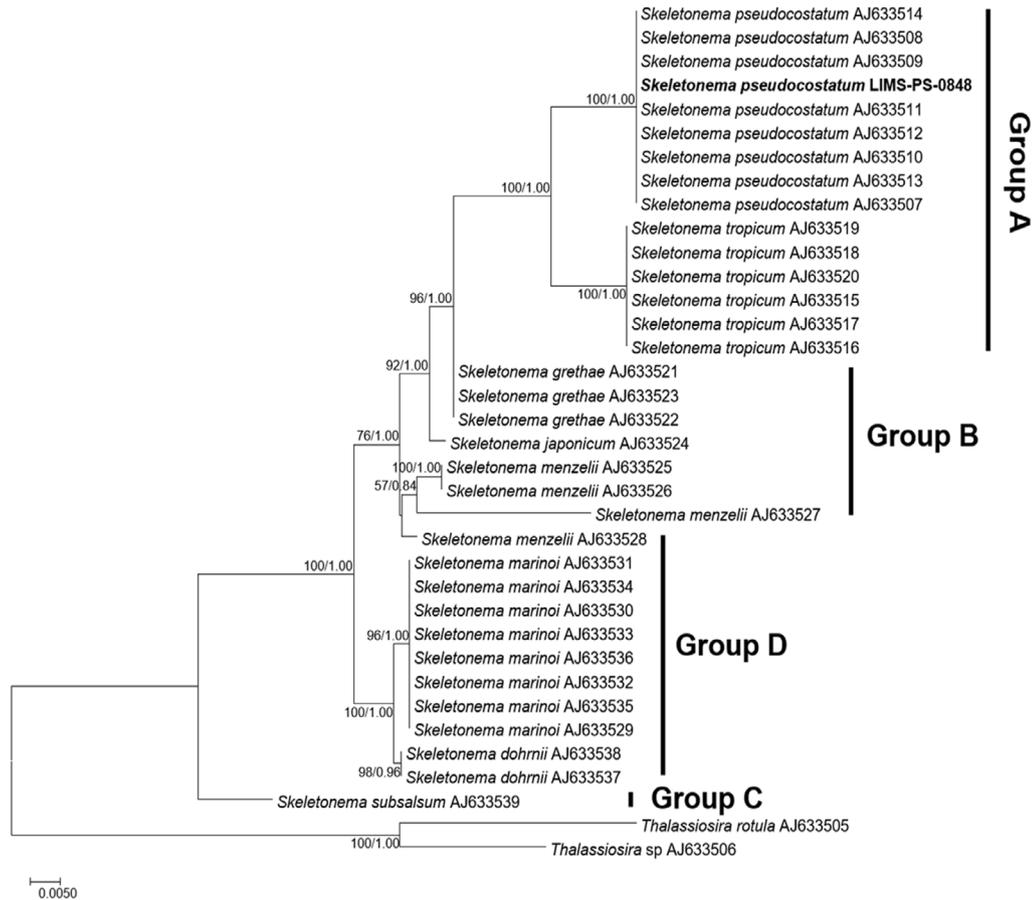


Fig. 4. Maximum-likelihood (ML) tree showing the phylogenetic position of *Skeletonema pseudocostatum* based on partial nuclear-encoded LSU rDNA sequences. *Thalassiosira rotula* (AJ633505) and *Thalassiosira* sp. (AJ633506) were selected as the outgroup. The numbers on each node are the bootstrap values (%) and the Bayesian Posterior Probability (PP). Only bootstrap values above 50 and PP above 0.7 are shown. Scale bar = number of nucleotide substitutions per site.

하지만, 주사전자현미경을 통한 세부적 형태 특징 비교로 *Skeletonema* 속의 종들을 구분할 수 있을 것으로 판단된다.

2. *Skeletonema pseudocostatum*의 계통 분류학적 위치

*S. pseudocostatum*의 계통학적 위치를 파악하기 위해 정렬된 SSU rDNA 염기서열의 길이는 1033 bp였고, LSU rDNA 염기서열의 길이는 778 bp였고, 각 종 간의 계통유연관계를 밝히는 분자계통도는 Figs. 3과 4에 나타내었다.

Skeletonema 속의 진화적 유연관계는 4개의 그룹(Group)으로 구분되었고(Figs. 3, 4), *S. pseudocostatum*는 *S. tropicum*과 함께 Group A에 포함되었다. *Skeletonema* 속은 형태적

으로 유사성을 보였던 만큼, 종간 유전적 거리도 가까웠는데, 특히 *S. tropicum*은 SSU rDNA 결과에서 *S. pseudocostatum*과 유전적으로 동등한 위치에 있었다. 이는 SSU rDNA를 통한 계통학적 분석으로 두 종을 구분할 수 없다는 것을 의미한다. 하지만 LSU rDNA 구간의 염기서열 분석 결과에서 *S. tropicum*는 *S. pseudocostatum*과 함께 Group A로 구분되었지만, 유전적 거리에서 차이를 나타내었고, 유사도 분석(similarity analysis)결과 본 배양주와 97% 일치하는 결과를 보였다. 이처럼 SSU rDNA 결과에서는 구분되지 않았던 *S. tropicum*는 *S. pseudocostatum*이 LSU rDNA 결과에서 구분 가능하였다. 따라서 *Skeletonema*의 정확한 종 동정을 위해 여러 구간의 분석이 요구된다.

한편, LSU rDNA 염기서열의 유사도 분석(similarity

analysis) 결과 본 배양주는 여러 지역에서 기록된 분리주의 염기서열과 100% 일치하는 결과를 보였다. 이는 *S. pseudocostatum*은 지리적 위치와 상관없이 염기서열에서 유전적 차이가 나타나지 않는 단일 계통(monophyly)이라는 것을 의미한다.

적 요

*Skeletonema pseudocostatum*의 세포는 규산질 성분의 돌기에 의한 사슬 형태로, 길이는 6~17.3 μm 였고, 엽록체는 세포 당 1~2개를 포함하고 있었다. 주사전자현미경 관찰 결과 *Skeletonema* 종을 구분할 수 있는 가장자리 받침돌기 끝(terminal fuloportula process)은 끝이 갈라지거나, 갈고리 모양이었고, 길이가 $1.67 \pm 0.5 \mu\text{m}$ 이고, 개각의 가장자리에 위치해 있으며, 개수는 8.10 ± 1.1 개로 개각의 크기에 따라 다양하게 나타났다. 말단세포 입술돌기(terminal rimoportula process)는 두꺼운 원통형의 나팔관 모양으로, 개각의 중앙 근처에 위치하였고, 길이는 $1.1 \pm 0.6 \mu\text{m}$ 였으며, 개수는 1개였다. 연결세포 받침돌기(intercalary fuloportula process)는 대부분 1:1 결합으로 서로 맞물려 있는 형태였고, 1:2 결합도 종종 발견되었다. 계통분석 결과는 형태적 특징이 유사한 종 간의 유전학적 거리가 가깝다는 것을 나타냈고, 지리적 기원이 다른 동일 종의 경우, 유전적 차이를 보이지 않았다. 이는 *S. pseudocostatum*은 지리적 위치와 상관없이 유전적 차이가 나타나지 않는 단일 계통(monophyly)이라는 것을 의미한다.

사 사

본 연구는 해양수산과학기술진흥원 해양수산생명공학 기술개발사업(No. 20170431)과 한국해양과학기술원 연구사업(PE99721)의 지원을 받아 수행되었음.

REFERENCES

Alverson AJ and L Kolnick. 2005. Intragenomic nucleotide polymorphism among small subunit (18S) rDNA paralogs in the

diatom genus *Skeletonema* (bacillariophyta) 1. J. Phycol. 41:1248-1257.

Alverson AJ, RK Jansen and EC Theriot. 2007. Bridging the Rubicon: phylogenetic analysis reveals repeated colonizations of marine and fresh waters by thalassiosiroid diatoms. Mol. Phylogenet. Evol. 45:193-210.

Bergesch M, M Garcia and C Odebrecht. 2009. Diversity and morphology of *Skeletonema* species in southern Brazil, southwestern Atlantic Ocean (note). J. Phycol. 45:1348-1352.

Cleve PT. 1873. Examination of diatoms found on the surface of the Sea of Java. Bih. Kongl. Svenska Vetensk.-Akad. Handl. 11:1-13, 3 pls.

Greville RK. 1865. Descriptions of new and rare diatoms. Series XXI. Tr. Micr. Soc. Lond. 13:43-75.

Greville RK. 1866. Description of new and rare diatoms. Series 20. Tr. Micr. Soc. Lond. 14:77-86.

Guiry MD and GM Guiry. 2019. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 05 September 2019.

Hasle GR. 1973. Some marine plankton genera of the diatom family *Thalassiosiraceae*. Nova Hedwigia 45:1-49.

Jung SW, SM Yun, SD Lee, YO Kim and JH Lee. 2009. Morphological characteristics of four species in the genus *Skeletonema* in coastal waters of South Korea. Algae 24:195-203.

Kaeriyama H, E Katsuki, M Otsubo, M Yamada, K Ichimi, K Tada and PJ Harrison. 2011. Effects of temperature and irradiance on growth of strains belonging to seven *Skeletonema* species isolated from Dokai Bay, southern Japan. Eur. J. Phycol. 46:113-124.

McCarthy PM. 2013. Census of Australian Marine Diatoms. Australian Biological Resources Study, Canberra.

Medlin LK, HJ Elwood, S Stickel and ML Sogin. 1991. Morphological and genetic variation within the diatom *Skeletonema costatum* (Bacillariophyta): evidence for a new species, *Skeletonema pseudocostatum*. J. Phycol. 27:514-524.

Round FE, RM Crawford and DG Mann. 1990. The Diatoms. Biology and Morphology of the Genera. Cambridge University Press, Cambridge. p. 747.

Sarno D, WH Kooistra, LK Medlin, I Percopo and A Zingone. 2005. Diversity in the genus *Skeletonema* (Bacillariophyceae). II. An assessment of the taxonomy of *S. costatum*-like species with the description of four new 1. J. Phycol. 41:151-176.

Sarno D, WH Kooistra, S Balzano, PE Hargraves and A Zingone. 2007. Diversity in the genus *Skeletonema* (BACILLARIOPHYCEAE): III. Phylogenetic position and morphological variability of *Skeletonema costatum* and *Skeletonema grevillei*, with the description of *Skeletonema ardens* sp. nov. 1. J. Phycol.

- 43:156–170.
- Takano Y and T Horiguchi. 2006. Acquiring scanning electron microscopical, light microscopical and multiple gene sequence data from a single dinoflagellate cell 1. J. Phycol. 42:251–256.
- Veen A, CHJ Hof, FAC Kouwets and T Berkhout. 2015. Rijkswaterstaat Waterdienst, Informatiehuis Water. Available at: <http://ipt.nlbif.nl/ipt/resource?r=checklist-twn> (last accessed May 18, 2017).