

文章编号:1000-0615(2009)04-0565-07

小球藻核 rDNA ITS 与叶绿体 *rbcL* 基因序列分析及应用

孙 雪, 吴晓微, 李兴文, 裴鲁青

(宁波大学教育部应用海洋生物工程重点实验室, 浙江 宁波 315211)

摘要:用核基因组 rDNA 的内转录间隔区(ITS)和叶绿体 *rbcL* 基因对小球藻属(*Chlorella*)6 株小球藻的种间和种内关系进行了分析。克隆序列与 GenBank 数据库检索到的相关小球藻序列(ITS 和 *rbcL* 序列各为 15 条)一起进行比较分析。结果显示:ITS 序列长度在小球藻种内高度保守,在种间变异较大;而 *rbcL* 序列长度在种间和种内水平都高度保守。15 株小球藻 ITS 序列间遗传距离在 0.000~0.663 之间;而 15 株小球藻 *rbcL* 序列间距离在 0.000~0.216 之间。6 株实验藻中原始小球藻 F-2 与蛋白核小球藻 F-5、F-9 近似种内关系;蛋白核小球藻 820 与普通小球藻 Cvq 亲缘关系极近;椭圆小球藻 Ce 与其它 5 株小球藻亲缘关系最远。研究表明将变异程度较高的核 ITS 序列与相对保守的叶绿体 *rbcL* 基因相结合可以用于小球藻系统发生分析和分子鉴定。

关键词:小球藻;内转录间隔区;*rbcL* 基因;遗传距离;种间关系;种内关系

中图分类号:Q 781

文献标识码:A

小球藻(*Chlorella*)是绿藻门(Chlorophyta)、Trebouxiophyceae 纲(小部分属于绿藻纲,Chlorophyceae)的一类单细胞微藻。小球藻富含蛋白质、脂类、多糖和小球藻生长因子等成分,具有很高的营养价值,是优质的人类健康食品和水产生物饵料;并且小球藻生长繁殖迅速,可异养培养。因此在医药、化工、食品、环境和生态等领域都具有广泛的应用。目前世界上已知小球藻有十多个种,广泛分布在各种生态环境中,甚至在极酸性环境(如 pH < 3)中都可以分离到小球藻类似种^[1]。由于生态环境的多样,小球藻具有上百个变种,它们的形态和生理生化特征往往具有较大的差别。

关于小球藻的分子系统学研究,目前国内报道很少。国外多用核 rDNA 小亚基(18S rDNA)和 rDNA 大小亚基内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)等序列,对小球藻进行系统学分析与种的鉴定^[2-6]。如 Huss 等^[2]结合生理生化、超微结构和分子生物学方法进行小球藻

系统发生关系的分析,把小球藻分为 Trebouxiophyceae 和 Chlorophyceae 两个纲,又把 Trebouxiophyceae 纲中的小球藻划分成两个类群。Müller 等^[6]用核 rDNA ITS 和 AFLP(扩增片段长度多态性)对来自 5 个藻种中心的 20 多株普通小球藻(*C. vulgaris*)的基因型和基因组差异进行分析,两种方法得出了基本一致的结果。

在藻类分子系统学研究中,核 rDNA ITS 和叶绿体 *rbcL* 基因是应用广泛的两类序列^[7-9]。其中,ITS 序列包括 ITS1、5.8S rDNA 和 ITS2 3 个部分,而 *rbcL* 基因为卡尔文循环关键酶 Rubisco(核酮糖-1,5-二磷酸羧化/加氧酶)大亚基的编码序列,两者分别适合较低和较高分类阶元的系统发生关系分析^[10-11]。本文依据这两类序列,对来自 4 个种的 6 株小球藻与 GenBank 中相关代表性小球藻序列一起进行比较和分析,以从分子水平上阐明小球藻种间和种内基因间的遗传差异,为品系繁多的小球藻的鉴定和区分提供更多的信息。

收稿日期:2008-04-01 修回日期:2008-05-06

资助项目:国家自然科学基金(30700610);浙江省教育厅项目(20040899);宁波市自然科学基金项目(2006A610084)

通讯作者:孙 雪, E-mail: sunxue@nbu.edu.cn

1 材料与amp;方法

1.1 材料

藻种与培养 实验所用6株小球藻的信息见表1。除了蛋白核小球藻820和普通小球藻Cvq为海水种外,其它均为淡水种。培养基为MAV3号培养基,培养温度为25℃,光照强度为3 000 lx,光暗周期为12L:12D。

试剂与引物 DNA提取用上海生工的UNIQ-10柱式细菌基因组DNA抽提试剂盒,PCR产物回收用BioSpin Gel Extraction试剂盒

(购自杭州昊天)。细菌*E. coli* JM109购自北京微生物研究所,载体pMD 18-T和PCR试剂等购自大连宝生物。引物设计根据小球藻相关序列用Clustal X 1.8软件分析获得。ITS扩增引物分别为正向引物:5'-TTTCCGTAGGTGAACCTGCG GAAG-3';反向引物:5'-TTAAGTTCAGCGGGTGTCTTGCC-3'。*rbcL*扩增引物分别为正向引物:5'-ATGKCTCCACAACTGAAACTAR-3';反向引物:5'-TTAAAGAGTATCGATWGTTCGAA-3'。引物交由上海生工合成,测序在上海生工和上海捷瑞公司完成。

表1 6株小球藻的名称、来源及产地

Tab.1 The names, sources and localities of 6 *Chlorella* strains

小球藻名称 <i>Chlorella</i>	藻种来源 algae sources	原产地 original localities
蛋白核小球藻 F-5 <i>C. pyrenoidosa</i> F-5	中科院武汉水生所 Institute of Hydrobiology, CAS	美国 USA
蛋白核小球藻 F-9 <i>C. pyrenoidosa</i> F-9	中科院武汉水生所 Institute of Hydrobiology, CAS	中国 China
蛋白核小球藻 820 <i>C. pyrenoidosa</i> 820	宁波大学 Ningbo University	美国 USA
原始小球藻 F-2 <i>C. protothecoides</i> F-2	中科院武汉水生所 Institute of Hydrobiology, CAS	捷克布拉格大学 Charles University in Prague, Czech
普通小球藻 Cvq <i>C. vulgaris</i> Cvq	宁波大学 Ningbo University	中国青岛 Qingdao, China
椭圆小球藻 Ce <i>C. ellipsoidea</i> Ce	宁波大学 Ningbo University	中国北京 Beijing, China

1.2 方法

DNA提取 离心收集对数期小球藻2 mL,按试剂盒的说明进行基因组DNA提取,所得DNA溶于30 mL洗脱液中。

PCR扩增与电泳 PCR反应(Biometra PCR仪中)体积为20 μL,其中模板DNA 2 μL, Mg²⁺浓度为1.5 mmol/L, dNTP浓度为0.2 mmol/L,引物浓度为0.2 μmol/L, *Taq*酶1单位。PCR扩增程序为94℃预变性5 min,接着按94℃变性50 s,50℃复性1 min,72℃延伸1.5 min的程序进行30个循环,最后72℃延伸8 min。PCR产物在1.2%的琼脂糖凝胶上电泳,紫外透射分析仪上观察结果。

产物回收、克隆与测序 胶回收后的PCR产物与pMD 18-T载体连接后转化感受态*E. coli* JM109。挑选转化菌落进行PCR检测,再将扩大培养后的重组菌落送去测序。

数据分析 用Mega 3.1软件对所得序列

进行对齐、距离值计算和系统树构建。

2 结果与分析

2.1 小球藻ITS和*rbcL*序列长度分析

实验用一对ITS引物分别位于小球藻核rDNA小亚基3'端和大亚基5'端,因此获得的ITS序列包含了完整的ITS1、5.8S rDNA和ITS2。将所测得的5条小球藻序列(其GenBank登录号见表2,普通小球藻Cvq由于结构原因仅测得完整ITS1和部分5.8S rDNA)与从GenBank下载的小球藻(仅选用部分代表性序列)进行ITS序列长度分析(表2)。

从表2可看出,不同种小球藻ITS长度在648 bp到703 bp间变动,其中5.8S rDNA最为保守(159 bp),而ITS1和ITS2变化较大。其中普通小球藻(序号1~5)表现了较高的种内保守性,而CBS15-2075和CCAP 211/11F(序号分别为6和7)的ITS1和ITS2长度比普通小球藻要短,

因此 Müller 等^[6]推断它们可能不属于普通小球藻。而本研究中蛋白核小球藻 F-5、F-9 的 ITS1 和 ITS2 长度(分别为 255 bp 和 234 bp)与原始小球藻 F-2 完全相同,但与同种的蛋白核小球藻 820(其 ITS1 和 ITS2 分别为 264 bp 和 280 bp)相差较大。因此,从 ITS 长度上推测,820 可能不属于蛋白核小球藻,而原始小球藻 F-2 则与蛋白核小球藻关系很近。普通小球藻 Cvq 的 ITS1 序列长度为 266 bp(表 2 未列出),与 Müller 等^[6]标准普通小球藻(291 或 290 bp)相差较大,但与蛋白核

小球藻 820 和 *C. vulgaris* CCAP 211/11F(Müller 等^[6]认为不属于普通小球藻)相近。由于 GenBank 数据库中除了普通小球藻外极少有其它小球藻完整 ITS 信息(3 株小球藻 *C. saccharophila* ITS2 与 28S rDNA 序列界限不明显),因此尚无法把它们进行正确的归类。

本实验共扩增得到 6 株小球藻 *rbcL* 完整编码序列(其 GenBank 登录号见表 4 的表注),它们在长度上高度保守(1 428 bp),分别编码 475 个氨基酸。

表 2 15 株小球藻 ITS 序列长度比较

Tab. 2 The length of ITS sequences of 15 *Chlorella* strains

序号 No.	小球藻 <i>Chlorella</i>	GenBank 登录号 GenBank accession	ITS1 (bp)	5.8S (bp)	ITS2 (bp)	全长(bp) total length
1	<i>C. vulgaris</i> CCALA 268	AY591496	291	159	245	695
2	<i>C. vulgaris</i> SAG 2. 80	AY591495	291	159	245	695
3	<i>C. vulgaris</i> SAG 211 - 8m	AY591494	291	159	245	695
4	<i>C. vulgaris</i> CCALA 262	AY591513	290	159	245	694
5	<i>C. vulgaris</i>	AB162910	291	159	> 242	> 692
6	<i>C. vulgaris</i> CCAP 211/11F	AY591514	262	159	235	656
7	<i>C. vulgaris</i> CBS15 - 2075	AY948419	248	159	246	648
8	<i>C. pyrenoidosa</i> F-5	EU038288	255	159	234	648
9	<i>C. pyrenoidosa</i> F-9	EU038289	255	159	234	648
10	<i>C. pyrenoidosa</i> 820	EU038290	264	159	280	703
11	<i>C. protothecoides</i> F-2	EU038291	255	159	234	648
12	<i>C. ellipsoidea</i> Ce	EU038292	287	159	211	657
13	<i>C. saccharophila</i> UTEX 2911	EF120782	286	159	—	—
14	<i>C. saccharophila</i> UTEX 247	EF120783	288	159	—	—
15	<i>C. saccharophila</i> UTEX 2469	EF120784	> 282	159	—	—

注:“—”表示序列长度不确定

Notes: “—” indicated the length of the sequence was uncertain

2.2 小球藻 ITS 序列计算的遗传距离

将实验测定的 5 条小球藻完整 ITS 序列与从 GenBank 下载的 10 条小球藻的 ITS 序列一起进行排序和比对,并用 Mega 3.1 软件对各序列间遗传距离进行计算(表 3)。表 3 中,15 株小球藻根据 ITS 序列计算的遗传距离在 0.000 ~ 0.663。按照距离值从小到大可分成 3 类。第一类包括两个距离最小组,5 株普通小球藻(序号为 1 ~ 5,其两两间的距离在 0.000 ~ 0.002)和本实验所测 3 株小球藻(序号为 8、9、11,其两两间距离为 0.004 ~ 0.007)。第二类为距离最大组,即 4 株小球藻(椭圆小球藻 Ce 和 3 株 *C. saccharophila*,序号为 12 ~ 15)与其它 11 株小球藻之间的距离最大(0.581 ~ 0.663)。第三类,即除了以上两类外其

它小球藻两两间的距离,该距离值介于一类和二类之间(0.030 ~ 0.329)。

此距离值的分布说明了 3 个问题:(1)ITS 序列在 5 株普通小球藻种内极为保守,相似性达到 99% 以上;而 Müller 等^[6]认为不属于普通小球藻的 CBS15 - 2075 和 CCAP 211/11F 与这 5 株小球藻的距离分别约为 0.33 和 0.19。(2)原始小球藻 F-2 与两株蛋白核小球藻 F-5、F-9 的相似性高达 99% 以上,近似种内关系。(3)本实验所测的椭圆小球藻 Ce 与 3 株小球藻 *C. saccharophila* 的关系接近种内关系,如 3 株 *C. saccharophila* 种内 ITS 距离在 0.055 ~ 0.114,而 Ce 与它们三者间的距离在 0.030 ~ 0.116。

表3 15株小球藻 ITS 序列的遗传距离
Tab.3 The genetic distances calculated using the ITS sequences of 15 *Chlorella* strains

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1															
2	0.000														
3	0.002	0.002													
4	0.000	0.000	0.002												
5	0.000	0.000	0.002	0.000											
6	0.198	0.198	0.196	0.198	0.198										
7	0.329	0.329	0.326	0.329	0.329	0.267									
8	0.259	0.259	0.256	0.259	0.259	0.195	0.323								
9	0.256	0.256	0.254	0.256	0.256	0.192	0.317	0.007							
10	0.311	0.311	0.308	0.311	0.311	0.284	0.185	0.301	0.301						
11	0.259	0.259	0.256	0.259	0.259	0.195	0.323	0.007	0.004	0.301					
12	0.615	0.615	0.610	0.615	0.615	0.615	0.622	0.639	0.635	0.612	0.640				
13	0.614	0.614	0.610	0.614	0.614	0.610	0.626	0.648	0.644	0.610	0.649	0.053			
14	0.602	0.602	0.598	0.602	0.602	0.615	0.602	0.643	0.639	0.594	0.643	0.030	0.055		
15	0.628	0.628	0.624	0.628	0.628	0.621	0.613	0.662	0.658	0.581	0.663	0.116	0.114	0.091	

注:表中1-15序号所代表的小球藻及其 GenBank 登录号同表2

Notes: The represented *Chlorella* strains by number 1 to 15 and their GenBank accession numbers were the same as those listed in table 2

2.3 小球藻 *rbcL* 序列计算的遗传距离

将本研究中6株小球藻与 GenBank 数据库中有较长 *rbcL* 序列的全部小球藻(共15株)的 *rbcL* 序列一起进行比对,再用 Mega 3.1 软件对各序列间距离进行成对比较(表4)。这15株小球藻分属于7个不同种,它们之间根据 *rbcL* 序列计算的遗传距离为0.000~0.216。其最大距离值比15株小球藻 ITS 序列计算的最大距离(0.663)小得多,可见叶绿体 *rbcL* 基因比核 rDNA ITS 保守性要高。在表4中,距离极小(相似性大于99%以上)的有4组,一是两株普通小球藻(序号为6和7)和两株椭圆小球藻(8、9),这4株小球藻间的距离为0.000~0.004;另一组是蛋白核小球藻 F-5、F-9 与原始小球藻 F-2(10、11、13),其间的距离为0.000~0.003;其余两组分别是 *C. ellipsoidea* UTEX20 和 *C. saccharophila* (3和4,其距离为0.000)、820 和 Cvq(12和14,其距离为0.002)。与 ITS 结果类似,根据 *rbcL* 序列计算的遗传距离也是椭圆小球藻 Ce 与其它5株小球藻间距离最大,而蛋白核小球藻 F-5、F-9 与原始小球藻 F-2 间距离最小。

2.4 小球藻 ITS 系统树构建

根据15条 ITS 序列数据,通过 Mega 3.1 软件中的 NJ 法(neighbor-joining method)构建分子系统树(图1)。自举值 Bootstrap 为1000次重

复。图1中,关系最近的两个小类群(遗传距离在0.01以下):一个由5株普通小球藻构成,另一个由蛋白核小球藻 F-5、F-9 与原始小球藻 F-2 构成。其次距离比较接近(距离在0.1左右)的是椭圆小球藻 Ce 和3株小球藻 *C. saccharophila* 构成的类群。蛋白核小球藻 820 和小球藻 CBS15-2075 先聚类,但如果将普通小球藻 Cvq 不完整的 ITS 序列放到一起构建系统树,Cvq 与 820 最先聚类。

2.5 小球藻 *rbcL* 系统树构建

根据15条 *rbcL* 序列数据,通过 Mega 3.1 软件中的 NJ 法构建分子系统树(图2)。自举值 Bootstrap 为1000次重复。在图2中,关系最近的4个小球藻类群分别是:(1)蛋白核小球藻组,包括本研究中的 F-5、F-9、蛋白核小球藻(AB240145)及原始小球藻 F-2;(2)普通小球藻(SAG 211-11b、C-27)与椭圆小球藻(C-27与 Tamiya);(3)蛋白核小球藻 820 与普通小球藻 Cvq;(4)椭圆小球藻 UTEX20 与小球藻 *C. saccharophila*(AM260446)。以上聚类结果中的第一和第三个与 ITS 分析结果相吻合。在该系统树中,最复杂的是4株椭圆小球藻:Tamiya 株和 C-27 株分布在一个类群中,而 UTEX20 株与 Ce 株则分在其它两个类群中。

Huss 等^[2]用生理、生化、超微结构和分子生

物学技术分析了小球藻类群的系统发生关系。他们认为 *C. vulgaris*、*C. lobophora*、*C. sorokiniana* 和 *C. hessleri* 这 4 个种关系相近(记为类群 I),而“*C. protothecoides* (即 *Auxenochlorella protothecoides*)”、“*C. mirabilis*”、“*C. ellipsoidea*”、

“*C. saccharophila*”和“*C. luteoviridis*”这 5 个种应该属于 *Trebouxiophyceae* 纲的另一类群(记为类群 II),而蛋白核小球藻 *C. pyrenoidosa* 在形态特征上难以鉴定。

表 4 15 株小球藻 *rbcL* 序列距离值的计算
Tab. 4 The genetic distances calculated using the *rbcL* sequences of 15 *Chlorella* strains

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1															
2	0.191														
3	0.161	0.216													
4	0.161	0.216	0.000												
5	0.063	0.190	0.152	0.152											
6	0.066	0.189	0.156	0.156	0.061										
7	0.069	0.193	0.160	0.160	0.063	0.004									
8	0.069	0.193	0.160	0.160	0.063	0.004	0.000								
9	0.069	0.193	0.160	0.160	0.063	0.004	0.000	0.000							
10	0.063	0.191	0.154	0.154	0.011	0.065	0.067	0.067	0.067						
11	0.060	0.188	0.152	0.152	0.008	0.062	0.064	0.064	0.064	0.003					
12	0.109	0.182	0.141	0.141	0.096	0.099	0.103	0.103	0.103	0.099	0.095				
13	0.060	0.188	0.152	0.152	0.008	0.062	0.064	0.064	0.064	0.003	0.000	0.095			
14	0.107	0.180	0.138	0.138	0.094	0.096	0.101	0.101	0.101	0.096	0.093	0.002	0.093		
15	0.171	0.168	0.201	0.201	0.178	0.173	0.178	0.178	0.178	0.182	0.178	0.177	0.178	0.174	

注:表中各序号所代表的小球藻及其 GenBank 登录号:1、*C. sorokiniana*(EF113429),2、*C. luteoviridis*(EF113428),3、椭圆小球藻 UTEX20(EF113427),4、*C. saccharophila*(AM260446),5、蛋白核小球藻 *C. pyrenoidosa*(AB240145),6、普通小球藻 SAG 211-11b(AF499684),7、普通小球藻 C-27(NC001865),8、椭圆小球藻 C-27(D10997),9、椭圆小球藻 *Tamiya*(M20655),10、蛋白核小球藻 F-5(EU038282),11、蛋白核小球藻 F-9(EU038283),12、蛋白核小球藻 820(EU038284),13、原始小球藻 F-2(EU038285),14、普通小球藻 Cvq(EU038286),15、椭圆小球藻 Ce(EU038287)

Notes: The represented *Chlorella* strains by number 1 to 15 and their GenBank accession number: 1. *C. sorokiniana* (EF113429), 2. *C. luteoviridis* (EF113428), 3. *C. ellipsoidea* UTEX20 (EF113427), 4. *C. saccharophila* (AM260446), 5. *C. pyrenoidosa* (AB240145), 6. *C. vulgaris* SAG 211-11b (AF499684), 7. *C. vulgaris* C-27 (NC001865), 8. *C. ellipsoidea* C-27 (D10997), 9. *C. ellipsoidea* *Tamiya* (M20655), 10. *C. pyrenoidosa* F-5 (EU038282), 11. *C. pyrenoidosa* F-9 (EU038283), 12. *C. pyrenoidosa* 820 (EU038284), 13. *C. protothecoides* F-2 (EU038285), 14. *C. vulgaris* Cvq (EU038286), 15. *C. ellipsoidea* Ce (EU038287)

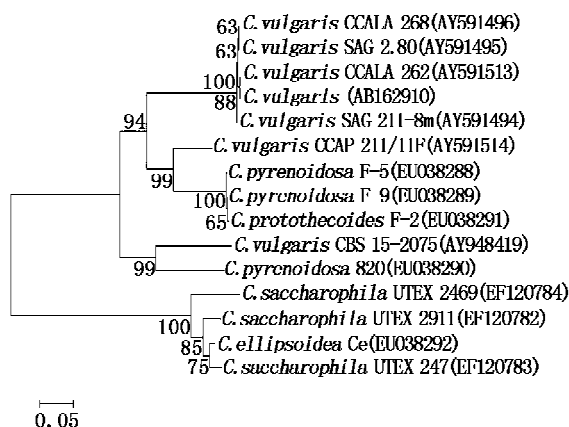


图 1 基于 15 株小球藻 ITS 序列通过邻接法构建的分子系统树

Fig. 1 The molecular phylogenetic tree constructed by the neighbor-joining method based on the ITS sequences of 15 *Chlorella* strains

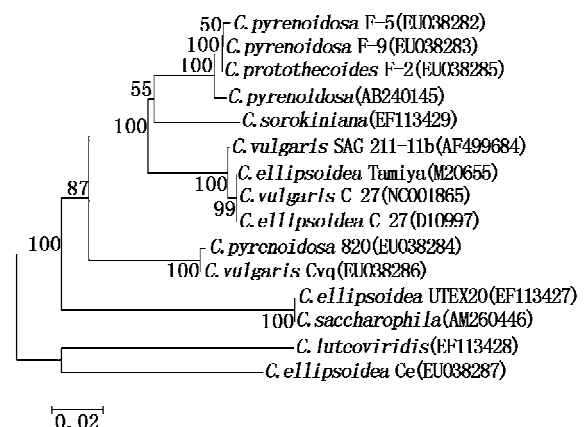


图 2 基于 15 株小球藻 *rbcL* 序列通过邻接法构建的分子系统树

Fig. 2 The molecular phylogenetic tree constructed by the neighbor-joining method based on the *rbcL* sequences of 15 *Chlorella* strains

本文所建 *rbcL* 系统树基本上符合 Huss 等^[4] 的分类,如类群 I 的 *C. vulgaris* 和 *C. sorokiniana* 聚在一起,而类群 II 的“*C. ellipsoidea*”、“*C. saccharophila*”、“*C. luteoviridis*”分布在它们的外围。并且仅从该系统树看来,蛋白核小球藻可能应归于 Huss 等分类的类群 I 中。但该系统树也有和 Huss 等分类不一致的,如属于类群 II 的“*C. protothecoides* F-2 和两株“*C. ellipsoidea*”(C-27 与 Tamiya)与类群 I 小球藻聚在一起。其原因可能是所用藻株与 Huss 等^[4]用藻株存在一定的差异有关。

3 讨论

分子生物学技术为解决生物多样性及物种间的基因变异等问题提供了许多有力的手段。许多基因位点如核 rDNA 大小亚基(LSU 和 SSU)及其内转录间隔区(ITS)等^[12],以及叶绿体基因组功能蛋白的编码基因如 *rbcL*、*psaA* 和 *psbA* 等及其侧向间隔序列在高等植物和藻类系统分类与分子鉴定等研究中得到了广泛的应用^[13]。其中,核 rDNA ITS1 和 ITS2 序列进化速率相对较快并具有长度和序列上的高度变异性,被公认为是生物类群属下种间水平甚至种内水平比较研究中的较好指标。陈月琴等^[14]比较发现藻类中种间 ITS 核苷酸差异值一般大于 14%,尤其单细胞藻类的差异值一般要大于 20%,而 *rbcL* 基因由于功能的限制在进化上较为保守,常用于较高级别分类阶元的系统发生研究^[7]。本研究中所测 5 株小球藻 ITS 序列不仅长度变化较大(从 648 bp 到 703 bp),而且序列间的遗传距离在 0.004 ~ 0.640。相对而言,6 株小球藻 *rbcL* 序列不仅在长度上极为保守(均为 1 428 bp),而且序列间的遗传距离在 0.000 ~ 0.182,远小于 ITS 序列,充分证明了 *rbcL* 序列的保守性和 ITS 序列的变异性。

本研究用 ITS 和 *rbcL* 两类序列对 6 株小球藻的种间和种内关系进行了比较,得出了基本一致的 3 个结果:(1)原始小球藻 F-2 与两株不同产地的蛋白核小球藻 F-5、F-9 的种间关系近乎种内关系;(2)蛋白核小球藻 820 与普通小球藻 Cvq 的关系很近;(3)椭圆小球藻 Ce 与其它 5 株小球藻间的距离最远。该结果与用另一叶绿体蛋白编码基因 *psbA* 进行的分析结果一致(资料未发表)。

由于小球藻品系繁多,定名的标准不大统一,

并且目前已测序小球藻 ITS 和 *rbcL* 序列较少,特别是 ITS 序列,数据库中几乎全是普通小球藻的,尚无法建立起系统的分类体系。相信随着更多小球藻 ITS 和 *rbcL* 序列的递交,并与其它分子生物学指标及形态学、超微结构、生理生化等特征相结合,将会更加有助于目前小球藻的分类与鉴定。

参考文献:

- [1] Huss V A R, Ciniglia C, Cennamo P, et al. Phylogenetic relationships and taxonomic position of *Chlorella*-like isolates from low pH environments (pH <3.0) [J]. BMC Evolutionary Biology, 2002, 2: 13 (doi:10.1186/1471-2148-2-13.)
- [2] Huss V A R, Frank C, Hartmann E C, et al. Biochemical taxonomy and molecular phylogeny of the genus *Chlorella* sensu lato (Chlorophyta) [J]. J Phycol, 1999, 35: 587-598.
- [3] Cozzolino S, Campo I, Moretti M A, et al. The use of nuclear ribosomal ITS1 DNA sequences for the identification of *Chlorella* strains [J]. Algological Studies, 1999, 95: 31-42.
- [4] Huss V A R, Sogin M L. Phylogenetic position of some *Chlorella* species within the Chlorococcales based upon complete small-subunit ribosomal RNA sequences [J]. J Mol Evol, 1990, 31: 432-442.
- [5] Wu H L, Hseu R S, Lin L P. Identification of *Chlorella* spp. isolates using ribosomal DNA sequences [J]. Bot Bull Acad Sin, 2001, 42: 115-121.
- [6] Müller J, Friedl T, Hepperle D, et al. Distinction between multiple isolates of *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae) and testing for conspecificity using amplified fragment length polymorphism and its rDNA sequences [J]. J Phycol, 2005, 41: 1236-1247.
- [7] Daugbjerg N, Andersen R A. Phylogenetic analysis of the *rbcL* sequences from Haptophytes and Heterokont algae suggest their chloroplasts are unrelated [J]. Mol Biol Evol, 1997, 14(12): 1242-1251.
- [8] Andersen R A, Bailey J C. Phylogenetic analysis of 32 strains of *Vaucheria* (Xanthophyceae) using the *rbcL* gene and ITS two flanking space regions [J]. J Phycol, 2002, 38: 583-592.
- [9] Yang E C, Boo S M. Evidence for two independent lineages of *Griffithsia* (Ceramiaceae,

- Rhodophyta) based on plastid protein-coding *psaA*, *psbA*, and *rbcl* gene sequences [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2004, 31(2): 680 – 688.
- [10] 李学营,彭建营,白瑞霞. 基于核 rDNA 的 ITS 序列在种子植物系统发育研究中的应用 [J]. *西北植物学报*, 2005, 25 (4): 829 – 834.
- [11] 李春香,陆树刚. 鳞毛蕨科植物的系统发育:叶绿体 *rbcl* 序列的证据 [J]. *植物分类学报*, 2006, 44 (5): 503 – 515.
- [12] 庄 丽,陈月琴,李钦亮,等. 赤潮叉角藻 18S rDNA 和 ITS 区序列测定与分析 [J]. *海洋与湖沼*, 2001, 32 (2): 148 – 154.
- [13] Maistro S, Broady P A, Andreoli C, *et al.* Molecular phylogeny and evolution of the order Tribonematales (Heterokonta, Xanthophyceae) based on analysis of plastidial genes *rbcl* and *psaA* [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2007, 43 (2): 407 – 417.
- [14] 陈月琴,屈良鹤. 海洋亚历山大藻种间界定的分子标准 [J]. *中山大学学报*, 1999, 38 (1): 7 – 11.

Molecular identification of *Chlorella* strains based on sequence analysis of nuclear rDNA ITS and chloroplast *rbcl* gene

SUN Xue, WU Xiao-wei, LI Xing-wen, PEI Lu-qing

(Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology of Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: *Chlorella* is one of the most important economically unicellular green algae, but its hundreds of varieties make it difficult to be distinguished based only on the morphological, physiological and biochemical features. To analyze the interspecies and intraspecies relationships and genetic variation of *Chlorella* species, two kinds of molecular markers were applied. One was the internal transcribed spacer (ITS) of nuclear rDNA and the other was the chloroplast *rbcl* gene encoding ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit. The 6 *Chlorella* strains studied included *C. pyrenoidosa* F-5, F-9, 820, *C. protothecoides* F-2, *C. vulgaris* Cvq and *C. ellipsoidea* Ce. In addition to sequences retrieved from GenBank, a total 15 ITS and 15 *rbcl* sequences were carried out by sequence comparison, genetic distance calculation and phylogenetic tree construction, respectively. Results showed that the length of ITS region was almost the same among species intrasections, but the length of ITS1 and ITS2 varied significantly between species. However, the length of *rbcl* sequence was always conservative at inter- and intraspecies levels. The genetic distances of 15 ITS sequences ranged from 0.000 to 0.663, and those of 15 *rbcl* sequences varied from 0.000 to 0.216. The phylogenetic relationships among the 6 *Chlorella* strains drawn by ITS and *rbcl* were as follows: First, *C. protothecoides* F-2 showed very close relationship with *C. pyrenoidosa* F-5 and F-9. Second, *C. pyrenoidosa* 820 clustered closely with *C. vulgaris* Cvq. Third, *C. ellipsoidea* Ce showed the farthest distance with the other five *Chlorella* strains. This paper indicated that phylogenetic analysis and molecular identification of the genus *Chlorella* could be validated based on the combination of the highly variable ITS sequence and the relatively conservative chloroplast *rbcl* gene.

Key words: *Chlorella*; ITS; *rbcl*; genetic distance; interspecies relationship; intraspecies relationship