

香榧绿藻的生物学特性及物种鉴定

叶晓明, 钱宇汀, 叶雯, 沈黄莹, 曾燕如, 喻卫武, 戴文圣

(浙江农林大学 省部共建亚热带森林培育国家重点实验室, 浙江 杭州 311300)

摘要: 香榧绿藻 *Chlorella* sp. 是一种附着在香榧 *Torreya grandis* ‘Merrillii’ 枝、叶上的藻类。为探明香榧绿藻的种属类别及亲缘关系, 探究香榧绿藻的生物学特性, 以 3 个不同地区的香榧树上采集的香榧绿藻为试验对象, 通过室内培养, 观察香榧绿藻的形态特征及生活习性, 提取香榧绿藻 DNA 并进行 18S rDNA 序列和内转录间隔区(ITS)基因序列特异性扩增, 最终序列进行 BLAST 比对, 绘制系统进化树。结果表明: 香榧绿藻由 A 组和 B 组 2 种不同形态的绿藻组成, 不同地区香榧绿藻形态存在差异, 但主要以 A 组形态绿藻为主。根据形态学鉴定结果表明: A 组香榧绿藻与引起番茄绿藻病的椭圆小球藻 *Chlorella ellipsoidea* 形态相近, B 组香榧绿藻与引起黄瓜绿藻病的丝藻 *Ulothrix* sp. 形态相近; 但香榧绿藻对 pH 值的反应规律与斜生栅藻 *Scenedesmus obliquus* 相近。通过序列比对发现, 2 种形态的香榧绿藻的 18S rDNA 和 ITS 区基因序列也与栅藻科 *Scenedesmus* 的 *Asterarcys quadricellulare* 的同源性高, 相似率达 100%。结合传统形态学方法和分子生物学技术, 将 A 组香榧绿藻初步鉴定为栅藻科的 *Asterarcys quadricellulare*, B 组香榧绿藻为其变种, 且 2 组香榧绿藻与同属于栅藻科的 *Scenedesmus* sp. SM15_4(KT778094.1) 的 ITS 区基因序列相同。香榧绿藻具有较好的耐碱性, 生长周期长且不容易腐烂。这些生物学特性赋予香榧绿藻在香榧树上长期寄生的能力。图 7 参 37

关键词: 森林保护学; 香榧; 香榧绿藻; 形态学观察; 系统进化树; 栅藻科

中图分类号: S722.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-0756(2019)04-0629-09

Biological characteristics and species identification of *Chlorella* sp. with *Torreya grandis* ‘Merrillii’

YE Xiaoming, QIAN Yuting, YE Wen, SHEN Huangying, ZENG Yanru, YU Weiwu, DAI Wensheng

(State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

Abstract: *Chlorella* sp. is an algal attached to the branches and leaves of *Torreya grandis* ‘Merrillii’. To explore the relationship the *Chlorella* sp. to *Torreya grandis* ‘Merrillii’ and to study the biological characteristics of the *Chlorella* sp., the *Chlorella* sp. was collected from *T. grandis* ‘Merrillii’ trees in three different regions and tested. According to an indoor culture, the morphological characteristics and living habits of the *Chlorella* sp. were observed, and the DNA of the *Chlorella* sp. extracted had a sequence specific amplification of 18S rDNA. An Internal Transcribed Spacer (ITS) gene sequence was also performed. The final sequence was aligned with the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) to draw a phylogenetic tree in neighbor-joining (NJ) method with three replications. Results showed two different forms of green algae, A and B. There were differences in the species of green algae in different areas, but they were mainly in the form of the A-type green algae. According to morphological identification results, the A-type *Chlorella* sp. was similar to the morphology of *Chlorella ellipsoidea* which could cause tomato green algae disease; the B-type *Chlorella* sp. was similar to the morphology of *Ulothrix* sp. which could cause cucumber green algae disease. However, the response of *Chlorella* sp. to pH was similar to that of *Scenedesmus obliquus*. The sequence alignment showed that the 18S rDNA

收稿日期: 2018-08-28; 修回日期: 2018-11-21

基金项目: 浙江省科学技术重点研发计划项目(2016C02052-12); 中央财政林业科技推广示范项目(2016TS02)

作者简介: 叶晓明, 从事经济林木发育与栽培生理研究。E-mail: 784082372@qq.com。通信作者: 戴文圣, 教授, 博士, 从事经济林木良种选育与栽培生理、生态研究。E-mail: dai_wensheng@163.com

and ITS gene sequences of the two forms of *Chlorella* sp. also had a high homology with *Asterarcys quadricellulare* of the Scenedesmaceae family with the similarity rate being 100%. Combining traditional morphological methods and molecular biology techniques, group A *Chlorella* sp. was identified as *Asterarcys quadricellulare* of the Scenedesmaceae family and group B *Chlorella* sp. identified as its variant. The two groups of *Chlorella* sp. had the same ITS region gene sequence as *Scenedesmus* sp. SM15_4 (KT778094.1) belonging to the Scenedesmaceae family. In conclusion, *Chlorella* sp. had favorable biological properties such as alkali resistance, a long growth cycle, and resistance to decay which helped it live on the *Torreya grandis* ‘Merrillii’ tree for a long time. [Ch, 7 fig. 37 ref.]

Key words: forest protection; *Torreya grandis* ‘Merrillii’; *Chlorella* sp.; morphological observation; phylogenetic tree; Scenedesmaceae family

香榧 *Torreya grandis* ‘Merrillii’ 是红豆杉科 Taxaceae 榧树 *Torreya grandis* 的优良变异类型, 经人工选育后嫁接繁殖栽培的优良品种, 也是目前榧树中唯一进行人工规模栽培的品种^[1-2]。它集果用、油用、药用、材用和绿化观赏为一体, 经济价值非常高^[3], 老产区在浙江会稽山区的诸暨、柯桥、嵊州、东阳和磐安等 5 县(市、区), 分布范围狭窄, 产量极其有限, 产品供不应求。全国 10 余个省(市、自治区)均在引种栽植^[4]。近年来, 随着香榧产业的发展, 香榧绿藻病害日趋严重, 给榧农造成重大经济损失, 尤其是人工林中, 其对香榧叶片的光合作用产生极大影响并造成落花落果, 甚至导致香榧树死亡, 逐渐引起了榧农的重视。吾中良等^[4]首次报道了香榧绿藻病害。香榧绿藻 *Chlorella* sp. 为小球藻属 *Chlorella* 的变异类型, 是附着在榧树枝和叶上形成表面粗糙的灰绿色苔状物^[5], 因病原归属于绿藻门 Chlorophyta, 且在香榧枝叶上分布较多, 生产上一般称之为香榧绿藻, 但也有研究者认为其是青苔(moss)和地衣(lichens)^[6]。专家学者对其防治方法进行了研究^[5,7], 但研究仍处于起步阶段, 其危害机理尚不明确, 病原种类也尚无定论。本研究结合传统形态学方法和分子生物学技术, 通过对香榧绿藻的培养观察及 18S rDNA 和内转录间隔区(ITS)基因序列分析, 探索了香榧绿藻的生活习性, 初步鉴定了香榧绿藻的种属类别, 为香榧绿藻的综合防治和香榧产业的健康发展提供新的思路。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1.1.1 香榧绿藻 2017 年 7 月中旬, 在浙江省杭州市临安区、安徽省黄山市和浙江省诸暨市 3 个地区分别采集患有香榧绿藻病的香榧叶片, 密封带回实验室, 用灭菌后的小刀片从患病叶片上刮取香榧绿藻混合物用于离体培养。

1.1.2 供试培养基 绿藻的培养采用 SE 液/固体培养基^[8], 其中液体培养基配方主要成分如下: 硝酸钠 250 mg·L⁻¹, 三水磷酸氢二钾 75 mg·L⁻¹, 七水硫酸镁 75 mg·L⁻¹, 二水氯化钙 25 mg·L⁻¹, 磷酸二氢钾 175 mg·L⁻¹, 氯化钠 25 mg·L⁻¹, 六水合三氯化铁 5 mg·L⁻¹, A5 处理液 1.000 g·L⁻¹(主要包括硼酸 2.860 g·L⁻¹, 四水氯化锰 1.810 g·L⁻¹, 七水硫酸锌 0.220 g·L⁻¹, 五水硫酸铜 0.079 g·L⁻¹, 四水合钼氨酸 0.390 g·L⁻¹)和 Fe-EDTA 处理液 1.000 g·L⁻¹(包括乙二胺四乙酸钠 10.000 g·L⁻¹和六水合三氯化铁 0.810 g·L⁻¹)^[9]。配制好的液体培养基自然 pH 值为(6.70±0.05), 在 1 L 液体培养基中加入 1.500 g 琼脂糖, 经高温灭菌(121 °C, 30 min)冷凝后形成 SE 固体培养基。

1.2 试验方法

1.2.1 绿藻的混合培养 取少量香榧绿藻混合物, 置于盛有 100 mL SE 液体培养基的三角瓶中静置培养, 温度(23±2) °C, 光照强度为 6 000 lx(120 μmol·m⁻²·s⁻¹), 24 h 持续光照, 培养 2 周^[10]。

1.2.2 绿藻的分离纯化培养 采用平板划线分离法将混合培养后的香榧绿藻接种在 SE 固体培养基上, 继续培养 1 周后, 根据藻体的形态特征将不同形态的绿藻用接种针取出, 分别培养于 SE 液体培养基中, 并进行放大培养进一步纯化, 直至各组培养液中只有一种形态的绿藻, 获得 A 和 B 组 2 组香榧绿藻, 定期观察藻液, 并用荧光显微镜拍照记录。

1.2.3 香榧绿藻生长曲线的绘制 从 A 和 B 组香榧绿藻培养液中取 1~2 滴处于对数增长期的藻液, 分

别置于盛有 100 mL 灭菌 SE 液体培养基的三角瓶中，在温度为 $(23 \pm 2)^\circ\text{C}$ ，光照强度为 $6\,000\text{ lx}$ ($120\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)，24 h 持续光照的培养室中，静置培养 1 个月，做 3 个重复。每天早晚将培养瓶震动 1 次，防止藻细胞贴壁生长，且每隔 2 d 在紫外分光光度计 680 nm ^[11]下测定光密度。

1.2.4 pH 值对香榧绿藻生长的影响 从 A 和 B 组香榧绿藻培养液中分别取 1~2 滴对数增长期的藻液，加入 pH 值为 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0(用 $0.1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸和 $0.1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠调节)的 SE 液体培养基中，原培养基(自然 pH 值)为对照组，培养 3 周，做 3 个重复，且每隔 2 d 在紫外分光光度计 680 nm 下测定吸光度^[10]。

1.2.5 18S rDNA 序列获取 ①香榧绿藻 DNA 的提取。取 100 mL 对数生长期的藻液，分装至 50 mL 离心管中， $6\,000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min，弃上清，收集的藻体研磨后用 TaKaRa MiniBEST Plant Genomic DNA Extraction Kit(编码 9768)试剂盒提取基因组 DNA。②引物合成。用于真核绿藻 18S rRNA 基因的上游引物 MA1 ($5'-\text{CGGGATCCGTAGTCATATGCTTGTCTC}-3'$)和下游引物 MA2 ($5'-\text{CGGAATTCCTTCTGCAGGTTACCC}-3'$)，由上海生工生物技术有限公司进行合成。③PCR 扩增。以香榧绿藻样品的基因组 DNA 为模板，对香榧绿藻 18S rDNA 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 $50\ \mu\text{L}$ ，包括：双蒸水 $21\ \mu\text{L}$ ，上下引物各 $1\ \mu\text{L}$ ，DNA 模板 $1\ \mu\text{L}$ ， $2\times\text{Gflex PCR 缓冲液}$ (镁离子, dNTP plus) $25\ \mu\text{L}$ ，Tks Gflex DNA Polymerase($1.25\times 16.67\ \text{nkatal}\cdot\text{L}^{-1}$) $1\ \mu\text{L}$ 。PCR 反应条件： 94°C 预变性 1 min； 98°C 变性 10 s， 55°C 退火 15 s， 68°C 延伸 60 s，30 个循环。PCR 产物取 $5\ \mu\text{L}$ 经 $10\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($1\times\text{TAE}$) 琼脂糖凝胶电泳检测后，观察并成像^[12]。扩增产物由大连宝生物工程有限公司(TaKaRa)进行测序。

1.2.6 ITS 序列获取 以香榧绿藻样品的基因组 DNA 为模板，分别以正反向引物对香榧绿藻 ITS 区进行 PCR 扩增，并对 PCR 产物进行测序。香榧绿藻 ITS 正反向引物序列^[13-14]：1800f: ACCTGCGGAAGGATCATT, LR 1850: CCTCACGGTACTTGTTTC 由大连宝生物工程有限公司(TaKaRa)进行合成。PCR 反应体系和反应条件与 18S rDNA 序列获取条件一致。

1.2.7 系统发育树分析 测序结果与美国国立生物技术信息中心(NCBI)已知的数据库进行比较，并用 Genetyx 软件进行多重序列对齐排列，通过 MEGA 7.0 软件邻接(NJ)法绘制系统发育树，基于 Kimura2-Prameter 方法计算遗传距离值，计算 Bootstrap 值，重复 1 000 次^[15]。

2 结果与讨论

2.1 香榧绿藻正置荧光显微镜观察结果

对 3 个不同地点采样的香榧绿藻培养观察发现：香榧绿藻主要由 2 种形态的绿藻构成，按形状、大小等细胞特性将分离纯化的香榧绿藻分为 A 组和 B 组，其形态结构见图 1。临安 and 黄山地区采集的香榧绿藻均由 A 组和 B 组不同形态的绿藻组成，而诸暨地区采集的香榧绿藻只含 A 组形态的绿藻。表明不同地区香榧绿藻的形态不尽相同，但主要以 A 组形态绿藻为主，这可能与当地土壤中的藻类分布有关，因为绿藻主要通过空气中扬尘进行传播^[16]，同时地理位置的差异也会导致藻类形态的多样性^[10]。从生活习性上来看，香榧绿藻属于气生藻 *Luftalgen aerophytische* 类植物的树生藻，与小球藻 *Chlorella sp.* 不同的是其主要在树干以及枝叶表面生长，它们所需要的水分可以从降雨和蒸汽中得到^[17]。

藻类的鉴定方法包括传统形态学方法、生物化学法和分子生物学法。传统形态学方法是通过对藻类

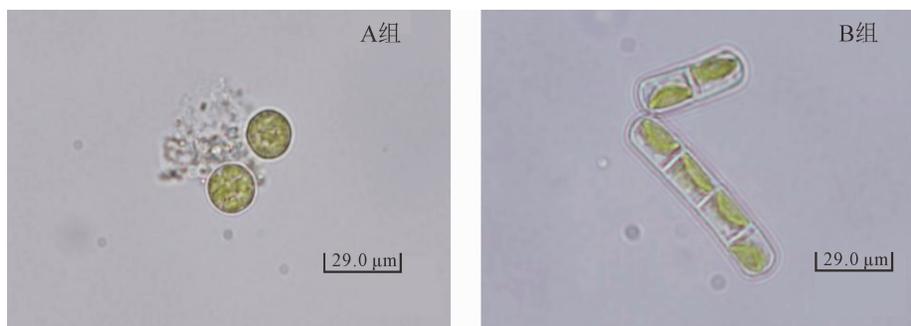


图 1 2 组香榧绿藻的荧光显微镜观察照片

Figure 1 Fluorescence microscopy observation of two groups of *Chlorella sp.*

的培养观察,根据藻体的形状、大小等形态学特征鉴定藻的种类。本研究通过荧光显微镜观察结果显示:A组香榧绿藻为单细胞圆形,直径 $10.36\sim 22.79\ \mu\text{m}$,叶绿体布满整个细胞,细胞壁薄且光滑;非油性,淡绿色单胞,无鞭毛。B组香榧绿藻为单细胞椭圆形或长椭圆形,两端钝圆,长 $21.07\sim 25.21\ \mu\text{m}$,宽 $10.36\sim 12.43\ \mu\text{m}$,叶绿体多位于细胞的一侧;油性,淡绿色,细胞间以单链相连,无分支,基部有一着生细胞,与李润霞等^[18]鉴定的黄瓜绿藻病原丝藻 *Ulothrix* sp.的形态特征基本一致。2组香榧绿藻的形态结构与前人从沙漠和海洋分离纯化的藻种形态不一致^[19-21],应该是树生藻为适应寄生环境形成的特殊形态结构。

2.2 2组香榧绿藻的生长曲线

香榧绿藻生长特性与大部分藻类相似,在培养初期(适应期)藻体生长缓慢,进入对数生长期后,生长速率迅速增加,藻液也由浅绿色变为暗绿色,直到饱和停止增长,进入衰亡期后,藻体逐渐死亡并下沉,藻液颜色开始变黄,最后至无色、腐烂^[10]。由图2可知:A组香榧绿藻的适应期较长,前4 d是适应期,第5天进入对数生长期,第31天进入稳定期;B组香榧绿藻的适应期短,第2天即进入对数生长期,第29天进入稳定期;2组香榧绿藻的混合样H适应期也较短,第3天进入对数生长期,第27天进入稳定期。

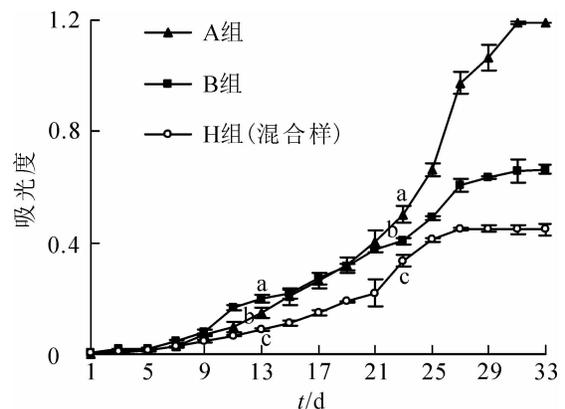
H组为A和B组香榧绿藻的混合样。比较发现:香榧绿藻培养前期生长速率从大到小依次为B组、A组、H组,第9~13天差异显著($P<0.05$);香榧绿藻培养19 d后生长速率从大到小依次为A组、B组、H组,培养23 d时达显著水平($P<0.05$),表明2组香榧绿藻生长期不一致,B组香榧绿藻在生长前期占有优势,而A组香榧绿藻在生长后期占优势,且2组香榧绿藻存在竞争关系,导致2组香榧绿藻混合后生长速率最慢(图2)。通过生长曲线结果可知:2组香榧绿藻均表现出较长的生长周期,1个月内均没有进入衰亡期,因此香榧绿藻在香榧叶上能长期生存下来。

2.3 pH值对香榧绿藻生长的影响

由图3可知:A组香榧绿藻在pH 10.0和pH 11.0的培养基上生长最好,在度过适应期(前5 d)后出现爆发式增长,长势明显优于其他各组,pH 9.0培养基中的A组香榧绿藻在第11天增长速度加快,长势逐渐接近pH 10.0和pH 11.0的香榧绿藻,且pH 6.0的培养基会明显抑制A组香榧绿藻的生长。香榧绿藻的生长速率从大到小依次为pH 11.0、pH 10.0、pH 9.0、pH 8.0、pH 7.0、对照组、pH 6.0。得出A组香榧绿藻最适生长的pH值为11.0,说明A组香榧绿藻适合在碱性环境中生长,酸性环境会抑制A组香榧绿藻的生长。

由图3可知:B组香榧绿藻同样在pH 10.0和pH 11.0的培养基上生长最好,在度过适应期(前3 d)后出现爆发式增长,长势明显优于其他各组,分别在第15天和第13天进入稳定期;pH 8.0和pH 9.0培养基中的B组香榧绿藻在第9天增长速度加快,长势逐渐接近pH 10.0和pH 11.0,并分别在第23天和第19天进入稳定期;且pH 6.0的培养基会明显抑制B组香榧绿藻的生长。香榧绿藻生长速率从大到小依次为pH 11.0、pH 10.0、pH 9.0、pH 8.0、pH 7.0、对照组、pH 6.0。得出B组香榧绿藻最适生长的pH值为11.0,说明B组香榧绿藻也适合在碱性环境中生长,酸性环境同样会抑制B组香榧绿藻的生长。相比于A组香榧绿藻,B组香榧绿藻更早进入稳定期,且光密度值明显低于A组香榧绿藻。这可能与细胞的排列结构有关,链状结构限制了B组香榧绿藻的增长。

培养基中pH值是藻类生长代谢等许多生理过程的重要影响因子,pH值会影响培养基中藻细胞对元素的吸收和利用以及对代谢产物的利用,从而影响藻类的光合作用和呼吸作用^[22-23]。每一种藻类都有它自身适合的pH值范围,改变pH值会影响藻类的生长和光合作用^[24-25]。赵娜等^[26]研究表明:小球藻的最适生长pH值为7.0,而斜生栅藻 *Scenedesmus obliquus* 的最适生长pH值为9.0。本研究显示:香榧绿藻在pH 11.0环境下生长最好,说明其具有较好的耐碱能力,这与斜生栅藻对pH值的反应规律相



不同小写字母表示在0.05水平上差异显著

图2 香榧绿藻的生长曲线

Figure 2 Growth curve of *Chlorella* sp.

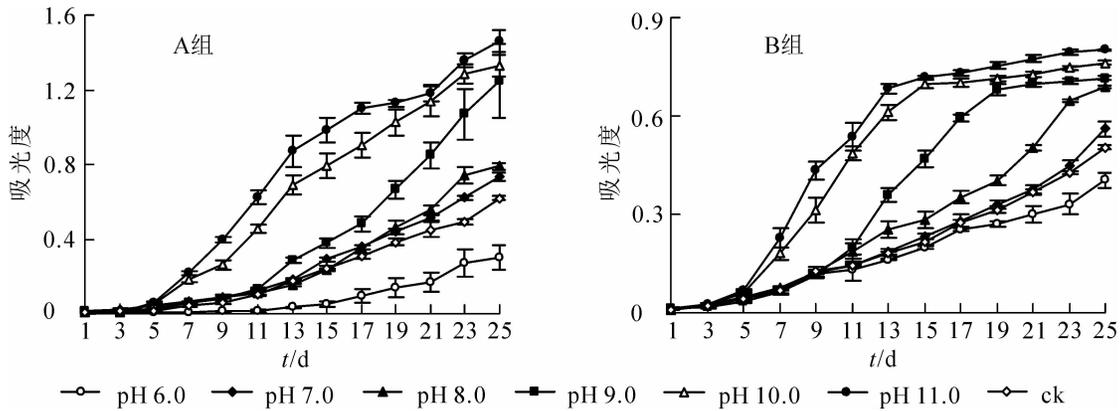


图 3 pH 值对 A 和 B 组香榧绿藻生长的影响

Figure 3 Effects of pH on the growth of group A and B

似^[26]，表明香榧绿藻的生活习性与斜生栅藻更为接近。在碱性环境中，细胞可维持较好的分裂速度，这也与袁丽娜等^[27]的研究结果一致：低 pH 值不利于藻生长，在一定范围内较高的 pH 值能促进藻细胞增殖。因此，香榧绿藻适合生长在碱性环境中，酸性环境可有效抑制香榧绿藻的生长，这也为香榧绿藻的防治提供了新思路。

2.4 2 组香榧绿藻 18S rDNA 序列分析

对具有代表性的 2 组香榧绿藻 CTG1003-XQ(A 组)和 CTG1003-SZ(B 组)进行 18S rDNA 序列分析，扩增出长度均为 1 678 bp 的基因片段(图 4)。

NCBI 中 BLAST 结果表明：香榧绿藻 A 组和 B 组的 18S rDNA 碱基序列完全相同，且与 GenBank 上属于栅藻科 Scenedesmace 的 *Asterarcys quadricellulare* KNUA020 (JQ043183.1) 和 *Asterarcys quadricellulare* Comas 77/75(AF388375.1)的同源性高，相似率均达 100%。由图 5 可以看出：A 组和 B 组香榧绿藻跟栅藻科聚簇成一支，跟 *Asterarcys quadricellulare* KNUA020 和 *Asterarcys quadricellulare* Comas77/75 的节点支持率为 53，遗传距离为 0.00，说明这 2 组香榧绿藻很有可能属于 *Asterarcys quadricellulare*。

传统形态学方法存在一定局限性，藻类形态差异小、鉴定周期长、形态不稳定^[28]等因素导致其物种鉴定面临着不少难题。对此分子鉴定技术应运而生，它是根据物种的基因差异来定性分类物种，可以快速稳定鉴定藻类^[29]。近年来，国内外学者通过对 18S rRNA 基因片段的差异分析鉴定了多种藻类^[19, 30-31]，但由于其片段保守性，仅适用于分析高阶元如属间或目间的物种^[32-33]。本研究通过对香榧绿藻 18S rDNA 序列分析发现：香榧绿藻基因序列与栅藻科的 *Asterarcys quadricellulare* 亲缘关系较近，印证了本研究中香榧绿藻对 pH 值的反应规律与斜生栅藻 *Scenedesmus obliquus* 的结果相同，表明香榧绿藻属于栅藻科。这与本研究形态学分类的结果不一致，与早期研究者对香榧绿藻的认知不同。

2.5 2 组香榧绿藻 ITS 序列分析

对具有代表性的 2 组香榧绿藻 CTG1003-XQ(A 组)和 CTG1003-SZ(B 组)的 ITS 区基因片段进行序列分析，扩增出总长度均为 874 bp 的基因片段(图 6)，且 2 组香榧绿藻的碱基序列完全一致。根据 FAG-GIAN 等^[34]的划分方法，香榧绿藻 ITS1 区长 297 bp，5.8S rDNA 长 287 bp，ITS2 区长 290 bp。

NCBI 中 BLAST 结果表明：香榧绿藻 A 组和 B 组的 ITS 区基因序列与 GenBank 上 *Asterarcys quadricellulare* 和 *Scenedesmus* sp. SM15_4(KT778094.1)的同源性高，相似率均达 100%。由图 7 可以看出：A 组和 B 组香榧绿藻跟栅藻科聚簇成一支，跟 *Asterarcys quadricellulare* 和 *Scenedesmus* sp. 的节点支持率为 99，遗传距离为 0.00，表明 2 组香榧绿藻均与栅藻科的 *Asterarcys quadricellulare* 以及 *Scenedesmus*

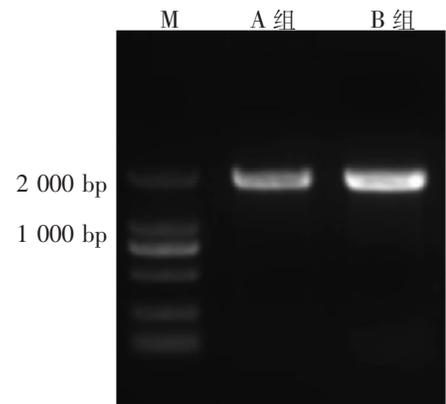


图 4 2 组代表性香榧绿藻的 18S rDNA PCR 电泳图

Figure 4 Electrophoresis of PCR products 18S rDNA of two representative *Chlorella* sp.

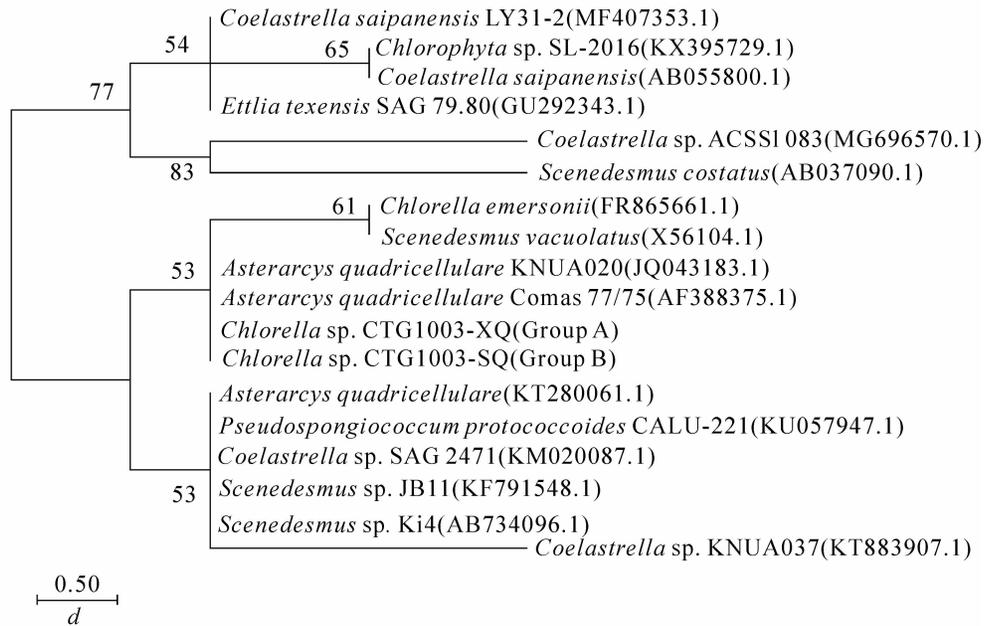


图5 2组代表性香榧绿藻的18S rDNA序列的系统发育树

Figure 5 Phylogenetic tree based on 18S rDNA sequencing of two representative *Chlorella* sp.

sp.的ITS区基因序列一致。本结果进一步证实了香榧绿藻与栅藻科的亲缘关系，与本研究中华榧绿藻18S rDNA序列比对的结果基本一致。

香榧绿藻18S rDNA序列和ITS区基因序列均与*Asterarcys quadricellulare*相似率达100%，表明香榧绿藻与*Asterarcys quadricellulare*属于同一物种，与丝藻和小球藻亲缘关系较远。香榧绿藻ITS区基因序列与栅藻科的物种*Scenedesmus* sp.的ITS区基因序列相似率也达100%，但两者的18S rDNA序列相差较大，表明栅藻ITS区基因序列种间保守性较强，不利于种间的区分。这与前人对其他物种的研究结果相反^[35-36]。一般认为，ITS区基因序列变异性更大，说明不同物种间基因片段的保守性不尽相同。

结合形态分析发现：A组香榧绿藻的形态特征也与*Asterarcys quadricellulare*相近^[30]，说明A组香榧绿藻属于*Asterarcys quadricellulare*，B组香榧绿藻形态与*Asterarcys quadricellulare*形态差异较大，可能为其变种。HONG等^[30]发现：*Asterarcys quadricellulare*来自于韩国庆北国立大学(Kyungpook National University)花园土壤中的一种微型藻类，含有大量的长链多不饱和脂肪酸和脂肪醇，说明香榧绿藻也有产生长链多不饱和脂肪酸和脂肪醇的潜力，具有一定的科研价值。而GenBank上*Scenedesmus* sp.的ITS区基因序列样品来源于中国浙江^[37]，与香榧绿藻亲缘关系较近，对香榧绿藻的鉴定具有重要意义。

3 结论

本研究表明：香榧绿藻由A组和B组2种不同形态的藻类组成，并主要以A组形态绿藻为主，2种形态的香榧绿藻间存在竞争关系。根据形态学鉴定表明：A组香榧绿藻与引起番茄绿藻病的椭圆小球藻形态相近，B组香榧绿藻与引起黄瓜绿藻病的丝藻形态相近；但香榧绿藻对pH值的反应规律与斜生栅藻相近。序列比对也发现：2种形态的香榧绿藻的18S rDNA和ITS区基因序列均与栅藻科的*Asterarcys quadricellulare*的同源性高，相似率达100%。因此，本研究将A组香榧绿藻初步鉴定为栅藻科的*Asterarcys quadricellulare*，B组香榧绿藻为其变种。且2组香榧绿藻的ITS区基因序列与GenBank上的栅藻科物种*Scenedesmus* sp.相同。pH值会显著影响香榧绿藻的生长，酸性环境可有效抑制香榧绿藻的

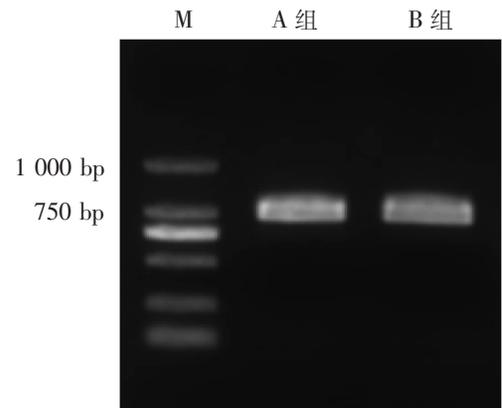


图6 2组代表性香榧绿藻的ITS PCR电泳图

Figure 6 Electrophoresis of PCR products ITS of two representative *Chlorella* sp.

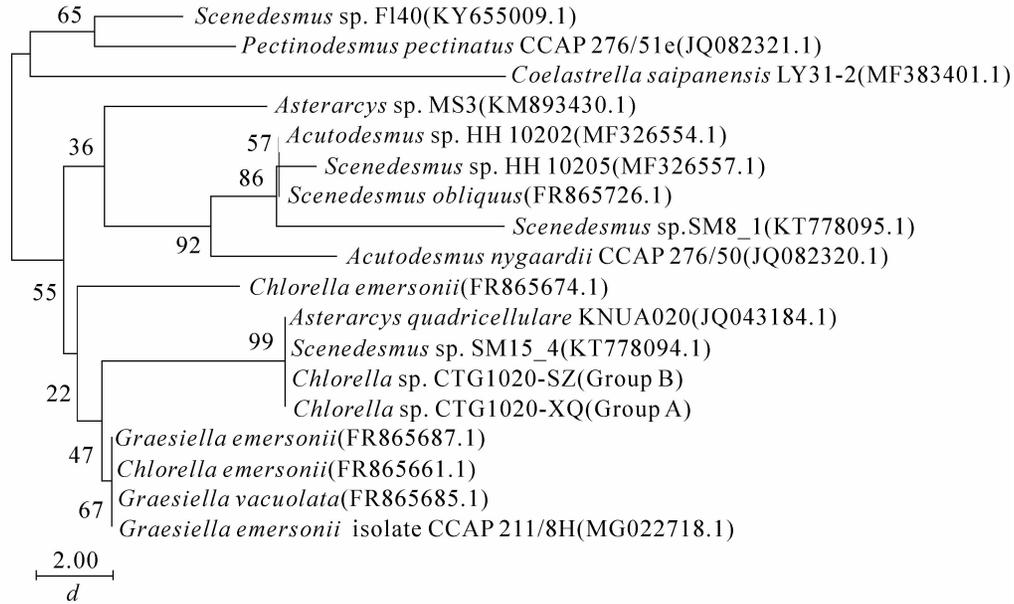


图 7 2 组代表性香榧绿藻的 ITS 序列的系统发育树

Figure 7 Phylogenetic tree based on ITS sequencing of two representative *Chlorella* sp.

生长，这也为香榧绿藻的防治工作提供了新思路。

4 参考文献

- [1] 黎章矩, 程晓建, 戴文圣, 等. 香榧品种起源考证[J]. 浙江林学院学报, 2005, **22**(4): 443 - 448.
LI Zhangju, CHENG Xiaojian, DAI Wensheng, et al. Origin of *Torreya grandis* 'Merrillii' [J]. *J Zhejiang For Coll*, 2005, **22**(4): 443 - 448.
- [2] 黎章矩, 程晓建, 戴文圣, 等. 浙江香榧生产历史、现状与发展[J]. 浙江林学院学报, 2004, **21**(4): 471 - 474.
LI Zhangju, CHENG Xiaojian, DAI Wensheng, et al. History and status and development of *Torreya grandis* in Zhejiang Province [J]. *J Zhejiang For Coll*, 2004, **21**(4): 471 - 474.
- [3] 龚丽, 胡恒康, 胡渊渊, 等. 香榧幼胚发育与胚性感态之间的相关性[J]. 浙江农林大学学报, 2018, **35**(5): 861 - 867.
GONG Li, HU Hengkang, HU Yuanyuan, et al. Immature embryo development and embryogenic frequency in *Torreya grandis* 'Merrillii' [J]. *J Zhejiang A&F Univ*, 2018, **35**(5): 861 - 867.
- [4] 吾中良, 徐志宏, 陈秀龙, 等. 香榧病虫害种类及主要病虫害综合控制技术[J]. 浙江林学院学报, 2005, **22**(5): 545 - 552.
WU Zhongliang, XU Zhihong, CHEN Xiulong, et al. Species and controls of main diseases and insect pests of *Torreya grandis* 'Merrillii' [J]. *J Zhejiang For Coll*, 2005, **22**(5): 545 - 552.
- [5] 吕军美, 郑文彪, 刘金龙, 等. 石硫合剂防治香榧绿藻的试验[J]. 南方林业科学, 2015, **43**(3): 30 - 32, 54.
LÜ Junmei, ZHENG Wenbiao, LIU Jinlong, et al. Test of LSSS control of *Chlorella* [J]. *South China For Sci*, 2015, **43**(3): 30 - 32, 54.
- [6] 徐志宏, 吾中良. 香榧病虫害防治彩色图谱[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2014.
- [7] 陈李红, 陈秀龙, 金国龙. 香榧绿藻的发生及防治试验[J]. 浙江林业科技, 2005, **25**(2): 44 - 45.
CHEN Lihong, CHEN Xiulong, JIN Guolong. Primary report on occurrence and control of *Chlorella* on *Torreya grandis* [J]. *J Zhejiang For Sci Technol*, 2005, **25**(2): 44 - 45.
- [8] JI Jing, LONG Zhifeng, LIN Daohui. Toxicity of oxide nanoparticles to the green algae *Chlorella* sp. [J]. *Chem Eng J*, 2011, **170**(2/3): 525 - 530.
- [9] CHEN Jianmeng, MA Jianyi, CAO Wei, et al. Sensitivity of green and blue-green algae to methyl tert-butyl ether [J]. *J Environ Sci*, 2009, **21**(4): 514 - 519.
- [10] 卡丽比努尔·艾依提, 艾山江, 努尔古丽·热合曼, 等. 4 组沙漠绿藻分子生物学鉴定及其生物学特性研究

- [J]. 食品与机械, 2017, **33**(5): 25 – 29.
Kalibinuel Ayit, Aishanjiang, Nurguri Rahman, *et al.* Morphological and molecular identification of four groups desert green algae [J]. *Food Mach*, 2017, **33**(5): 25 – 29.
- [11] 周楠. 水体中微囊藻毒素的分析提纯及去除实验研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2009..
ZHOU Nan. *Studies on the Analysis Extraction and Purification and Removal Experiment of Microcystin in Water* [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2009.
- [12] 卢梦瑶, 刘书亮, 胡凯弟, 等. 酵素中 1 株高产产酸醋酸菌的鉴定及其产酸特性[J]. 食品与机械, 2016, **32**(12): 64 – 69.
LU Mengyao, LIU Shuliang, HU Kaidi, *et al.* Identification of a strain of high yieldacetic acid bacteria from ferment and its acid-producing characteristics [J]. *Food Mach*, 2016, **32**(12): 64 – 69.
- [13] BHATTACHARYA D, FRIEDL T, DAMBERGER S. Nuclear-encoded rDNA group I introns: origin and phylogenetic relationships of insertion site lineages in the green algae [J]. *Mol Biol Evol*, 1996, **13**(7): 978 – 989.
- [14] 苏敏. *Fulgensia fulgens* 绿藻细胞的分离培养研究[J]. 安徽农业科学, 2008, **36**(2): 413 – 414.
SU Min. Isolation and culture of *Fulgensia fulgens* green algae cells [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2008, **36**(2): 413 – 414.
- [15] KUMAR S, NEI M, DUDLEY J, *et al.* MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences [J]. *Brief Bioinform*, 2008, **9**(4): 299 – 306.
- [16] NOVAKOVSKAYA I V, PATOVA E. Green algae in spruce forests in the north-east of European Russia [J]. *Biologia*, 2008, **63**(6): 836 – 842.
- [17] 熊源新, 罗应春, 林跃光. 贵州中部石灰岩地区气生藻生态研究[J]. 贵州农学院学报, 1994, **13**(3): 29 – 38.
XIONG Yuanxin, LUO Yingchun, LIN Yueguang. A study on ecology of aerophytische from limestone region in Guizhou Province [J]. *J Guizhou Agric Sch*, 1994, **13**(3): 29 – 38.
- [18] 李润霞, 刘学敏, 赵祉鹤, 等. 黄瓜的一种新病害——“绿藻病”[J]. 吉林农业大学学报, 2002, **24**(2): 106 – 107.
LI Runxia, LIU Xuemin, ZHAO Zhihe, *et al.* A new cucumber disease: “green algae disease” [J]. *J Jilin Agric Univ*, 2002, **24**(2): 106 – 107.
- [19] 李芳芳, 隋正红, 龚春霞, 等. 5 种沙漠微藻的分离鉴定及其 18S rDNA 保守区片段差异分析[J]. 石河子大学学报(自然科学版), 2012, **30**(3): 265 – 270.
LI Fangfang, SUI Zhenghong, GONG Chunxia, *et al.* Isolation and identification of five desert microalgae and analysis of 18S rDNA conserved fragment [J]. *J Shihezi Univ Nat Sci*, 2012, **30**(3): 265 – 270.
- [20] 龚春霞, 王丹, 苟亚峰, 等. 4 株沙漠土壤衣藻的分离培养及形态和分子鉴定[J]. 石河子大学学报(自然科学版), 2013, **31**(3): 294 – 300.
GONG Chunxia, WANG Dan, GOU Yafeng, *et al.* Study on morphology and molecular phylogeny of four desert chlamydomonas [J]. *J Shihezi Univ Nat Sci*, 2013, **31**(3): 294 – 300.
- [21] 徐娜, 逢少军. 3 种海洋浮游微藻的分子鉴定及培养条件研究[J]. 海洋科学, 2012, **36**(10): 13 – 25.
XU Na, PANG Shaojun. Molecular identification and culture trials of three marine microalgae [J]. *Mar Sci*, 2012, **36**(10): 13 – 25.
- [22] 王雪青, 赵培, 胡萍, 等. 金藻 3011 的培养条件优化及扩大培养研究[J]. 食品科学, 2006, **27**(12): 253 – 259.
WANG Xueqing, ZHAO Pei, HU Ping, *et al.* Optimization of cultural conditions of *Isochrysis galbana* Parks 3011 and its mass-cultural [J]. *Food Sci*, 2006, **27**(12): 253 – 259.
- [23] 欧阳峥嵘, 温小斌, 耿亚红, 等. 光照强度、温度、pH、盐度对小球藻(*Chlorella*)光合作用的影响[J]. 植物科学学报, 2010, **28**(1): 49 – 55.
OUYANG Zhengrong, WEN Xiaobin, GENG Yahong, *et al.* The effects of light intensities, temperatures, pH and salinities on photosynthesis of *Chlorella* [J]. *Plant Sci J*, 2010, **28**(1): 49 – 55.
- [24] 李艳红. 环境因子对铜绿微囊藻生长和光合作用的影响[D]. 南昌: 南昌大学, 2010.
LI Yanhong. *The Effects of Environmental Factors on Growth and Photosynthesis of Microcystis aeruginosa* [D]. Nanchang: Nanchang University, 2010.

- [25] 张虎, 张桂艳, 温小斌, 等. pH 对小球藻 *Chlorella* sp. XQ-200419 光合作用、生长和产油的影响[J]. 水生生物学报, 2014, **38**(6): 1084 – 1091.
ZHANG Hu, ZHANG Guiyan, WEN Xiaobin, *et al.* Effects of pH on the photosynthesis, growth and lipid production of *Chlorella* sp. XQ-200419 [J]. *Acta Hydrobiol Sin*, 2014, **38**(6): 1084 – 1091.
- [26] 赵娜, 冯鸣凤, 朱琳. 不同 pH 值条件下 Cr⁶⁺对小球藻和斜生栅藻的毒性效应[J]. 东南大学学报(医学版), 2010, **29**(4): 382 – 386.
ZHAO Na, FENG Mingfeng, ZHU Lin. Toxic effects of chromium (Cr⁶⁺) on *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus* at different pH [J]. *J Southeast Univ Med Sci Ed*, 2010, **29**(4): 382 – 386.
- [27] 袁丽娜, 宋炜, 肖琳, 等. 多环境因素全面正交作用对铜绿微囊藻生长的效应研究[J]. 南京大学学报(自然科学), 2008, **44**(4): 77 – 83.
YUAN Lina, SONG Wei, XIAO Lin, *et al.* The overall orthogonal design study of multifactor interaction on the growth of *Microcystis aeruginosa* in the presence of adnascent *Pseudomonas* sp. [J]. *J Nanjing Univ Nat Sci*, 2008, **44**(4): 77 – 83.
- [28] EVANS E H, FOULDS I, CARR N G. Environmental conditions and morphological variation in the blue-green alga *Chlorogloea fritschii* [J]. *J Gen Microbiol*, 1976, **92**(1): 147 – 155.
- [29] 刘京, 胡章立, 雷安平. 藻类快速鉴定研究进展[J]. 生物技术通讯, 2005, **16**(6): 700 – 702.
LIU Jing, HU Zhangli, LEI Anping. The advances in identification for the algae [J]. *Lett Biotechnol*, 2005, **16**(6): 700 – 702.
- [30] HONG J W, KIM S A, CHANG J W, *et al.* Isolation and description of a Korean microalga, *Asterarcys quadricellulare* KNUA020, and analysis of its biotechnological potential [J]. *Algae*, 2012, **27**(3): 197 – 203.
- [31] OLMOS-SOTO J, PANIAGUA J, CONTRERAS R. Molecular identification of *Dunaliella* sp. utilizing the 18S rDNA gene [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2000, **30**(1): 80 – 84.
- [32] 李芳芳, 隋正红, 周伟, 等. 两种沙漠微藻的形态学和分子生物学鉴定[J]. 干旱区资源与环境, 2013, **27**(3): 167 – 172.
LI Fangfang, YAN Zhenghong, ZHOU Wei, *et al.* Two kinds of desert microalgae identification according to morphological and molecular biology [J]. *J Arid Land Resour Environ*, 2013, **27**(3): 167 – 172.
- [33] 徐芬. 利用 RAPD 和 18S rDNA 基因序列对几种索科线虫系统发育分析[D]. 武汉: 华中师范大学, 2005.
XU Fen. *Phylogenetic Analysis of Several S. elegans Using RAPD and 18S rDNA Gene Sequences* [D]. Wuhan: Huazhong Normal University, 2005.
- [34] FAGGIAN R, BULMAN S R, LAWRIE A C, *et al.* Specific polymerase chain reaction primers for the detection of *Plasmodiophora brassicae* in soil and water [J]. *Phytopathology*, 1999, **89**(5): 392 – 397.
- [35] 罗立明, 胡鸿钧, 李夜光, 等. 东海原甲藻的分子鉴定[J]. 海洋学报, 2006, **28**(1): 127 – 131.
LUO Liming, HU Hongjun, LI Yeguang, *et al.* Molecular identification on *Prorocentrum donghaiense* [J]. *Acta Oceanologica Sin*, 2006, **28**(1): 127 – 131.
- [36] 郑俊斌, 张凤英, 马凌波, 等. 米氏凯伦藻 18S rDNA 和转录间隔区序列分析[J]. 上海海洋大学学报, 2009, **18**(6): 680 – 685.
ZHENG Junbin, ZHANG Fengying, MA Lingbo, *et al.* Sequence analysis of *Karenia mikimotoi* based on ribosomal 18S rDNA and internal transcribed space regions [J]. *J Shanghai Ocean Univ*, 2009, **18**(6): 680 – 685.
- [37] ZOU Shanmei, FEI Cong, WANG Chun, *et al.* How DNA barcoding can be more effective in microalgae identification: a case of cryptic diversity revelation in *Scenedesmus* (Chlorophyceae) [J]. *Sci Rep*, 2016, **6**: 36822.