

Phân tích sự phức tạp về phân loại của các loài tảo thuộc nhánh *Chlorella* (*Chlorellaceae*)

Nguyễn Minh Lý^{1*}, Võ Bá Duy¹, Mai Xuân Cường²

¹Khoa Sinh - Môi trường, Trường Đại học Sư phạm, Đại học Đà Nẵng, 459 Tôn Đức Thắng, phường Hòa Khánh Nam, quận Liên Chiểu, Đà Nẵng, Việt Nam

²Trường Đại học Chang Gung, Đào Viên, Đài Loan, 259 Wenhua 1, quận Quy Sơn, TP Đào Viên, Đài Loan

Ngày nhận bài 27/9/2022; ngày chuyển phân biên 30/9/2022; ngày nhận phân biên 25/10/2022; ngày chấp nhận đăng 28/10/2022

Tóm tắt:

Trong nghiên cứu này, 253 trình tự vùng gen 18S rDNA, 155 trình tự vùng gen ITS2, 63 trình tự đoạn gen *rbcL* và 23 trình tự đoạn gen *tufA* được thu thập trên GenBank để đánh giá và phân tích mức độ phức tạp về phân loại của nhánh *Chlorella*. Kết quả phân tích các cây phát sinh loài cho thấy, *C. vulgaris* và *C. sorokiniana* với số lượng trình tự mã vạch DNA trên GenBank lớn có thể được chia thành 2-3 nhóm nhỏ với sự khác biệt về mặt di truyền. Ngoài ra, nghiên cứu cũng đã nhận thấy các trình tự của các loài cùng chi hoặc khác chi phân bố trong một nhóm phân loại trên cây phát sinh loài. Ví dụ, *Actinastrum hantzschii*, *C. chlorelloides*, *C. singularis*, *C. sorokiniana*, *C. thermophila*, *C. volutis*, *C. vulgaris*, *Micractinium pusillum* và *M. reisseri* cùng thuộc một nhóm trên cây phát sinh loài 18S rDNA. Điều đó cho thấy sự phức tạp trong phân loại nhánh *Chlorella* không những đến từ các loài khó xác định mà còn trong mối quan hệ di truyền của các loài còn lại. Như vậy, việc định danh và xác định mối quan hệ của các loài thuộc nhánh *Chlorella* còn gặp nhiều khó khăn, gây ra bởi sự phức tạp về cơ sở dữ liệu trên GenBank cũng như hệ thống phân loại chưa được hoàn thiện. Việc làm rõ mối quan hệ di truyền là cần thiết nhằm mục đích cải thiện hệ thống phân loại và định danh các chủng phân lập mới thuộc nhánh *Chlorella*.

Từ khóa: *Chlorella*, ITS2, mã vạch DNA, *rbcL*, vi tảo, 18S rDNA.

Chỉ số phân loại: 1.6

1. Đặt vấn đề

Nhánh *Chlorella* (*Chlorellaceae*) là tập hợp các chi có độ tương đồng cao về hình thái và di truyền, bao gồm: *Actinastrum*, *Closteriopsis*, *Dictyosphaerium*, *Didymogenes*, *Hegewald*, *Meyerella*, *Micractinium* và *Chlorella*. Đây là một trong những nhánh vi tảo đa dạng trên thế giới, dễ nuôi cấy và có nhiều ứng dụng thực tiễn [1-3]. Cụ thể, các loài vi tảo này được coi là nguồn nguyên liệu sản xuất nhiên liệu sinh học như diesel, phát triển năng lượng bền vững do khả năng tích lũy lớn các chất béo của chúng [4]; có giá trị kinh tế cao trong sản xuất thực phẩm chức năng và thức ăn chăn nuôi [5]. Ở một số quốc gia, chúng được sử dụng trong ngành y tế bởi khả năng điều hòa miễn dịch và chống ung thư [6]. Bên cạnh đó, tảo thuộc nhánh *Chlorella* cũng có thể ứng dụng trong xử lý ô nhiễm môi trường [7].

Việc định danh các loài vi tảo thuộc nhánh *Chlorella* gặp nhiều khó khăn do sự tương đồng về mặt hình thái cũng như di truyền cao giữa các chi với nhau và giữa các loài thuộc cùng một chi [3, 8]. Các nghiên cứu trước đây tập chung vào phân tích các đặc điểm hình thái, cấu trúc tế bào và các đặc điểm sinh lý, sinh hoá để xác định loài thuộc nhánh *Chlorella* [3]. Tuy nhiên, hình thái và kích thước tế bào của các loài tảo này thay đổi trong quá trình nuôi trồng, dẫn tới sự khác biệt về đặc điểm sinh lý, sinh hoá qua từng giai đoạn phát triển [6]. Điều này gây ra sự nhầm lẫn về hệ

thống phân loại của các loài thuộc nhánh *Chlorella* và dẫn đến sự xuất hiện của các loài khó xác định (cryptic species).

Mã vạch DNA (DNA barcoding) được xem là phương pháp hữu hiệu trong việc phân biệt loài dựa vào sự khác biệt về trình tự DNA của một số vùng gen [9]. Tuy nhiên, việc ứng dụng mã vạch DNA trong định danh các loài thuộc nhánh *Chlorella* chưa đạt hiệu quả cao do sự tương đồng về các trình tự mã vạch DNA. Do đó, cho đến nay công cụ này chỉ được sử dụng để phân tích quá trình phát sinh loài của nhánh *Chlorella* [10, 11]. Gần đây, S. Zou và cs (2018) [12] đã đánh giá khả năng kết hợp các trình tự đoạn gen *rbcL* (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase large subunit), *tufA* (encoding elongation factor), 18S rDNA và ITS2 trong định danh loài thuộc chi *Chlorella*, đây là các loài chiếm số lượng lớn trong nhánh *Chlorella*. Kết quả cho thấy, việc kết hợp giữa các trình tự mã vạch DNA hiệu quả hơn so với việc phân tích từng trình tự riêng rẽ trong quá trình xây dựng cây phát sinh loài.

Hiện nay, số lượng lớn dữ liệu mã vạch DNA của nhánh *Chlorella* được công bố trên GenBank nhưng chưa được phân tích rõ ràng để xác định mối quan hệ của các loài vi tảo đã được phân lập. Vì vậy, trong nghiên cứu này chúng tôi tập chung phân tích dữ liệu mã vạch DNA của các loài tảo thuộc nhánh *Chlorella* từ 4 vùng/đoạn gen là 18S rDNA, ITS2, *rbcL* *tufA* với mục đích làm rõ mối quan hệ di truyền và đánh giá sự phức tạp trong phân loại tảo của nhánh *Chlorella*.

*Tác giả liên hệ: Email: nmly@ued.udn.vn

Taxonomic complexity analysis of the *Chlorella* clade (*Chlorellaceae*)

Minh Ly Nguyen^{1*}, Ba Duy Vo¹, Xuan Cuong Mai²

¹Faculty of Biology and Environmental Science, The University of Education, Danang University, 459 Ton Duc Thang Street, Hoa Khanh Nam Ward, Lien Chieu District, Da Nang City, Vietnam

²Chang Gung University, Taoyuan, Taiwan, 259 Wenhua 1 Street, Guishan District, Taoyuan City, Taiwan

Received 27 September 2022; revised 25 October 2022; accepted 28 October 2022

Abstract:

In this study, 253 of 18S rDNA sequences, 155 of ITS2 sequences, 63 of *rbcL* sequences, and 23 of *tufA* sequences were collected on GenBank to evaluate and analyse the taxonomic complexity of the *Chlorella* clade. *C. vulgaris* and *C. sorokiniana* had the most collected sequences of DNA barcoding. Analysis of phylogenetic tree results showed that the strains of these two species were divided into 2 to 3 small groups with genetic differences. In addition, different species belonging to the same clade in phylogenetic trees were observed. For example, *Actinastrum hantzschii*, *C. chlorelloides*, *C. singularis*, *C. sorokiniana*, *C. thermophila*, *C. volutis*, *C. vulgaris*, *Micractinium pusillum*, and *M. reisseri* belonged to the same group of the 18S rDNA phylogenetic tree. This showed the complexity in the taxonomy of the *Chlorella* clade came not only from the cryptic species, but also from the genetic relationships of the remaining species. Therefore, identifying and determining the relationship of *Chlorella* clade species have been still challenging, because of the complexity of the database on GenBank as well as the incomplete taxonomic system. Clarification of the genetic relationship is needed to improve the taxonomy and identification of new isolates of the *Chlorella* clade.

Keywords: *Chlorella*, DNA barcoding, ITS2, microalgae, *rbcL*, 18S rDNA.

Classification number: 1.6

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Thu thập dữ liệu

Trình tự vùng/đoạn gen ITS2, 18S rDNA, *rbcL* và *tufA* của các loài thuộc nhánh *Chlorella* được thu thập từ GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Trong đó, 253 trình tự vùng gen 18S rDNA, 155 trình tự vùng gen ITS2, 63 trình tự đoạn gen *rbcL* và 23 trình tự đoạn gen *tufA* đã được thu thập bao gồm: 165 chủng *C. vulgaris*, 79 chủng *C. sorokiniana*, 8 chủng *A. hantzschii*, 1 chủng *C. chlorelloides*, 1 chủng *C. coloniales*, 1 chủng *C. elongata*, 1 chủng *C. heliozoae*, 1 chủng *C. gloriosa*, 5 chủng *C.*

lewinii, 1 chủng *C. miniata*, 2 chủng *C. pituita*, 3 chủng *C. pulchelloides*, 2 chủng *C. regularis* var. *minima*, 1 chủng *C. rotunda*, 2 chủng *C. salina*, 2 chủng *C. singularis*, 1 chủng *C. stigmatophora*, 2 chủng *C. thermophila*, 19 chủng *C. variabilis*, 1 chủng *C. volutis*, 4 chủng *C. vulgaris* var. *vulgaris*, 3 chủng *Closteriopsis acicularis*, 23 chủng *Dictyosphaerium ehrenbergianum*, 4 chủng *D. lacustre*, 2 chủng *D. libertatis*, 2 chủng *D. anomala*, 2 chủng *D. palatina*, 2 chủng *Hegewald parvula*, 7 chủng *Meyerella planktonica*, 1 chủng *M. conductrix*, 3 chủng *M. inermum*, 23 chủng *M. pusillum*, 5 chủng *M. reisseri* và 1 chủng *M. simplicissimum*.

Hình thái của các loài vi tảo thuộc nhánh *Chlorella* được tham khảo, so sánh với nhau dựa trên cơ sở dữ liệu Algaebase (<https://www.algaebase.org/>) và các bộ sưu tập mẫu tảo như: CCAP (Culture collection of algae and protozoa: <https://www.ccap.ac.uk/>), UTEX (Culture collection of algae at the university of Texas at Austin: <https://utex.org/>) và SAG (The culture collection of algae at the University of Göttingen, Germany: <http://sagdb.uni-goettingen.de/>).

2.2. Sắp xếp và căn chỉnh trình tự

Sau khi thu thập dữ liệu, các trình tự được sắp xếp và căn chỉnh bằng cách sử dụng công cụ ClustalW của phần mềm MEGA 7. Sau khi hoàn thành, 4 tệp dữ liệu của 4 vùng/đoạn gen đã được tải lên kho lưu trữ có thể truy cập công khai (<https://figshare.com/>) với mã số nhận dạng (DOI): <https://dx.doi.org/10.6084/m9.figshare.19766854>.

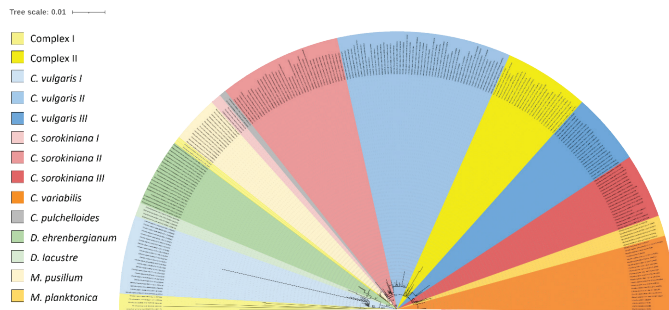
2.3. Phân tích cây phát sinh loài

Các trình tự vùng/đoạn gen 18S rDNA, *rbcL*, ITS2 và *tufA* được phân tích dựa trên khoảng cách di truyền, do đó cây phát sinh loài Neighbor-Join (NJ) đã được thiết lập [13]. Khoảng cách tiến hóa được tính bằng phương pháp Tamura-Nei [14]. Các cây gốc được xây dựng theo phương pháp heuristic. Khoảng cách di truyền được tính dựa vào sự khác biệt giữa các trình tự bằng thuật toán NJ và BioNJ, được xác định khoảng cách tiến hoá thông qua phương pháp Maximum Composite Likelihood [14]. Chỉ số Bootstrap 1.000 lần lặp lại được áp dụng để xác định độ tin cậy của cấu trúc liên kết [15]. Tất cả các thuật toán trên được tích hợp và phân tích trong MEGA 7 [16]. Sau cùng, cây phát sinh loài được xử lý và ghi nhận thông qua phần mềm iTOL (<https://itol.embl.de/>) [17].

3. Kết quả

3.1. Phân tích cây phát sinh loài với trình tự thuộc vùng gen 18S rDNA

Sự phức tạp của các chủng vi tảo thuộc nhánh *Chlorella* được thể hiện rõ qua cây phát sinh loài của vùng gen 18S rDNA (hình 1). Ba vấn đề chính trong phân loại của các loài thuộc nhánh *Chlorella* đã được ghi nhận:



Hình 1. Cây phát sinh loài NJ với 253 trình tự thuộc vùng gen 18S rDNA.

(1) Các trình tự thuộc vùng gen 18S rDNA của cùng một loài nằm ở các nhánh khác nhau trên cây phát sinh loài. Cụ thể, 114 trình tự *C. vulgaris* được chia thành 3 nhóm (*C. vulgaris* I, *C. vulgaris* II, *C. vulgaris* III) nằm cách xa nhau trên cây phát sinh loài. Tương tự, 45 trình tự *C. sorokiniana* cũng được chia thành 3 nhóm (*C. sorokiniana* I, *C. sorokiniana* II, *C. sorokiniana* III). Điều đó cho thấy sự khác biệt về mối quan hệ và khoảng cách di truyền giữa các chủng thuộc cùng một loài.

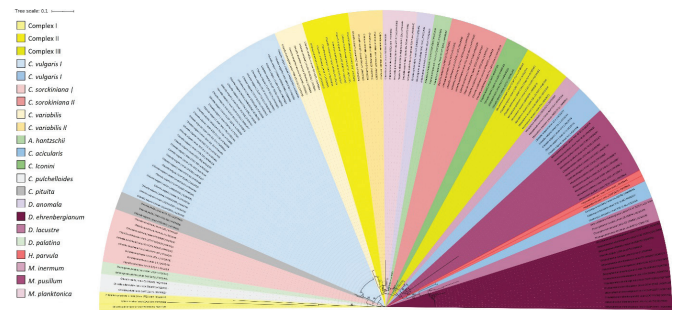
(2) Các trình tự thuộc vùng gen 18S rDNA của các loài khác nhau nằm trong cùng một nhánh của cây phát sinh loài. Sự xuất hiện của 2 nhóm: Complex I (7 trình tự) và Complex II (25 trình tự) đã cho thấy sự khó hiểu về phân loại giữa các loài thuộc nhánh *Chlorella*. Trong đó, Complex I bao gồm 6 loài: *A. hantzschii*, *C. gloriosa*, *C. stigmatophora*, *C. vulgaris*, *D. anomala* và *D. palatina* có sự khác biệt về di truyền rõ ràng so với các nhánh còn lại. Complex II gồm 9 loài: *A. hantzschii*, *C. chlorelloides*, *C. singularis*, *C. sorokiniana*, *C. thermophila*, *C. volutis*, *C. vulgaris*, *M. pusillum* và *M. reisseri* có mối quan hệ gần gũi với nhánh *C. vulgaris* II và *C. vulgaris* III.

(3) Các trình tự thuộc vùng gen 18S rDNA của cùng một loài thuộc cùng một nhánh bao gồm các loài sau đây: *D. ehrenbergianum* (19 trình tự), *D. lacustre* (4 trình tự), *M. planktonica* (5 trình tự), *M. pusillum* (14 trình tự). Như vậy, các loài này có tính ổn định về mặt di truyền được thể hiện qua cây phát sinh loài.

3.2. Kết quả phân tích cây phát sinh loài với trình tự vùng gen ITS2

Tương tự với vùng gen 18S rDNA, sự phức tạp của các chủng vi tảo thuộc nhánh *Chlorella* cũng được thể hiện rõ qua cây phát sinh loài của vùng gen ITS2 (hình 2). Cụ thể:

(1) Các trình tự vùng gen ITS2 của cùng một loài nằm ở các nhánh khác nhau trên cây phát sinh loài. Cụ thể, 45 trình tự *C. vulgaris* được chia thành 2 nhóm (*C. vulgaris* I, *C. vulgaris* II) nằm cách xa nhau trên cây phát sinh loài. Còn lại, loài *C. sorokiniana* được chia thành 3 nhóm (*C. sorokiniana* I, *C. sorokiniana* II, *C. sorokiniana* III). Điều đó cho thấy sự khác biệt về mối quan hệ và khoảng cách di truyền giữa các chủng thuộc cùng một loài.

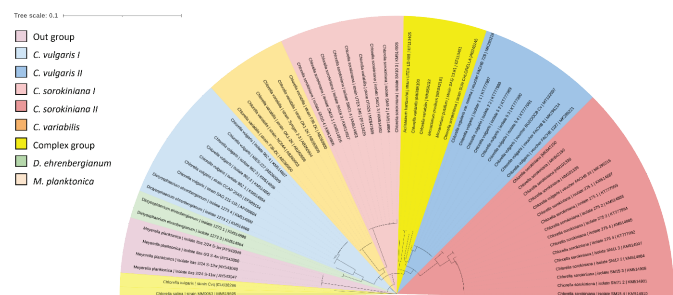


Hình 2. Cây phát sinh loài NJ với 155 trình tự thuộc vùng gen ITS2.

(2) Các trình tự vùng gen ITS2 của các loài khác nhau thuộc cùng một nhánh. Sự xuất hiện của 3 nhóm: Complex I (3 trình tự), Complex II (8 trình tự) và Complex III (8 trình tự) đã cho thấy sự khó hiểu về phân loại giữa các loài thuộc nhánh *Chlorella*. Trong đó, Complex I bao gồm 3 loài: *C. regularis* var. *minima*, *C. salina* và *C. pulchelloides* có sự khác biệt về di truyền rõ ràng so với các nhánh còn lại. Complex II gồm 4 loài: *C. sorokiniana*, *C. singularis*, *C. rotunda* và *C. heliozoae* có mối quan hệ gần gũi với nhánh *C. variabilis* I và *C. variabilis* II. Còn lại, nhóm Complex III gồm 5 loài: *C. sorokiniana*, *C. vulgaris*, *M. pusillum*, *M. conductrix* và *M. reisseri* có mối quan hệ gần gũi với nhánh *C. lewinii* và *M. inermum*.

(3) Các trình tự vùng gen ITS2 của cùng một loài thuộc cùng một nhánh bao gồm các loài: *A. hantzschii* (19 trình tự), *C. acicularis* (4 trình tự), *C. lewinii* (5 trình tự), *C. pulchelloides* (14 trình tự), *C. pituita* (2 trình tự), *D. anomala* (2 trình tự), *D. ehrenbergianum* (12 trình tự), *D. lacustre* (3 trình tự), *D. palatina* (2 trình tự), *H. parvula* (2 trình tự), *M. inermum* (3 trình tự), *M. pusillum* (10 trình tự), *M. planktonica* (4 trình tự). Nhận thấy rằng, số lượng và thành phần loài giữ được sự ổn định về mặt di truyền khi so sánh giữa các cây phát sinh loài ITS2 và 18S rDNA có sự khác biệt.

3.3. Kết quả phân tích cây phát sinh loài với trình tự đoạn gen rbcL



Hình 3. Cây phát sinh loài NJ với 63 trình tự thuộc đoạn gen rbcL.

Cây phát sinh loài của đoạn gen *rbcL* cho thấy kết quả tương đồng với 2 vùng gen 18S rDNA và ITS2 (hình 3).

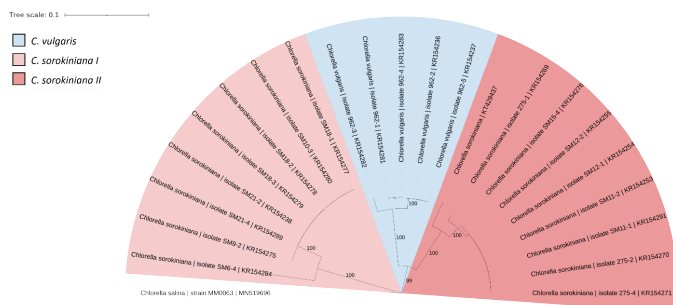
(1) Các trình tự đoạn gen *rbcL* của cùng một loài nằm ở các nhánh khác nhau trên cây phát sinh loài. Cụ thể, 16 trình tự *C. vulgaris* được chia thành 2 nhóm (*C. vulgaris* I, *C. vulgaris* II) nằm cách xa nhau trên cây phát sinh loài. Tương tự, 24 trình tự *C. sorokiniana* cũng chia thành 2 nhóm (*C. sorokiniana* I, *C. sorokiniana* II). Điều đó cho thấy sự khác biệt về mối quan hệ và khoảng cách di truyền giữa các chủng thuộc cùng một loài.

(2) Các trình tự đoạn gen *rbcL* của các loài khác nhau thuộc cùng một nhánh. Sự xuất hiện của 2 nhóm: Complex I (2 trình tự) và Complex II (6 trình tự) đã cho thấy sự khó hiểu về phân loại giữa các loài thuộc nhánh *Chlorella*. Trong đó, Complex I bao gồm 2 loài: *C. vulgaris* và *C. salina* có sự khác biệt về di truyền rõ ràng so với các nhánh còn lại. Complex II gồm 4 loài: *A. hantzschii*, *C. variabilis*, *C. sorokiniana* và *M. pusillum* có mối quan hệ gần gũi với nhánh *C. sorokiniana* I và *C. vulgaris* II.

(3) Các trình tự đoạn gen *rbcL* của cùng một loài thuộc cùng một nhánh bao gồm các loài: *C. variabilis* (6 trình tự), *D. ehrenbergianum* (4 trình tự) và *M. planktonica* (4 trình tự).

3.4. Kết quả phân tích cây phát sinh loài với trình tự đoạn gen *tufA*

Đối với đoạn gen *tufA*, sự phân nhánh của các loài *C. sorokiniana* được quan sát thấy (hình 4). Cụ thể, 17 trình tự *C. sorokiniana* được chia thành 2 nhánh riêng biệt và tách biệt bởi các loài *C. vulgaris*. Mặc dù dữ liệu về trình tự đoạn *tufA* thu được còn hạn chế nhưng vẫn cho thấy sự khác biệt về di truyền của các chủng thuộc cùng một loài.



Hình 4. Cây phát sinh loài NJ với 23 trình tự thuộc đoạn gen *tufA*.

4. Bàn luận

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phân tích sự phức tạp về phân loại của các loài vi tảo thuộc nhánh *Chlorella* từ dữ liệu thuộc 4 vùng/đoạn gen 18S rDNA, ITS2, *rbcL* và *tufA*. S. Zou và cs (2018) [12] đã chứng minh rằng, vùng gen 18S rDNA có khả năng bảo tồn và thường được sử dụng trong phân tích phát sinh loài của vi tảo. Ngoài ra, so với *rbcL*, *tufA*, ITS và 16S rDNA thì 18S rDNA còn có khả năng phân biệt giữa các loài và đã được ứng dụng trong việc định danh tảo *Chlorella* và *Scenedesmus* [12]. Hơn thế nữa, cây phát sinh loài 18S rDNA trong nghiên cứu trên còn cho thấy sự phân

nhóm giữa các chủng của 2 loài *C. vulgaris* và *C. sorokiniana*. Cụ thể, mỗi loài trên được chia thành 2 nhóm riêng biệt [12]. Kết quả này cũng đã được quan sát thấy trong nghiên cứu này (hình 1). Bên cạnh đó, các loài *C. vulgaris* phân lập từ nghiên cứu của H.J. Lee và cs (2012) [18] được ghi nhận có sự khác biệt về di truyền với 2 nhóm *C. vulgaris* còn lại (hình 1). Ngoài ra, các chủng *C. sorokiniana* với số đăng ký KJ616754, KJ616755, KJ616757 thuộc cùng một nhóm và khác biệt với 2 nhóm *C. sorokiniana* được ghi nhận bởi S. Zou và cs (2018) [12]. Như vậy, nghiên cứu này đã ghi nhận sự xuất hiện của 3 nhóm *C. vulgaris* và 3 nhóm *C. sorokiniana*. Việc phân tích toàn bộ dữ liệu trình tự 18S rDNA của các loài thuộc nhánh *Chlorella* đã ghi nhận những kết quả tương đồng với các nghiên cứu trước đây, đồng thời làm rõ mối quan hệ giữa các dữ liệu thu được. Việc truy xuất thông tin của các chủng vi tảo từ các bộ sưu tập có thể giải thích một số ví dụ về sự phức tạp trong phân loại dựa vào đặc điểm hình thái. Cụ thể, 2 chủng vi tảo *C. vulgaris* CCAP211/11F và *C. sorokiniana* SAG 211-40a thuộc nhánh Complex II (hình 1) đã được xác định lần lượt là *Micractinium* sp. và *Lewinosphaera symbiontica* dựa vào hình thái trên cơ sở dữ liệu CCAP và SAG. Điều đó cho thấy, nhiều chủng vi tảo mặc dù đã được định danh lại nhưng thông tin lưu trữ trên GenBank vẫn chưa được thay đổi, gây ra sự phức tạp về cơ sở dữ liệu.

Đối với cây phát sinh loài của vùng ITS2 và *rbcL*, các chủng của 2 loài *C. vulgaris* và *C. sorokiniana* đều được chia thành 2 nhóm riêng biệt tương đồng với kết quả của các nghiên cứu trước đây [19, 20]. J.N. Rosenberg và cs (2014) [19] cũng đã đưa ra nhận xét về sự phức tạp trong di truyền của các loài *C. vulgaris* thông qua việc phân tích vùng gen ITS2. Các chủng *C. vulgaris* và *C. sorokiniana* thuộc các nhóm khác nhau có sự khác biệt lớn về mặt di truyền (hình 2 và 3), điều đó cho thấy sự khó hiểu về phân loại của 2 loài này. Ngoài ra, các chủng *C. variabilis* cũng được chia thành 2 nhóm trên cây phát sinh loài của vùng gen ITS2 (hình 2). Nhóm *C. variabilis* bao gồm các chủng được phân lập tại Ấn Độ (JX839966, JX839967, JX839969, JX839972), nhóm còn lại bao gồm các chủng *C. variabilis* ở Nhật Bản (AB162912, AB162913, AB162914, AB162915, AB162916) với thông tin được ghi nhận trên GenBank thông qua số đăng ký của các chủng. Vì vậy, việc xác định mối quan hệ của các chủng phân lập ở các quốc gia khác nhau cần được phân tích và làm rõ.

Các chủng vi tảo thuộc nhóm Complex III trên cây phát sinh loài NJ của vùng gen ITS2 có sự tương đồng cao về hình thái được tham khảo từ trang CCAP, bao gồm các chủng: *M. pusillum* CCAP 231/1, *C. vulgaris* CCAP 211/11F và *M. conductrix* CCAP 211/83. Trong đó, chủng *C. vulgaris* CCAP 211/11F đã được thay đổi thành *Micractinium* sp. cùng chi với 2 chủng còn lại. Như vậy, các chủng có độ tương đồng cao về trình tự vùng gen ITS2 dẫn đến sự tương đồng cao về hình thái. Kết quả tương tự cũng được quan sát thấy ở các chủng vi tảo thuộc nhóm *M. pusillum*.

Mặc dù S. Zou và cs (2016) [20] đã đề xuất *tufA* là mã vạch DNA có tiềm năng trong việc phân loại các loài tảo thuộc nhánh *Chlorella*, nhưng cho tới nay dữ liệu trình tự đoạn gen *tufA* trên GenBank còn hạn chế. 23 trình tự đoạn gen *tufA* chủ yếu thuộc 2 loài *C. vulgaris* và *C. sorokiniana* đã được thu thập và đánh giá. *C. sorokiniana* được chia thành 2 nhóm và tách biệt bởi các chủng *C. vulgaris* (hình 4).

E.S. Krivina và cs (2020) [3] đã chỉ ra rằng, việc phân tích cây phát sinh loài dựa vào vùng gen 18S rDNA, 5,8S rDNA, ITS1 và ITS2 cho thấy sự phức tạp về phân loại của nhánh *Chlorella*. Chính vì lý do đó, các tác giả đã ghi nhận sự khác biệt về cấu trúc bậc 2 của vùng gen ITS2 nhằm phân biệt các loài khó hiểu đối với hầu hết các loài thuộc nhánh *Chlorella* [10]. Phương pháp này cho thấy tiềm năng trong việc định danh và làm rõ hệ thống phân loại các loài thuộc nhánh *Chlorella*.

Căn cứ vào các kết quả thu được, hệ thống phân loại các loài tảo thuộc nhánh *Chlorella* hiện nay vẫn còn là một thách thức. Chính vì vậy, việc tiến hành đưa ra nhiều nghiên cứu mới để cải thiện hệ thống phân loại của nhánh *Chlorella* là điều cần thiết. Trong đó, điều quan trọng nhất chính là tìm ra phương pháp định danh chính xác các loài tảo.

5. Kết luận

Kết quả thu được từ việc phân tích cây phát sinh loài của 4 vùng/đoạn gen 18S rDNA, ITS2, *rbcL* và *tufA* cho thấy sự phức tạp về dữ liệu mã vạch DNA trên GenBank cũng như sự chưa rõ ràng trong phân loại của các loài thuộc nhánh *Chlorella*. 3 trường hợp phân nhóm chính được quan sát thấy trên các cây di truyền bao gồm: (1) Các trình tự của cùng một loài nằm ở các nhánh khác nhau trên cây phát sinh loài; (2) Các trình tự của các loài khác nhau thuộc cùng một nhánh; (3) Các trình tự của cùng một loài thuộc cùng một nhánh. Việc phân tích số lượng lớn các trình tự mã vạch DNA đã chỉ ra những bất cập trong việc nghiên cứu định danh và phân loại của các loài thuộc nhánh *Chlorella* từ trước tới nay. Do đó, việc nghiên cứu tìm ra phương pháp giúp định danh chính xác các loài thuộc nhánh *Chlorella* là thực sự cần thiết và làm tiền đề để hiểu rõ mối quan hệ di truyền của các loài này.

LỜI CẢM ƠN

Đề tài được thực hiện dưới sự tài trợ của Văn phòng hợp tác giữa Hội động vật học Frankfurt và Khoa Sinh - Môi trường, Trường Đại học Sư phạm, Đại học Đà Nẵng. Các tác giả trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] J. Liu, F. Chen (2014), "Biology and industrial applications of *Chlorella*: Advances and prospects", *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, **153**, DOI: 10.1007/10_2014_286.

[2] J. Singh, R.C. Saxena (2015), "An introduction to microalgae: Diversity and significance", *Handbook of Marine Microalgae*, Academic Press, DOI: 10.1016/B978-0-12-800776-1.00002-9.

[3] E.S. Krivina, A.D. Temraleeva (2020), "Identification problems and cryptic diversity of *Chlorella*-clade microalgae (*Chlorophyta*)", *Microbiology*, **89**, pp.720-732, DOI: 10.1134/S0026261720060107.

[4] N.H. Tran, J.R. Bartlett, G.S.K. Kannangara, et al. (2010), "Catalytic upgrading of biorefinery oil from micro-algae", *Fuel*, **89**(2), DOI: 10.1016/j.fuel.2009.08.015.

[5] M. Schiavon, A. Ertani, S. Parrasia, et al. (2017), "Selenium accumulation and metabolism in algae", *Aquatic Toxicology*, **189**, DOI: 10.1016/j.aquatox.2017.05.011.

[6] C. Safi, B. Zebib, O. Merah, et al. (2014), "Morphology, composition, production, processing and applications of *C. vulgaris*: A review", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **35**, pp.265-278.

[7] L. Wang, M. Min, Y. Li, et al. (2010), "Cultivation of green algae *Chlorella* sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **162**, pp.1174-1186, DOI: 10.1007/s12010-009-8866-7.

[8] C. Bock, L. Krienitz, T. Pröschold (2011), "Taxonomic reassessment of the genus *Chlorella* (*Trebouxiophyceae*) using molecular signatures (barcodes), including description of seven new species", *Fottea*, **11**(2), pp.293-312.

[9] C. Chakraborty, C.G.P. Doss, B.C. Patra, et al. (2014), "DNA barcoding to map the microbial communities: Current advances and future directions", *Applied Microbiology and Biotechnology*, **98**(8), pp.3425-3436, DOI: 10.1007/s00253-014-5550-9.

[10] L. Krienitz, C. Bock, K. Kotut, et al. (2012), "Genotypic diversity of Dictyosphaerium-morphospecies (*Chlorellaceae*, *Trebouxiophyceae*) in African inland waters, including the description of four new genera", *Fottea*, **12**(2), pp.231-253.

[11] W. Luo, T. Pröschold, C. Bock, et al. (2010), "Generic concept in *Chlorella*-related coccoid green algae (*Chlorophyta*, *Trebouxiophyceae*)", *Plant Biology*, **12**(3), pp.545-553, DOI: 10.1111/j.1438-8677.2009.00221.x.

[12] S. Zou, C. Fei, W. Yang, et al. (2018), "High-efficiency 18S microalgae barcoding by coalescent, distance and character-based approaches: A test in *Chlorella* and *Scenedesmus*", *Journal of Oceanology and Limnology*, **36**(5), pp.1771-1777, DOI: 10.1007/s00343-018-7201-y.

[13] N. Saitou, M. Nei (1987), "The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees", *Molecular Biology and Evolution*, **4**(4), pp.406-425, DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454.

[14] K. Tamura, M. Nei (1993), "Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees", *Molecular Biology and Evolution*, **10**(3), pp.512-526, DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023.

[15] J. Felsenstein (1985), "Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap", *Evolution*, **39**(4), pp.783-791, DOI: 10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x.

[16] S. Kumar, G. Stecher, K. Tamura (2016), "MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets", *Molecular Biology and Evolution*, **33**(7), pp.1870-1874, DOI: 10.1093/molbev/msw054.

[17] I. Letunic, P. Bork (2021), "Interactive tree of life (iTOL) v5: An online tool for phylogenetic tree display and annotation", *Nucleic Acids Research*, **49**(W1), pp.W293-W296, DOI: 10.1093/nar/gkab301.

[18] H.J. Lee, S.B. Hur (2012), "Comparison between phylogenetic relationships based on 18S rDNA sequences and growth by salinity of *Chlorellalike* species (*Chlorophyta*)", *Fisheries and Aquatic Sciences*, **15**(2), pp.125-135.

[19] J.N. Rosenberg, N. Kobayashi, A. Barnes, et al. (2014), "Comparative analyses of three *Chlorella* species in response to light and sugar reveal distinctive lipid accumulation patterns in the microalga *Chlorella sorokiniana*", *PLOS ONE*, **9**(4), DOI: 10.1371/journal.pone.0092460.

[20] S. Zou, C. Fei, J. Song, et al. (2016), "Combining and comparing coalescent, distance and character-based approaches for barcoding microalgae: A test with *Chlorella-like* species (*Chlorophyta*)", *PLOS ONE*, **11**(4), DOI: 10.1371/journal.pone.0153833.