

以物種專一性引子建立擬球藻與綠球藻快速辨識技術

蘇義哲·許自研*·利淑如·王淑欣·陳陽德·吳豐成

農業部水產試驗所東港養殖研究中心

摘要

無論是基礎研究、種原保存或現場應用皆需快速且準確的檢測方法來進行品種鑑定。擬球藻 (*Nannochloropsis* sp.) 與綠球藻 (*Chlorella* sp.) 在外觀上極為相似，營養組成卻有所差異，擬球藻富含二十碳五烯酸 (eicosapentaenoic acid, EPA)，綠球藻則無，EPA 對水產幼苗育成率甚為重要，使用錯誤藻類滋養餌料生物後再投餵幼苗，可能導致育成率降低。利用外觀辨識藻類可能發生誤判，以傳統的葉綠素、脂肪酸及基因定序等方法進行檢測需耗時 2-5 天不等，且成本較高。本研究根據擬球藻與綠球藻 18S 核糖體 RNA (18S ribosomal RNA, 18S rRNA) 基因序列上的差異設計物種專一性引子 (species-specific primer)，結果顯示利用物種專一性引子 NSCS 1 進行聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)，能根據擴增片段的大小不同，在 3 小時內鑑別出擬球藻與綠球藻及其交叉污染的樣品，避免因誤用藻種而影響養殖成果，有助於餌料生物的開發以及水產種苗的穩定生產。

關鍵詞：擬球藻、綠球藻、物種專一性引子、品種鑑定、18S 核糖體 RNA 基因

前言

微藻的生物多樣性極高，並且具有不同特性，可用來生產各種具高經濟價值之生物產品，生產上具有一系列的優勢，例如：生活週期短、繁殖快速、容易培養、繼代方便、成本低廉、不需要耕地、能夠在大型戶外系統或生物反應器中快速增長，微藻正逐漸成為新的生物資源，近年來不僅在食品、醫療及再生能源應用進行開發外 (Boyd *et al.*, 2020; El-Sheekh *et al.*, 2020; Fabris *et al.*, 2020)，取代飼料中魚粉成分的研究也正持續進行 (Qiao *et al.*, 2019)。

魚蝦蟹貝等水產品為人類優良蛋白質來源 (Hua *et al.*, 2019)，主要來源為捕撈及養殖，近年受氣候變遷影響，全球漁業資源恐逐漸枯竭，水產養殖所提供的養殖漁獲產量占比已超越捕撈漁業 (FAO, 2016)。為確保養殖產業穩定生產並供應漁獲，種苗育成被視為一大重點環節。水產種苗培育

是否順利，除了氣候環境外，營養充足均衡的餌料則是另一決定性的關鍵因素。考量部分種類魚苗初期口徑大小無法攝食營養充足的人工飼料，須以合適體型的餌料生物作為食物來源，可利用餌料生物其載體特性，藉由微藻提高餌料生物本身的營養價值，增加育苗的成功率 (蘇, 1999)。以仔稚魚苗為例，影響生長發育的關鍵營養素主要為高度不飽和脂肪酸 (highly unsaturated fatty acids, HUFAs)、維生素 (vitamin)、磷脂質 (phospholipid) 等。相較於淡水魚而言，其中高度不飽和脂肪酸之二十碳五烯酸 (eicosapentaenoic acid, EPA) 與二十二碳六烯酸 (docosahexaenoic acid, DHA) 對於海水魚苗更為重要，因海水魚無法將十八碳的多元不飽和脂肪酸 (poly-unsaturated fatty acids, PUFAs) 生物轉化 (biotransformation) 為 EPA 與 DHA，而需透過外界攝食而取得，故 EPA 與 DHA 為海水魚類之必需脂肪酸 (essential fatty acid, EFA) (Tocher, 2003; Turchini *et al.*, 2009)。目前海水魚育苗主要使用富含 DHA 的等鞭金藻 (*Isochrysis* sp.) 以及富含 EPA 的擬球藻 (*Nannochloropsis* sp.) (Renaud *et al.*, 1991)，擬球藻由水產試驗所東港養殖研究中心研究人員於 1987 年自日本引進後，用於輪蟲培養與

*通訊作者 / 屏東縣東港鎮豐漁街 67 號; TEL: (08)8324-121 轉 285; FAX: (08)8320-234; E-mail: zyxu@mail.tfrin.gov.tw

營養強化、魚池水色營造使用，為海水魚類育苗的主要藻種之一。

綠球藻 (*Chlorella* sp.) 又稱小球藻，係綠藻門 (Chlorophyta)、共球藻綱 (Trebouxiophyceae)、小球藻目 (Chlorellales)、小球藻科 (Chlorellaceae)，為綠色小球體，直徑範圍較大，落在 2-10 μm 間。擬球藻分類上為金藻門 (Chrysophycophyta)、真眼點藻綱 (Eustigmatophyceae)、真眼點藻目 (Eustigmatales)、單珠藻科 (Monodopsidaceae)，亦為綠色小球體，直徑在 2 - 4 μm 間，外觀與綠球藻極為相似，故被稱為擬 (綠) 球藻。綠球藻成長增殖時呈四分裂與擬球藻之二分裂相異 (Maruyama *et al.*, 1986)。在藻體葉綠素 (chlorophyll) 組成方面，綠球藻係屬綠藻門，光合色素成分含葉綠素 *a* 及葉綠素 *b*，擬球藻因屬真眼點藻綱僅含葉綠素 *a* (Hoek *et al.*, 1996; Lubián *et al.*, 2000)。在藻體脂肪酸組成部分，綠球藻不含 EPA，擬球藻則富含 EPA (Boussiba *et al.*, 1987; Ötleş and Pire, 2001)，如誤用不含 EPA 的綠球藻來維持水色或是滋養輪蟲後再投餵魚苗，則對魚苗育成率與品質有一定程度的影響，因此開發快速準確的藻種辨識技術為必要之務。

因受限於環境設備與人員經驗不足，鮮少會在養殖現場進行藻種辨識，通常直接購入擬球藻藻種進行擴大培養，再倒入育苗魚池中營造水色。具有分析設備的實驗室人員，目前常用來辨識藻種的方法有以下四種：一、利用顯微鏡檢視：此法雖然快速方便，但由於外觀辨識須由具備足夠經驗與觀察力的人員進行操作，仍有誤判之可能；二、藻體葉綠素組成分析：此法為利用葉綠素組成差異進行分辨，須先破壞細胞壁後以溶劑萃取，再藉由分光光度計量測其葉綠素組成種類，過程約需 2 天，較為耗時不便 (金等, 2010)；三、藻體脂肪酸組成分析：此法係利用藻體脂肪酸組成差異進行分辨，須破壞細胞壁後萃取油脂，以有機溶劑將脂肪酸甲酯化 (methyl esterification) 後，再利用氣相層析儀進行比對分析，所需天數約為 3 天，操作繁瑣耗時不便 (蘇等, 2014)；四、利用基因定序區分藻種：此法最為直接準確，但因硬體設備限制，通常委託民間基因定序公司進行，所需天數約 3 - 5 天，成本及時間花費高。以上方法若在藻種樣品有交叉污染的情況下，更是難以判斷，因此開

發快速準確的鑑定方法是有其必要性。

許多類型的分子技術已被應用於物種鑑定，包括限制性片段長度多態性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP)、擴增片段長度多態性 (amplified fragment length polymorphism, AFLP)、隨機擴增多態性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD)、單鏈構象多態性 (single-strand conformation polymorphism, SSCP)、DNA 序列分析和物種專一性引子 PCR (species-specific primer) 等方法 (Wu *et al.*, 2014; Fahmy *et al.*, 2015; Murphy *et al.*, 2015; Varadinova *et al.*, 2015)。在這些技術中，物種專一性引子是一種基於 PCR 原理，常用於相似物種鑑定的檢測方法，因其高靈敏度、專一性和便利性而成為一種常用的物種鑑定技術 (Aguirre *et al.*, 2015)，例如：細菌 (Matsuki *et al.*, 1999)、酵母菌 (Muir *et al.*, 2011)、線蟲 (AL-Banna *et al.*, 2004)、象鼻蟲 (Curculionidae) (Aguirre *et al.*, 2015)、嚙蟲目昆蟲 (Psocoptera) (Zhao *et al.*, 2016)、河豚 (*Takifugu* spp.) (Dong *et al.*, 2019) 等。許多文獻利用 18S 核醣體 RNA (18S ribosomal RNA, 18S rRNA) 的基因序列來進行微藻的物種鑑定 (Rasoul-Amini *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2014)，特別是綠球藻種類的辨識 (Wan *et al.*, 2011; Tear *et al.*, 2013; Khaw *et al.*, 2020)，但目前尚無文獻利用物種專一性引子的方法區分擬球藻與綠球藻這兩個藻種。

在本研究中，透過此檢測方法的開發，根據物種專一性引子的高靈敏度，能從綠球藻及擬球藻的基因組 DNA (genomic DNA, gDNA) 中擴增出大小不同的 PCR 產物，進而能夠快速準確地鑑別出綠球藻及擬球藻。

材料與方法

一、藻類樣品及基因組 DNA 萃取

本研究所使用的擬球藻三株、綠球藻 11 株均取自水產試驗所東港養殖研究中心。藻種取得後分別以 500 ml 錐形瓶連續打氣培養，培養環境溫度範圍為 26 - 28°C，光照條件為全光照，表面光強度約 280 - 400 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ ，培養液為 Walne 配方 (Walne, 1974)。藻種樣品採樣時依序進行樣品編

Table 1 Primers used in this study

Name of primer	5'-----3'	Size (mer)	Temperature (°C)	Product (bp)
CS 18S F1	GCTAATACGTGCGTAAATCCCGACTTC	27	60	1503
CS 18S R1	ACACCCAATCGGTAGGAGCGACG	23	61	
NS 18S F1	CTCTGAATCTGCGAATGGCTCATTATATC	29	59	1661
NS 18S R1	GATGAGGTTTAGATAACTTCTCACGCTG	28	58	
CS F1	GCATGTCTAAGTATAAACTGCTTTATACTGTG	32	58	344
NS F1	TACATGCATCAACTCCCAACTGCTTGTC	28	60	229
NSCS R1	AGGCTCCCTCTCCGGAATCGAAC	23	61	
NSCS F2	AGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAG	26	61	
CS R2	ACAGCAAGATAGGCGCCGTCAGTGC	25	63	139
NS R2	GCGTGCAAACCAACAAAATAGACCACC	27	60	290
NSCS F3	AAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAG	27	63	
CS R3	TGTTATTGCCTCATGCTTCCATTGGCTAG	29	60	293
NS R3	GTTCGTTAACGGAATTAACCAGACAAATCACT	32	59	180

號、外觀拍照記錄，離心後採集藻體儲存於 99%酒精溶液中，於-20°C 保存，以備後續實驗使用。外觀形態則根據顯微鏡鏡檢等形態學特徵進行記錄。基因組 DNA 抽取方法參照植物組織抽取套組 (taco™ Plant DNA/RNA Extraction Kit) 進行抽取，經萃取後的 DNA 樣品於-80°C 冰箱保存，以備後續實驗使用。

二、18S rRNA 基因序列分析

本研究依據美國國家生物技術資訊中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 基因資料庫 (Madden *et al.*, 1996) 上所提供之 11 條擬球藻 18S rRNA 基因序列 (accession number: MG920501.1, KC594687.1, GU220364.1, KU900229.1, U38902.1, AF045045.1, AF045044.1, KJ756827.1, KJ756833.1, KU342038.1, HQ710566.1) 與 12 條綠球藻 18S rRNA 基因序列 (accession number: AF514413.1, LC385651.1, MT992791.1, KF879600.1, Y12816.1, LC535350.1, KF879591.1, KF879601.1, KF879597.1, KF879594.1, KF879592.1, KF879587.1)，利用歐洲生物資訊研究所 (European Bioinformatics Institute, EBI) 歐洲分子生物學實驗室 (European Molecular Biology Laboratory, EMBL) 網站的多重序列比對軟體 (multiple sequence alignment, MSA) (Kanz *et al.*, 2005)，找出基因序列上的差異。

三、18S rRNA 基因引子設計

18S rRNA 基因序列常作為物種鑑定使用，其引子主要是根據同物種序列中的高度保留區而設計，對同物種具有很高的專一性。擬球藻與綠球藻 18S rRNA 序列分別以多重序列比對軟體進行比對後，根據其基因序列上相似度高的保留區域，各設計了一組引子 (擬球藻：NS18S F1 primer: 5'-CTCTGAATCTGCGAATGGCTCATTATATC-3' 與 NS18S R1 primer: 5'-GATGAGGTTTAGATAA CTTCTCACGCTG-3'；綠球藻：CS18S F1 primer: 5'-GCTAATACGTGCGTAAATCCCGACTTC-3' 與 CS18S R1 primer: 5'-ACACCCAATCGGTAGG AGCGACG-3') (Table 1)。擬球藻與綠球藻 18S rRNA 引子委由基龍米克斯生物科技股份有限公司進行合成。

四、物種專一性引子設計

利用 DNASTAR 軟體及多重序列比對軟體對擬球藻與綠球藻的 18S rRNA 序列進行比對，根據基因序列上的差異，設計了三組物種專一性引子，代號分別為 NSCS 1、NSCS 2 及 NSCS 3 (Table 1)，每組引子中均包含一條高度保留序列作為共用引子，以及兩條針對不同物種間基因序列差異所設計的物種專一性引子，藉由擴增出 PCR 產物的大小不同，進而區分藻種。NSCS 1 引子內含：

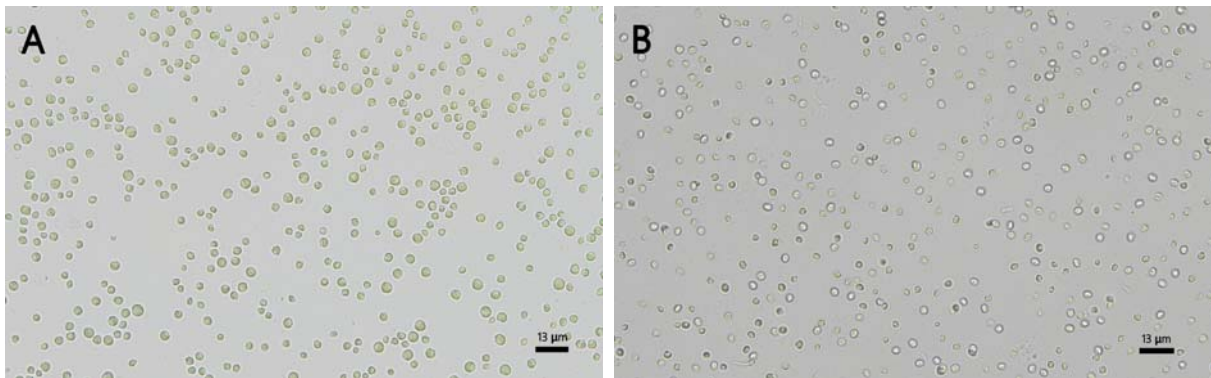


Fig. 1 *Chlorella* sp. (A) and *Nannochloropsis* sp. (B) are very similar in appearance and shape. The scale bars for (A) and (B) = 13µm.

CS F1 primer : 5'-GCATGTCTAAGTATAAACTGC TTTATACTGTG-3'、NS F1 primer : 5'-TACATGC ATCAACTCCCAACTGCTTGTC-3' 與 NSCS R1 primer : 5'-AGGCTCCCTCTCCGGAATCGAAC-3' ; NSCS 2 引子內含 : NSCS F2 primer : 5'-AGCCGC GG TAATTCAGCTCCAATAG-3'、NS R2 primer : 5'-GCGTGCAAACCAACAAAATAGACCACC-3' 與 CS R2 primer 5'-ACAGCAAGATAGGCGCCGTCAG TGC-3' ; NSCS 3 引子內含 : NSCS F3 primer : 5'-AAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAG-3'、NS R3 primer : 5'-GTTCGTAACGGAATTAACCAGAC AAATCACT-3'、CS R3 primer : 5'-TGTTATTGCC TCATGCTTCCATTGGCTAG-3' (Table 1), 引子委由基龍米克斯生物科技股份有限公司進行合成。

五、PCR 條件及膠體電泳

綠球藻 18S rRNA 的 PCR 條件為分別取 10 µl 的 Master Mix (KAPA KK1024 KAPA Taq Ready Mix, Merck) 10 µl 去離子水，加入 CS18S 引子各 1 µl (10 µM)，最後加入 1 µl 的綠球藻 DNA 樣本至 PCR 離心管內 (約 23 µl)。擬球藻 18S rRNA 的 PCR 條件除更換為擬球藻 DNA 樣本及 NS18S 引子各 1 µl，其他條件與綠球藻 18S rRNA 的 PCR 條件相同。將上述離心管置於 PCR 儀器中設定升降溫程序。PCR 循環包括在 94°C 下加熱 5 分鐘的初始步驟，隨後是 35 個循環，即 95°C 加熱 30 秒、58°C 加熱 30 秒、72°C 加熱 1 分 30 秒，最後在 72°C 下加熱 7 分鐘。

NSCS 物種專一性引子的 PCR 條件為分別取

10 µl 的 Master Mix (KAPA KK1024 KAPA Taq Ready Mix, Merck) 及 10 µl 去離子水，再加入 NSCS 引子各 1 µl (10 µM)，最後加入 1 µl 的 DNA 樣本至 PCR 離心管內 (約 24 µl)，且設置一組陰性對照組。將上述離心管置於 PCR 儀器中設定升降溫程序。PCR 循環包括在 94°C 下加熱 5 分鐘的初始步驟，隨後是 35 個循環，即 95°C 加熱 30 秒、63°C 加熱 30 秒、72°C 加熱 30 秒，最後在 72°C 下加熱 7 分鐘。

配置 1.5%濃度的電泳膠體，將 PCR 產物樣本添加 DNA 染劑 (DNA VIEW TT-DNA01, 圖爾思生技) 注入電泳膠體孔槽中，以 100 bp DNA ladder (DM001-R500, GeneDireX™) 為對照，以電壓 100 V 進行電泳 15 分鐘，再將膠體放置於紫外光箱中，以相機拍攝 DNA 條帶。

六、基因定序及分析

分別將所擴增的 PCR 產物從電泳膠體切出後，委由生技公司 (基龍米克斯) 進行定序，採用 Chromas 軟體查看序列峰形圖及編輯，將基因定序結果利用 NCBI BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, BLAST) 比對軟體與 NCBI 基因資料庫進行序列比對。

結果與討論

由於擬球藻與綠球藻在某些生長階段，其外觀形質上極為相似 (Fig. 1)，營養組成卻有所差異，擬球藻富含水產幼苗發育所必需的 EPA，而

綠球藻則無，因此正確辨識藻種對於水產幼苗發育及存活率甚為重要。若以鏡檢方式辨識藻類外觀加以鑑定，即使交由具備敏銳觀察力及經驗豐富的操作人員執行，仍有誤判之可能；分析藻體葉綠素種類組成、脂肪酸種類組成或基因定序等方法，不僅耗費時間長且需使用有機溶劑，所需投入之檢測成本亦相當高。若此兩種藻類種原有交互污染的情況下更加難以判斷，因此需進一步開發新的鑑定方法。

18S rRNA 引子設計根據 NCBI 基因資料庫中公開的 11 條擬球藻 18S rRNA 基因序列與 12 條綠球藻 18S rRNA 基因序列，利用 EMBL-EBI 網站多重序列比對軟體進行比對 (Fig. 2)。根據擬球藻與綠球藻 18S rRNA 序列的高度保留區各設計一組引子 (Table 1)，分別進行 PCR 反應，擴增出綠球藻 18S rRNA 基因片段 1,503 bp，擬球藻 18S rRNA 基因片段 1,661 bp (Fig. 3)。

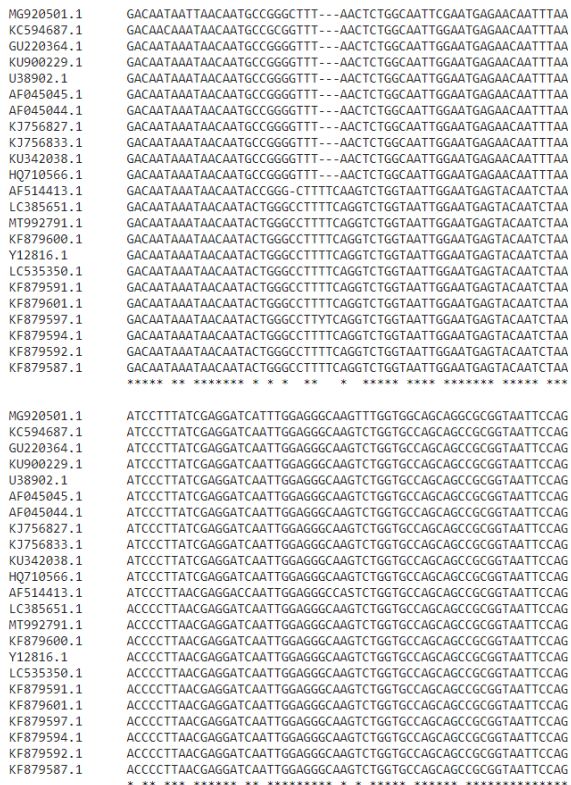


Fig. 2 Multiple sequence alignment results for *Nannochloropsis* sp. and *Chlorella* sp. genomic DNA 18S rRNA genes. *Indicates that the sequence is consistent.

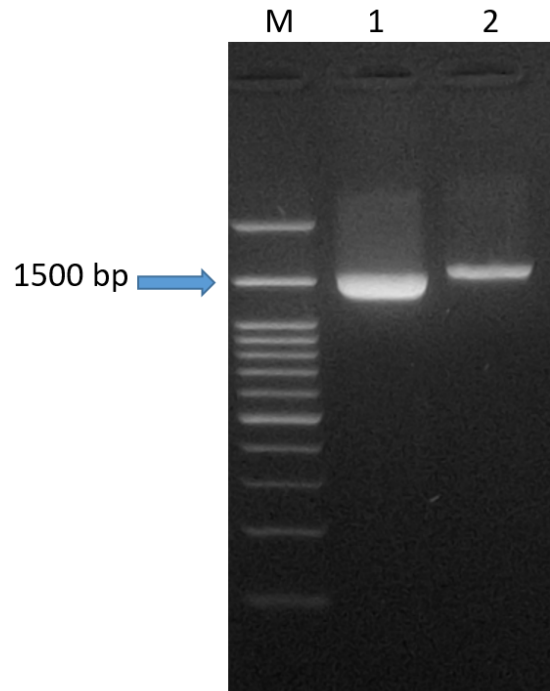


Fig. 3 PCR results of *Chlorella* sp. and *Nannochloropsis* sp. genomic DNA with CS 18S and NS 18S primer. Lane M: 100 bp DNA ladder, Lane 1: *Chlorella* sp. (1,503 bp), Lane 2: *Nannochloropsis* sp. (1,661 bp).

除了檢測 NS18S 與 CS18S 引子所擴增 PCR 產物片段大小是否符合外，分別將所擴增的 PCR 產物進行基因定序及比對。綠球藻 CS18S 之 PCR 產物序列與 NCBI 基因資料庫進行比對 (Fig. 4A)，結果顯示定序結果與綠球藻 18S rRNA 基因序列 (accession number: MN879272.1) 符合，一致性高達 99% (Fig. 4B)。擬球藻 NS18S 引子所擴增之 PCR 產物經定序後，將基因序列與 NCBI 基因資料庫進行比對 (Fig. 5A)，定序結果與擬球藻 18S rRNA 基因序列 (accession number: MN160639.1) 符合，一致性達 99% (Fig. 5B)，由定序結果確認本研究使用的藻種樣品分別為擬球藻與綠球藻。

物種專一性引子係利用 DNASTAR 軟體及多重序列比對軟體進行擬球藻與綠球藻的 18S rRNA 序列比對，根據擬球藻與綠球藻 18S rRNA DNA 序列上的鹼基差異進行設計 (Fig. 6)，共設計了 NSCS 1、NSCS 2 及 NSCS 3，三組物種專一性引子 (Table 1)，每組引子中均包含一條高度保留序列作為共用引子，以及兩條針對不同物種間基因序列差異所設計的物種專一性引子，藉由擴增出大小不同的 PCR 產物，進而區分擬球藻與綠球藻。

(A)

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Chlorella sp. UMT-B13 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Chlorella sp. UMT...	2713	2713	98%	0.0	99.66%	1697	MN879272.1
<input checked="" type="checkbox"/> Parachlorella kessleri NKG021201 gene for 18S ribosomal RNA, partial sequence	Parachlorella kes...	2713	2713	98%	0.0	99.66%	1731	LC505553.1
<input checked="" type="checkbox"/> Chlorella sp. UPMC-A0075 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Chlorella sp. UP...	2713	2713	98%	0.0	99.66%	1679	MH166732.1
<input checked="" type="checkbox"/> Dicloster acuatius strain Xmm25W2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Dicloster acuatius	2713	2713	98%	0.0	99.66%	1716	KY054950.1
<input checked="" type="checkbox"/> Dicloster acuatius strain Xmm31W2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Dicloster acuatius	2713	2713	98%	0.0	99.66%	1707	KY054949.1
<input checked="" type="checkbox"/> Dictyosphaerium ehrenbergianum isolate Xmm36S6 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Dictyosphaerium ...	2713	2713	98%	0.0	99.66%	1713	KJ561148.1
<input checked="" type="checkbox"/> Masaia oloidia isolate Xmm36S4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Masaia oloidia	2713	2713	98%	0.0	99.66%	1713	KJ561130.1
<input checked="" type="checkbox"/> Parachlorella kimitsuensis NIES-3827 gene for 18S ribosomal RNA, partial sequence	Parachlorella kim...	2713	2713	98%	0.0	99.66%	1660	LC779591.1
<input checked="" type="checkbox"/> Chlorella sp. TNBR1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Chlorella sp. TN...	2713	2713	98%	0.0	99.66%	1792	KR869729.1
<input checked="" type="checkbox"/> Parachlorella sp. NS001C NS001C gene for 18S rRNA, partial sequence	Parachlorella sp. ...	2713	2713	98%	0.0	99.66%	1751	LC636332.1

(B)

***Chlorella* sp. UMT-B13 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence**

Sequence ID: [MN879272.1](#) Length: 1697 Number of Matches: 1

Range 1: 114 to 1598 [GenBank](#) [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2713 bits(1469)	0.0	1480/1485(99%)	1/1485(0%)	Plus/Plus
Query 7	TAAAACGGGCG-AAATCCC	GACTTCTGGAAGGGGCGTATTTATTAGATTTAAGGCCGACC		65
Sbjct 114	TAATACGTGCGTAAACCCCGACTCCTGGAAGGGGCGTATTTATTAGATTTAAGGCCGACC			173
Query 66	CGGCTCTGCCGGTCTCGCGGTGAATCATGATAA	CTCAGCAATCGCATGGCCTTGTGCCG		125
Sbjct 174	CGGCTCTGCCGGTCTCGCGGTGAATCATGATAA	CTCAGCAATCGCATGGCCTTGTGCCG		233
Query 126	GCGATGTTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTT	CGATGGTAGGATAGAGGCTACCA		185
Sbjct 234	GCGATGTTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTT	CGATGGTAGGATAGAGGCTACCA		293
Query 186	TGGTGGTAACGGGTGACGGAGGATTAGGGTT	CGATCCGGAGAGGAGCCTGAGAAACGG		245
Sbjct 294	TGGTGGTAACGGGTGACGGAGGATTAGGGTT	CGATCCGGAGAGGAGCCTGAGAAACGG		353
Query 246	CTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAA	TACCAATCCTGACACAGGGAGGTA		305
Sbjct 354	CTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAA	TACCAATCCTGACACAGGGAGGTA		413
Query 306	GTGACAATAAATAACAATACCGGGCCTTTTCAGGT	CTGGTAATTGGAATGAGTACAATCT		365
Sbjct 414	GTGACAATAAATAACAATACCGGGCCTTTTCAGGT	CTGGTAATTGGAATGAGTACAATCT		473
Query 366	AAACCCCTTAACGAGGATCAATTGGAGGGCAAGT	CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCC		425
Sbjct 474	AAACCCCTTAACGAGGATCAATTGGAGGGCAAGT	CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCC		533
Query 426	AGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGCTGCAGTT	AAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCCGGGC		485
Sbjct 534	AGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGCTGCAGTT	AAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCCGGGC		593

Fig. 4 (A) Alignment results of PCR products amplified by CS 18S primer with *Chlorella* sp. genomic DNA. (B) The results show 99.66% identity with *Chlorella* sp. genomic DNA 18S rRNA gene (accession number: MN879272.1).

利用物種專一性引子 NSCS 1 所擴增的 PCR 產物長度，綠球藻為 344 bp，而擬球藻為 229 bp，經電泳後可得到大小符合的相對應條帶，陰性對照組則無 PCR 產物擴增，將擬球藻與綠球藻基因組 DNA 混合後進行 PCR 反應，則出現兩條條帶。電泳結果證實物種專一性引子 NSCS 1 能明確區

分擬球藻與綠球藻，且能藉由此結果來判別樣品是否交叉污染 (Fig. 7)。物種專一性引子 NSCS 2 所擴增的 PCR 產物長度，綠球藻為 139 bp，而擬球藻為 290 bp，但電泳結果發現引子專一性不佳且有非專一性產物擴增 (Fig. 8)，故 NSCS 2 不適合做為藻種鑑定使用。

(A)

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Nannochloropsis oceanica strain IPPAS D-734 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Nannochloropsis oceanica	2974	2974	96%	0.0	99.69%	1678	MN160639.1
<input checked="" type="checkbox"/> Nannochloropsis oceanica strain LAMB2011 chromosome 14	Nannochloropsis oceanica	2974	5942	96%	0.0	99.69%	961379	CP038111.1
<input checked="" type="checkbox"/> Nannochloropsis oceanica strain IMP-BG-006 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Nannochloropsis oceanica	2974	2974	96%	0.0	99.69%	1677	MG224777.1
<input checked="" type="checkbox"/> Nannochloropsis oceanica 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Nannochloropsis oceanica	2974	2974	97%	0.0	99.63%	1647	KY399778.1
<input checked="" type="checkbox"/> Nannochloropsis oceanica 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Nannochloropsis oceanica	2974	2974	96%	0.0	99.69%	1645	KY399777.1
<input checked="" type="checkbox"/> Nannochloropsis oceanica gene for 18S ribosomal RNA, partial sequence, strain CCNM1081	Nannochloropsis oceanica	2974	2974	96%	0.0	99.69%	1687	LC189504.1
<input checked="" type="checkbox"/> Nannochloropsis oceanica strain IMET-1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Nannochloropsis oceanica	2974	2974	96%	0.0	99.69%	1686	KR904905.1
<input checked="" type="checkbox"/> Nannochloropsis oceanica strain CS-179 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Nannochloropsis oceanica	2974	2974	96%	0.0	99.69%	1713	KT031995.1
<input checked="" type="checkbox"/> Nannochloropsis oceanica NIES 2146 gene for 18S rRNA, partial sequence	Nannochloropsis oceanica	2974	2974	96%	0.0	99.69%	1751	LC730857.1
<input checked="" type="checkbox"/> Nannochloropsis oceanica NIES 2145 gene for 18S rRNA, partial sequence	Nannochloropsis oceanica	2974	2974	96%	0.0	99.69%	1751	LC730856.1

(B)

***Nannochloropsis oceanica* strain IPPAS D-734 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence**

Sequence ID: [MN160639.1](#) Length: 1678 Number of Matches: 1

Range 1: 25 to 1651 [GenBank](#) [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2974 bits(1610)	0.0	1622/1627(99%)	4/1627(0%)	Plus/Plus
Query 31	GCTCATCATATCAGT-ATAGTTTA-TTGATAGTCCTTTACTACTTGGAT-ACCGTAGTAA	87		
Sbjct 25	GCTCATTATATCAGTTATAGTTTATTTGATAGTCCTTTACTACTTGGATAACCGTAGTAA	84		
Query 88	TTCTAGAGCTAATACATGCATCAACTCCCAACTGC-TGTCGGACGGGATGATTTTATTAG	146		
Sbjct 85	TTCTAGAGCTAATACATGCATCAACTCCCAACTGCTTGTGGACGGGATGATTTTATTAG	144		
Query 147	ATAGAAACCAATGCGGGGCAACCCGGTATTGTGGTGAATCATGATAAATTTGCGGATCGC	206		
Sbjct 145	ATAGAAACCAATGCGGGGCAACCCGGTATTGTGGTGAATCATGATAAATTTGCGGATCGC	204		
Query 207	CGGCTTTTGCCAGCGACGAATCATTCAAGTTTCTGCCCTATCAGCTTTGGATGGTAGGGT	266		
Sbjct 205	CGGCTTTTGCCAGCGACGAATCATTCAAGTTTCTGCCCTATCAGCTTTGGATGGTAGGGT	264		
Query 267	ATTGGCCTACCATTGGCTCTAACGGGTAACGGAGAATTGGGGTTCGATTCGGAGAGGGAG	326		
Sbjct 265	ATTGGCCTACCATTGGCTCTAACGGGTAACGGAGAATTGGGGTTCGATTCGGAGAGGGAG	324		
Query 327	CCTGAGAGACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCAGGTAATACCAATCCTGA	386		
Sbjct 325	CCTGAGAGACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCAGGTAATACCAATCCTGA	384		
Query 387	CACAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATGCCGGGGTTAACTCTGGCAATTGGAATGA	446		
Sbjct 385	CACAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATGCCGGGGTTAACTCTGGCAATTGGAATGA	444		
Query 447	GAACAATTTAAATCCCTTATCGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGC	506		
Sbjct 445	GAACAATTTAAATCCCTTATCGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGC	504		

Fig. 5 (A) Alignment results of PCR products amplified by NS 18S primer with *Nannochloropsis* sp. genomic DNA. (B) The results show 99.69% identity with *Nannochloropsis* sp. genomic DNA 18S rRNA gene (accession number: MN160639.1).

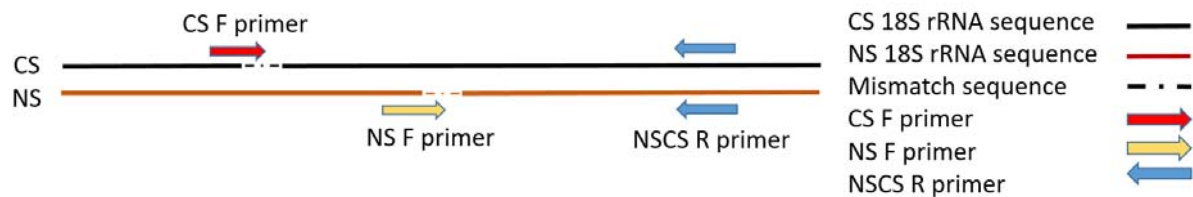


Fig. 6 Schematic of NSCS species-specific primer design.

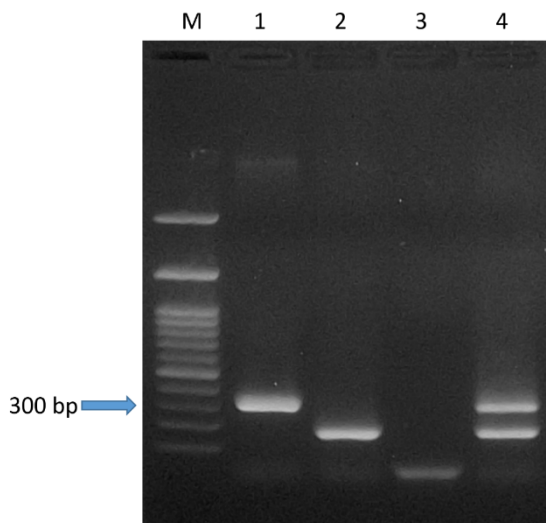


Fig. 7 PCR results of NSCS 1 species-specific primer. Lane M: 100 bp DNA ladder, Lane 1: *Chlorella* sp. (344 bp), Lane 2: *Nannochloropsis* sp. (229 bp), Lane 3: negative control, Lane 4: *Chlorella* sp. and *Nannochloropsis* sp. genomic DNA mixed sample; according to the PCR product size, NSCS 1 species-specific primer can identify *Chlorella* sp. and *Nannochloropsis* sp.

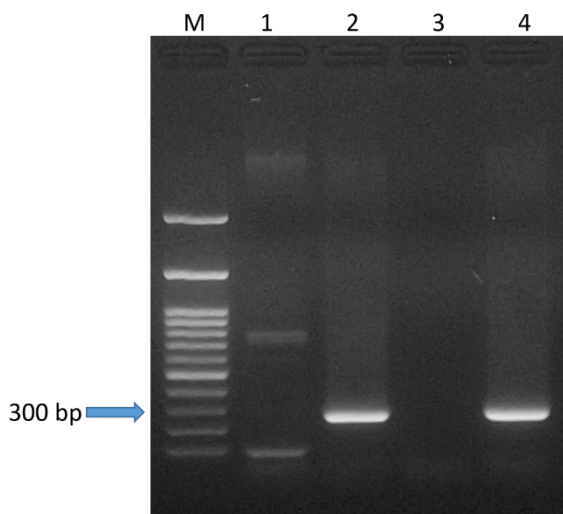


Fig. 8 PCR results of NSCS 2 species-specific primer. Lane M: 100 bp DNA ladder, Lane 1: *Chlorella* sp. (139 bp), Lane 2: *Nannochloropsis* sp. (290 bp), Lane 3: negative control, Lane 4: *Chlorella* sp. and *Nannochloropsis* sp. genomic DNA mixed sample; according to PCR product size, NSCS 2 species-specific primer can not identify *Chlorella* sp. and *Nannochloropsis* sp.

利用物種專一性引子 NSCS 3 所擴增的 PCR 產物長度，綠球藻為 293 bp，而擬球藻為 180 bp，陰性對照組則無 PCR 產物擴增，將擬球藻與綠球

藻基因組 DNA 混合後進行 PCR 反應，可得到兩個大小符合的相對應條帶，由電泳結果確認物種專一性引子 NSCS 3 能明確區分擬球藻與綠球藻，且能藉由電泳結果來檢測藻種樣品是否交叉汙染 (Fig. 9)。結果發現物種專一性引子 NSCS 1 及 NSCS 3 皆能清楚區分綠球藻及擬球藻。

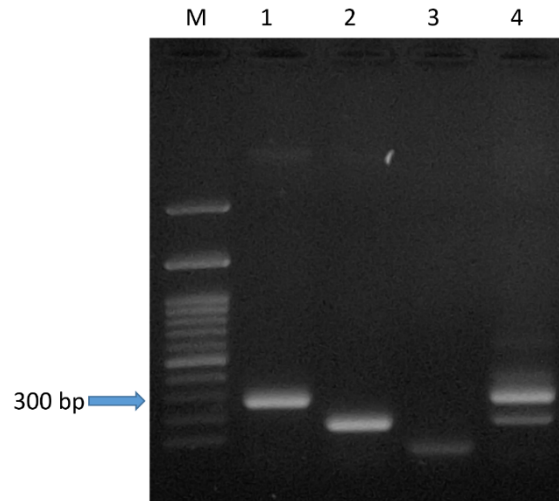


Fig. 9 PCR results of NSCS 3 species-specific primer. Lane M: 100 bp DNA ladder, Lane 1: *Chlorella* sp. (293 bp), Lane 2: *Nannochloropsis* sp. (180 bp), Lane 3: negative control, Lane 4: *Chlorella* sp. and *Nannochloropsis* sp. genomic DNA mixed sample; according to PCR product size, NSCS 3 species-specific primer can identify *Chlorella* sp. and *Nannochloropsis* sp.

綠球藻經 NSCS 1 引子擴增後的 PCR 產物從電泳膠體切出後，委由基因定序公司進行定序，與 NCBI 基因資料庫進行比對 (Fig. 10A)，結果顯示與綠球藻 18S rRNA (accession number: MN879266.2) 基因序列符合，一致性達 99% (Fig. 10B)。擬球藻經 NSCS 1 引子擴增後的 PCR 產物經定序後，進行 NCBI 基因資料庫序列比對 (Fig. 11A)，結果顯示與擬球藻 18S rRNA 基因序列 (accession number: CP044589.1) 符合，一致性達 100% (Fig. 11B)。

綠球藻及擬球藻經 NSCS 3 引子進行擴增後的 PCR 產物經基因定序後與 NCBI 基因資料庫進行比對，結果顯示綠球藻樣品與綠球藻 18S rRNA 基因序列 (accession number: MN879266.2) 符合，一致性達 100% (data not shown)。擬球藻樣品與擬

(A)

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Chlorella sp. UMT-B8 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Chlorella sp. UM...	628	628	99%	2e-175	99.71%	1746	MN879266.2
<input checked="" type="checkbox"/> Chlorella sp. isolate Pozzillo small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Chlorella sp.	628	628	99%	2e-175	99.71%	556	MT259188.1
<input checked="" type="checkbox"/> Chlorella sp. isolate Barcarello small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Chlorella sp.	628	628	99%	2e-175	99.71%	494	MT259187.1
<input checked="" type="checkbox"/> Chlorella sp. UMT-B13 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Chlorella sp. UM...	628	628	99%	2e-175	99.71%	1697	MN879272.1
<input checked="" type="checkbox"/> Parachlorella kessleri NKG021201 gene for 18S ribosomal RNA, partial sequence	Parachlorella ke...	628	628	99%	2e-175	99.71%	1731	LC505553.1
<input checked="" type="checkbox"/> Dictyosphaerium libertatis strain Xmm7S1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Dictyosphaerium...	628	628	99%	2e-175	99.71%	1714	KY054951.1
<input checked="" type="checkbox"/> Dicloster acuatius strain Xmm25W2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Dicloster acuatius	628	628	99%	2e-175	99.71%	1716	KY054950.1
<input checked="" type="checkbox"/> Dicloster acuatius strain Xmm31W2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Dicloster acuatius	628	628	99%	2e-175	99.71%	1707	KY054949.1
<input checked="" type="checkbox"/> Dicloster acuatius strain Xmm20W1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Dicloster acuatius	628	628	99%	2e-175	99.71%	1716	KY054948.1
<input checked="" type="checkbox"/> Chlorella sp. HN08 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Chlorella sp. HN08	628	628	99%	2e-175	99.71%	1716	KX943590.1

(B)

Chlorella sp. UMT-B8 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequenceSequence ID: [MN879266.2](#) Length: 1746 Number of Matches: 1Range 1: 25 to 368 [GenBank](#) [Graphics](#)▼ [Next Match](#) ▲ [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
628 bits(340)	2e-175	343/344(99%)	1/344(0%)	Plus/Plus
Query 2	TGCATGTCTAA-TATAAACTGCTTTTACTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGT	60		
Sbjct 25	TGCATGTCTAAGTATAAACTGCTTTTACTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGT	84		
Query 61	TATAGTTTATTTGATGGTACCTTACTACCGGATAACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATACG	120		
Sbjct 85	TATAGTTTATTTGATGGTACCTTACTACCGGATAACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATACG	144		
Query 121	TGCGTAAACCCCGACTCCTGGAAGGGGCGTATTTATTAGATTTAAGGCCGACCCGGCTCT	180		
Sbjct 145	TGCGTAAACCCCGACTCCTGGAAGGGGCGTATTTATTAGATTTAAGGCCGACCCGGCTCT	204		
Query 181	GCCGGTCTCGCGGTGAATCATGATAACTTCACGAATCGCATGGCCTTGTGCCGGCGATGT	240		
Sbjct 205	GCCGGTCTCGCGGTGAATCATGATAACTTCACGAATCGCATGGCCTTGTGCCGGCGATGT	264		
Query 241	TTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTTCGATGGTAGGATAGAGGCCTACCATGGTGGT	300		
Sbjct 265	TTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTTCGATGGTAGGATAGAGGCCTACCATGGTGGT	324		
Query 301	AACGGGTGACGGAGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCT	344		
Sbjct 325	AACGGGTGACGGAGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCT	368		

Fig. 10 (A) Alignment results of PCR products amplified by NSCS 1 primer with *Chlorella* sp. genomic DNA. (B) The results show 99% identity with *Chlorella* sp. genomic DNA 18S rRNA gene (accession number: MN879266.2).

球藻 18S rRNA 基因序列 (accession number: AB025533.1) 符合，一致性達 99% (data not shown)。但因 NSCS 3 所擴增的擬球藻 18S rRNA 基因序列太短 (180 bp)，NCBI 基因資料庫比對結果專一性不高 (data not shown)，序列辨識度較低，故本研究建議使用物種專一性引子 NSCS 1 應用於擬球藻與綠球藻快速品種鑑定。

本研究設計的物種專一性引子 NSCS 1 引子

可透過 PCR 反應擴增目標基因片段，以膠體電泳法區分目標基因片段的大小不同，可在三小時內快速準確的區分出擬球藻與綠球藻及其交叉污染的樣品，除可降低時間及成本的花費，減少有機溶劑的使用外，並提供基因定序上的驗證，避免因藻種的誤用而影響養殖成果，本技術將有助於養殖產業餌料生物的開發應用以及維持水產種苗的穩定生產。

(A)

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Nannochloropsis oceanica strain BR2 chromosome 14	Nannochloropsis oceanica	427	427	99%	5e-115	100.00%	914843	CP044589.1
<input checked="" type="checkbox"/> Nannochloropsis oceanica strain KB1 chromosome 14	Nannochloropsis oceanica	427	427	99%	5e-115	100.00%	878997	CP044557.1
<input checked="" type="checkbox"/> Nannochloropsis oceanica strain IPPAS D-734 small subunit ribosomal RNA gene partial sequence	Nannochloropsis oceanica	427	427	99%	5e-115	100.00%	1678	MN160639.1
<input checked="" type="checkbox"/> Nannochloropsis oceanica strain LAMB2011 chromosome 6	Nannochloropsis oceanica	427	427	99%	5e-115	100.00%	1340162	CP038132.1
<input checked="" type="checkbox"/> Nannochloropsis oceanica strain LAMB2011 chromosome 2	Nannochloropsis oceanica	427	427	99%	5e-115	100.00%	1596162	CP038117.1
<input checked="" type="checkbox"/> Nannochloropsis oceanica strain LAMB2011 chromosome 14	Nannochloropsis oceanica	427	855	99%	5e-115	100.00%	961379	CP038111.1
<input checked="" type="checkbox"/> Nannochloropsis oceanica isolate KSPA38 small subunit ribosomal RNA gene partial sequence	Nannochloropsis oceanica	427	427	99%	5e-115	100.00%	840	MK158312.1
<input checked="" type="checkbox"/> Nannochloropsis sp. isolate PJ2 small subunit ribosomal RNA gene partial sequence	Nannochloropsis sp.	427	427	99%	5e-115	100.00%	1748	MH444206.1
<input checked="" type="checkbox"/> Nannochloropsis oceanica strain IMP-BG-006 18S ribosomal RNA gene partial sequence	Nannochloropsis oceanica	427	427	99%	5e-115	100.00%	1677	MG224777.1
<input checked="" type="checkbox"/> Nannochloropsis oceanica 18S ribosomal RNA gene partial sequence	Nannochloropsis oceanica	427	427	99%	5e-115	100.00%	1647	KY399778.1

(B)

Nannochloropsis oceanica strain BR2 chromosome 14

Sequence ID: [CP044589.1](#) Length: 914843 Number of Matches: 1

Range 1: 433825 to 434055 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
427 bits(231)	5e-115	231/231(100%)	0/231(0%)	Plus/Plus
Query 2	TACATGCATCAACTCCCAACTGCTTGTCGGACGGGATGTATTTATTAGATAGAAACCAAT			61
Sbjct 433825	TACATGCATCAACTCCCAACTGCTTGTCGGACGGGATGTATTTATTAGATAGAAACCAAT			433884
Query 62	GCGGGGCAACCCGGTATTGTGGTGAATCATGATAACTTTGCGGATCGCCGGCTTTTGCCA			121
Sbjct 433885	GCGGGGCAACCCGGTATTGTGGTGAATCATGATAACTTTGCGGATCGCCGGCTTTTGCCA			433944
Query 122	GCGACGAATCATTCAAGTTTCTGCCCTATCAGCTTTGGATGGTAGGGTATTGGCCTACCA			181
Sbjct 433945	GCGACGAATCATTCAAGTTTCTGCCCTATCAGCTTTGGATGGTAGGGTATTGGCCTACCA			434004
Query 182	TGGCTCTAACGGGTAACGGAGAATTGGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCT			232
Sbjct 434005	TGGCTCTAACGGGTAACGGAGAATTGGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCT			434055

Fig. 11 Alignment results of PCR products amplified by NSCS 1 primer with *Nannochloropsis* sp. genomic DNA (A). The results show 100% identity with *Nannochloropsis* sp. genomic DNA 18S rRNA gene (accession number: CP044589.1) (B).

參考文獻

- 金霞, 金志芳, 孫光舉, 陳曦 (2010) 分光光度法測定海水中葉綠素含量的研究. 廣州化工, 38(4): 132-136.
- 蘇惠美 (1999) 餌料生物之培養與利用. 臺灣省水產試驗所東港分所, 105 pp.
- 蘇惠美, 陳菀菁, 王淑欣, 陳紫嫻 (2014) 等鞭金藻與擬球藻脂肪酸組成分析及測定方法之探討. 水試專訊, 47: 11-15.
- Aguirre, C., N. Olivares, P. Luppichini and P. Hinrichsen (2015) A PCR-based diagnostic system for differentiating two weevil species (Coleoptera: Curculionidae) of economic importance to the Chilean Citrus Industry. J. Econ. Entomol., 108(1): 107-113.
- Al-Banna, L., A. T. Ploeg, V. M. Williamson and I. Kaloshian (2004) Discrimination of six *Pratylenchus* species using PCR and species-specific primers. J. Nematol., 36(2): 142-146.
- Boussiba, S., A. Vonshak, Z. Cohen, Y. Avissar and A. Richmond (1987) "Lipid and biomass production by the halotolerant microalga *Nannochloropsis salina*". Biomass, 12(1): 37-47.
- Boyd, C. E., L. R. D'Abramo, B. D. Glencross, D. C. Huyben, L. M. Juarez, G. S. Lockwood, A. A. McNevin, A. G. J. Tacon, F. Teletchea, J. R. Tomasso, C. S. Tucker and W. C. Valenti (2020) Achieving sustainable aquaculture: historical and current perspectives and future needs and challenges. J. World Aquacul. Soc., 51(3): 578-633.

- Dong, C. M., Y. J. Park, J. K. Noh, E. S. Noh, C. M. An, J. H. Kang, J. Y. Park and E. M. Kim (2019) Development of species-specific PCR primers for the rapid and simultaneous identification of the six species of Genus *Takifugu*. *Dev. Reprod.*, 23(4): 367-375.
- El-Sheekh, M., M. Abu-Faddan, A. Abo-Shady, M. Z. A. Nassar and W. Labib (2020) Molecular identification, biomass, and biochemical composition of the marine chlorophyte *Chlorella* sp. MF1 isolated from Suez Bay. *J. Genet Eng. Biotechnol.*, 18(1): 27.
- Fabris, M., R. M. Abbriano, M. Pernice, D. L. Sutherland, A. S. Commault, C. C. Hall, L. Labeeuw, J. I. McCauley, U. Kuzhiuparambil, P. Ray, T. Kahlke and P. J. Ralph (2020) Emerging technologies in algal biotechnology: toward the establishment of a sustainable, algae-based bioeconomy. *Front. Plant Sci.*, 11: 279.
- Fahmy, N. T., J. T. Villinski, F. Bolay, C. A. Stoops, R. A. Tageldin, L. Fakoli, O. Okasha, P. J. Obenauer and J. W. Diclaro II (2015) The seasonality and ecology of the *Anopheles gambiae* complex (Diptera: Culicidae) in Liberia using molecular identification. *J. Med. Entomol.*, 52(3): 475-482.
- FAO (2016) The State of World Fisheries and Aquaculture 2016: Contributing to Food Security and Nutrition for all. FAO, Rome, 200 pp.
- Hoek, van den C., D. G. Mann and H. M. Jahns (1996) *Algae: An Introduction to Phycology*. Cambridge Univ. Press, 623 pp.
- Hua, K., J. M. Cobcroft, A. Cole, K. Condon, D. R. Jerry, A. Mangott, C. Praeger, M. J. Vucko, C. Zeng, K. Zenger and J. M. Strugnell (2019) The future of aquatic protein: Implications for protein sources in aquaculture diets. *One Earth*, 1(3): 316-329.
- Kanz, C., P. Aldebert, N. Althorpe, W. Baker, A. Baldwin, K. Bates, P. Browne, A. van den Broek, M. Castro, G. Cochrane, K. Duggan, R. Eberhardt, N. Faruque, J. Gamble, F. G. Diez, N. Harte, T. Kulikova, Q. Lin, V. Lombard, R. Lopez, R. Mancuso, M. McHale, F. Nardone, V. Silventoinen, S. Sobhany, P. Stoehr, M. A. Tuli, K. Tzouvara, R. Vaughan, D. Wu, W. Zhu and R. Apweiler (2005) The EMBL Nucleotide Sequence Database. *Nucleic Acids Res.*, 33(Database issue): D29-33.
- Khaw, Y. S., N. M. H. Khong, N. A. Shaharuddin and F. Md. Yusoff (2020) A simple 18S rDNA approach for the identification of cultured eukaryotic microalgae with an emphasis on primers. *J. Microbiol. Methods*, 172: 105890.
- Lubián, L. M., O. Montero, I. Moreno-Garrido, I. E. Huertas, C. Sobrino, M. G. Valle and G. Parés (2000) *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae) as source of commercially valuable pigments. *J. Appl. Phycol.*, 12: 249-255.
- Madden, T. L., R. L. Tatusov and J. Zhang (1996) Applications of network BLAST server. *Meth. Enzymol.*, 266: 131-141.
- Maruyama, I., T. Nakamura, T. Matsubayashi, Y. Ando and T. Maeda (1986) Identification of the alga known as "marine *chlorella*" as a member of the Eustigmatophyceae. *Jpn. J. Phycol.*, 34(4): 319-325.
- Matsuki, T., K. Watanabe, R. Tanaka, M. Fukuda and H. Oyaizu (1999) Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(10): 4506-4512.
- Muir, A., E. Harrison and A. Wheals (2011) A multiplex set of species-specific primers for rapid identification of members of the genus *Saccharomyces*. *FEMS Yeast Res.*, 11(7): 552-563.
- Murphy, K. A., T. R. Unruh, L. M. Zhou, F. G. Zalom, P. W. Shearer, E. H. Beers, V. M. Walton, B. Miller and J. C. Chiu (2015) Using comparative genomics to develop a molecular diagnostic for the identification of an emerging pest *Drosophila suzukii*. *Bull. Entomol. Res.*, 105(3): 364-372.
- Ötleş, S. and R. Pire (2001) Fatty acid composition of *Chlorella* and *Spirulina* microalgae species. *J. AOAC Int.*, 84(6): 1708-1714.
- Qiao, H., D. Hu, J. Ma, X. Wang, H. Wu and J. Wang (2019) Feeding effects of the microalga *Nannochloropsis* sp. on juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Algal Res.*, 41: 101540.
- Rasoul-Amini, S., Y. Ghasemi, M. H. Morowvat and A. Mohagheghzadeh (2009) PCR amplification of 18S rRNA, single cell protein production and fatty acid evaluation of some naturally isolated microalgae. *Food Chem.*, 116(1): 129-136.
- Renaud, S. M., D. L. Parry, LV. Thinh, C. Kuo, A. Padovan and N. Sammy (1991) Effect of light intensity on the proximate biochemical and fatty acid composition of *Isochrysis* sp. And *Nannochloropsis oculata* for use in tropical aquaculture. *J. Appl. Phycol.*, 3: 43-53.
- Tear, C., C. Lim, J. Wu and H. Zhao (2013) Accumulated lipids rather than the rigid cell walls impede the extraction of genetic materials for

- effective colony PCRs in *Chlorella vulgaris*. *Microb. Cell Factories*, 12: 106.
- Tocher, D. R. (2003) Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Fish. Sci.*, 11(2): 107-184.
- Turchini, G. M., B. E. Torstensen and W. K. Ng (2009) Fish oil replacement in finfish nutrition. *Rev. Aquacul.*, 1(1): 10-57.
- Varadinova, Z., Y. J. Wang, Z. Kučerová, V. Stejskal, G. Opit, Y. Cao, F. J. Li and Z. H. Li (2015) COI barcode based species-specific primers for identification of five species of stored-product pests from genus *Cryptolestes* (Coleoptera: Laemophloeidae). *Bull. Entomol. Res.*, 105(2): 202-209.
- Walne, P. R. (1974) Culture of Bivalve Molluscs. 50 years' Experience at Conway. Fishing News (Books) Ltd. England, Surrey, 173 pp.
- Wan, M., J. N. Rosenberg, J. Faruq, M. J. Betenbaugh and J. Xia (2011) An improved colony PCR procedure for genetic screening of *Chlorella* and related microalgae. *Biotechnol. Lett.*, 33(8): 1615-1619.
- Wu, F. Z., Z. H. Liu, H. Shen, F. Yu, J. Ma, X. Hu and L. Zeng (2014) Morphological and molecular identification of *Paracoccus marginatus* (Hemiptera: Pseudococcidae) in Yunnan, China. *Fla. Entomol.*, 97(4): 1469-1473.
- Zhang, S., P. H. Liu, X. Yang, L. Zhang, N. Luo and J. Shi (2014) Isolation and identification by 18S rDNA sequence of high lipid potential microalgal species for fuel production in Hainan Dao. *Biomass Bioenergy*, 66: 197-203.
- Zhao, Z. H., B. Y. Cui, Z. H. Li, J. Fan, Q. Yang, Z. Kučerová, V. Stejskal, G. P. Opit, Y. Cao and F. Li (2016) The establishment of species-specific primers for the molecular identification of ten stored-product psocids based on ITS2 rDNA. *Sci. Rep.*, 6: 21022.

Rapid Identification Technology for *Nannochloropsis* sp. and *Chlorella* sp. with Species-specific Primer

Yi-Che Su, Zi-Yan Xu^{*}, Shu-Ju Li, Sui-Sin Wang, Yang-De Chen and Feng-cheng Wu

Tungkang Aquaculture Research Center, Fisheries Research Institute

ABSTRACT

A rapid and accurate detection method is required for variety identification in basic research, germplasm preservation, and field applications. The microalgae *Nannochloropsis* sp. and *Chlorella* sp. exhibit striking similarities in appearance, yet differ in nutritional composition. *Nannochloropsis* sp. is rich in eicosapentaenoic acid (EPA), while *Chlorella* sp. is not. EPA is very important to the breeding rate of aquatic seedlings. Using the wrong algae to nourish the bait organisms and feed the seedlings may lead to a decrease in the breeding rate. Visual identification of algae may result in misjudgments, and traditional methods such as chlorophyll, fatty acids, and gene sequencing take 2-5 days and are cost-intensive. In this study, a species-specific primer was designed based on the differences in the 18S ribosomal RNA (18S rRNA) gene sequences between *Nannochloropsis* sp. and *Chlorella* sp. The results indicate that using the species-specific primer NSCS 1 in polymerase chain reaction (PCR) enables the identification of *Nannochloropsis* sp. and *Chlorella* sp., as well as cross-contaminated samples, within 3 hours based on the different sizes of the amplified fragments. This helps avoid the negative impact on aquaculture outcomes due to the inadvertent use of the wrong algal species, contributing to the development of bait organisms in the aquaculture industry and the stable production of aquatic seedlings.

Key words: *Nannochloropsis* sp., *Chlorella* sp., species-specific primers, variety identification, 18S ribosomal RNA gene

*Correspondence: No. 67, Fongyu St., Tungkang, Pingtung 92845, Taiwan. TEL: (08)8324121 ext. 285; FAX: (08)8320234; E-mail: zyxu@mail.tfrin.gov.tw