

ĐẶC ĐIỂM PHÂN LOẠI MÙI CHỪNG VI TẢO DỊ DƯỠNG THRAUSTOCHYTRIDS PHÂN LẬP TỪ RỪNG NGẬP MẶN XUÂN THỦY, NAM ĐỊNH

Nguyễn Thị Hoài Hà, Phạm Thị Bích Đào, Nguyễn Đình Tuấn

Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội

Ngày nhận bài: 06.12.2015

Ngày nhận đăng: 24.6.2016

TÓM TẮT

Trong thập kỷ qua, vi tảo dị dưỡng Thraustochytrids thu hút sự quan tâm lớn của khoa học và công nghiệp bởi những lợi ích đối với sức khỏe mà chúng đem lại. Thraustochytrids được tìm thấy ở nhiều vùng sinh thái biển khác nhau như các vùng ven bờ, vùng ngập mặn và vùng trầm tích bao gồm cả đáy biển sâu. Thraustochytrids thường tập trung nhiều trên mảnh vụn hữu cơ, trên các loài tảo lớn và lá cây mục nát với vai trò quan trọng như các sinh vật phân giải. Thraustochytrids dạng đơn bào, nhân thực, hóa dị dưỡng. Mùoi chừng Thraustochytrids có ký hiệu PT269, PT270, PT273, PT274, PT279, PT284, PT285, PT287, PT81, PT84 được phân lập từ 4 vị trí thu mẫu ở rừng ngập mặn Xuân Thủy, Nam Định. Trong báo cáo này, Thraustochytrids được phân loại dựa vào đặc điểm hình thái kết hợp dữ liệu về 18S rDNA. Mùoi chừng Thraustochytrids chia thành ba nhóm hình thái khuẩn lạc và bốn nhóm hình dạng tế bào. Kết quả phân tích giải trình tự 18S rDNA cho thấy tính tương đồng đạt 99-100% và các chừng này thuộc bốn chi của họ Thraustochytriaceae. Bốn chừng PT269, PT279, PT284 và PT287 thuộc chi *Aurantiochytrium*, hình thành tế bào dạng amíp và sinh sản bằng cách phân đôi tế bào liên tiếp. Hai chừng PT273 và PT285 thuộc chi *Thraustochytrium*, tế bào trực tiếp hình thành túi bào tử và phân cắt trong túi bào tử. Chừng PT274 thuộc chi *Aplanochytrium*, với hai phương thức sinh sản bằng cách hình thành tế bào dạng amíp, amíp biến đổi vo tròn nhanh sau đó hình thành túi bào tử; và sinh sản phân đôi tế bào liên tiếp. Ba chừng PT270, PT81 và PT84 thuộc chi *Schizochytrium*, phân đôi tế bào liên tiếp, giải phóng động bào tử.

Từ khóa: Rừng ngập mặn Xuân Thủy, *Straminipila*, *Thraustochytrids*, *Thraustochytriaceae*, 18S rDNA

GIỚI THIỆU

Việt Nam có trên 3200 km bờ biển và các vùng rừng ngập mặn, như vườn quốc gia Xuân Thủy là rừng ngập mặn (RNM) thuộc khu dự trữ sinh quyển châu thổ sông Hồng. Đây là rừng ngập mặn đầu tiên ở Việt Nam được quốc tế công nhận theo công ước Ramsar, và là rừng ngập mặn thứ 50 của thế giới. Nó có nguồn sinh vật biển nhiệt đới đa dạng và phong phú về thành phần loài, giàu các hợp chất tự nhiên được ứng dụng trong nuôi trồng thủy sản, công nghiệp thực phẩm, nông nghiệp và y dược.

Năm 1936, Thraustochytrids được Sparrow phát hiện và đồng thời cũng nhận được nhiều sự quan tâm từ các nhà nghiên cứu. Trước đây, chúng được xếp vào giới nấm do đặc điểm dị dưỡng hóa năng hữu cơ kết hợp hình thái học giữa nấm thực và nấm noãn (Sparrow, 1936). Tuy nhiên, sự xuất hiện của động bào tử hai doi lệch và trình tự gen 18S rRNA cho thấy Thraustochytrids thuộc giới Straminipila, chúng có mối liên quan với tảo lông doi lệch khác như tảo

vàng ánh (Chrysophytes) và tảo silic (Diatoms) (Lucia *et al.*, 2005). Thraustochytrids là một trong ba nhóm của lớp Labyrinthulomycetes, 2 nhóm còn lại là Labyrinthulids và Aplanochytrids.

Thraustochytrids thuộc họ Thraustochytriaceae gồm 11 chi: *Aplanochytrium*, *Althornia*, *Japanochytrium*, *Aurantiochytrium*, *Oblongichytrium*, *Schizochytrium*, *Thraustochytrium*, *Sicyoidochytrium*, *Ulkenia*, *Parietichytrium* và *Botryochytrium* (Yokoyama *et al.*, 2007). Sự phân loại các chi đầu tiên dựa vào đặc điểm hình thái khuẩn lạc, tế bào, sự khác biệt trong quá trình hình thành, giải phóng bào tử, kích thước túi bào tử và những phương thức phân cắt của túi bào tử, sau đó kết hợp dữ liệu về 18S rDNA (Fan, Chen, 2007; Yokoyama, Honda, 2007).

Do vậy, bài báo này cung cấp một cách tiếp cận mới trong phân loại, quá trình mô tả đặc điểm sinh học, phân tử của Thraustochytrids bản địa RNM Xuân Thủy, Nam Định. Thông tin thu được từ nghiên cứu này sẽ cho thấy sự cần thiết của chúng

trong cả hai quá trình đánh giá khoa học và công nghiệp trong tương lai.

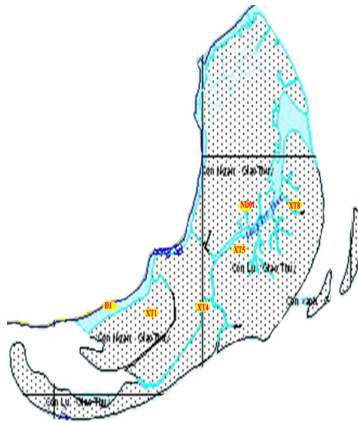
PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Chủng giống và môi trường nuôi cấy

Mười chủng *Thraustochytrids* được phân lập từ mẫu nước và lá cây trong giai đoạn phân hủy thu thập ở 4 vị trí của RNM Xuân Thủy, Nam Định (bảng 1, hình 1). Các chủng được nuôi cấy trên môi trường GPY (g/l) (Honda *et al.*, 1999): glucose 20, peptone 10, cao nấm men 5 và nước biển 15ppt.

Bảng 1. Vị trí thu mẫu và 10 chủng *Thraustochytrids*.

Vị trí thu mẫu	Định vị GPS	pH	Độ mặn	Ký hiệu chủng
XT1	N 20° 13' 13" E 106° 31' 42"	7,2	12,5	PT270
				PT273
				PT274
				PT279
XT4	N 20° 13' 25" E 106° 33' 17"	7,0	12,5	PT284
				PT285
				PT287
XT8	N 20° 14' 30" E 106° 34' 57"	7,6	16,5	PT81
				PT84
NĐ01	N 20° 14' 21" E 106° 34' 09"	7,3	15,0	PT269



Hình 1. Vị trí thu mẫu tại RNM XuânThủy, Nam Định.

Phân loại hình thái học

Mười chủng *Thraustochytrids* được cấy trên môi trường thạch GPY, sau 24-72 giờ quan sát và chụp ảnh hình thái khuẩn lạc dưới kính lúp Carl Zeiss với độ phóng đại 6,5 lần. Hình dạng tế bào được quan sát trên môi trường dịch thể GPY, sự khác biệt trong quá trình hình thành tế bào dựa vào quan sát, chụp ảnh dưới

kính hiển vi Axio Image A2 với độ phóng đại 1000 lần và dựa vào đặc điểm phân loại của Bongiorno *et al.* (2005); Fan, Chen (2007); Leander *et al.* (2004); Yang *et al.* (2010); Raghukumar (1988a,b); Yokoyama, Honda (2007).

Phương pháp phân tích trình tự 18S rDNA

DNA được tách chiết từ sinh khối theo phương pháp của Fawleys (2004). Phương pháp khuếch đại phản ứng PCR với cặp mồi 18S1 (TACCTGGTTGATCCTGCCAG) và 18S12 (CCTTCCGCAGGTTACCTAC). Thành phần phản ứng PCR bao gồm 12,5 µl của 2×PCR Master Mix; 1 µl mồi xuôi 18S1; 1 µl mồi ngược 18S12; 1 µl DNA (50-90ng); 9,5 µl dH₂O. Chương trình PCR: biến tính ở 95°C trong 5 phút. Chạy nhắc lại 30 chu kỳ tại: 95°C/30 giây, 55°C/30 giây, 72°C/1 phút. Tổng hợp: 72°C/10 phút (Huang *et al.*, 2001). Sản phẩm PCR kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 0,8%.

Phân tích trình tự tại trung tâm First Base. So sánh độ tương đồng các trình tự 18S rDNA sử dụng phần mềm Blast, phân tích và dựng cây phân loại bằng phần mềm MEGA6 (Tamura *et al.*, 2010). Các giá trị bootstrap được lấy từ 1000 lần lặp lại việc phân tích Neighbor Joining.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Đặc điểm hình thái

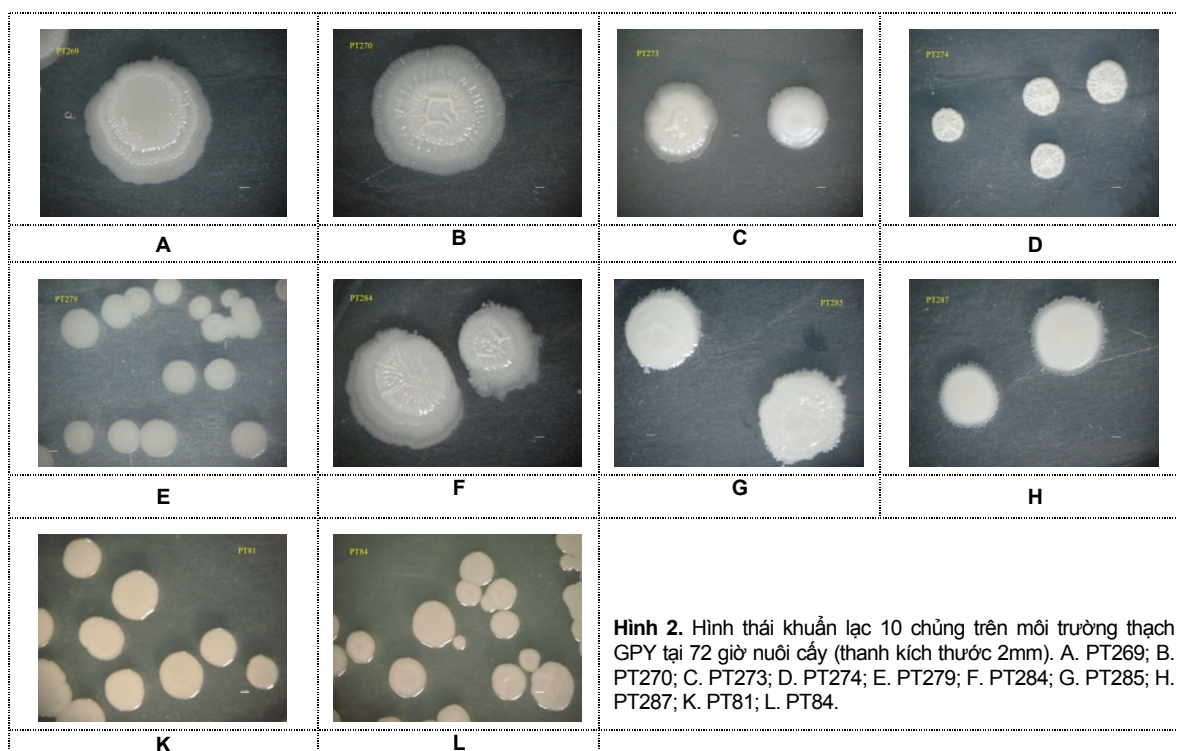
Mười chủng *Thraustochytrids* được nuôi trên môi trường thạch GPY. Sau 24-72 giờ quan sát có sự khác biệt rõ rệt giữa khuẩn lạc về màu sắc, viền khuẩn lạc, bề mặt. Kết quả được trình bày ở hình 2 và bảng 2.

Sau 24 giờ khuẩn lạc của các chủng PT269, PT284, PT285 phát triển lan rộng không đồng đều, lệch về một bên, đến 72 giờ khuẩn lạc tạo các lớp trên bề mặt, lớp trung tâm được nâng lên, hình thành viền gợn sóng. Do sự hình thành lớp và viền lan rộng nên kích thước khuẩn lạc của ba chủng trên tương đối lớn hơn so với các chủng PT270, PT273, PT274, PT279, PT287, PT81 và PT84.

Khuẩn lạc của bốn chủng PT274, PT279, PT81, PT84 hình tròn, kích thước không thay đổi quá lớn cho tới 72 giờ, không tạo viền. Khuẩn lạc chủng PT274 tạo các thùy khía hướng tâm trên bề mặt. Trong khi đó bề mặt khuẩn lạc chủng PT279, PT281 lại tương đối phẳng. Bề mặt chủng PT284 có phần hơi lõm tương tự như đặc điểm miêu tả khuẩn lạc chủng PT285.

Bảng 2. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc của 10 chủng *Thraustochytrids* tại 72 giờ nuôi cấy.

Chủng giống	Màu sắc	Viên	Bề mặt	Kích thước (mm)
PT269	Trắng ngà	Gợn sóng	Hình thành lớp	9,2 - 17,8
PT270	Kem	Thùy	Nhấn, hình thành lớp	9 - 16,2
PT273	Trắng ngà	Mỏng	Lồi	6 - 10,5
PT274	Trắng	-	Tạo khía hướng tâm	4 - 6,6
PT279	Trắng đục	-	Phẳng	4,2 - 6,5
PT284	Kem	Gợn sóng	Hình thành các lớp	7,5 - 16,2
PT285	Trắng sữa	Xê thùy	Lõm	5,5 - 12,8
PT287	Trắng	Răng cưa	Lồi	6,3 - 9,6
PT81	Vàng ngà	-	Phẳng	3,6 - 7,2
PT84	Vàng ngà	-	Lõm	3,5 - 6,8



Hình 2. Hình thái khuẩn lạc 10 chủng trên môi trường thạch GPY tại 72 giờ nuôi cấy (thanh kích thước 2mm). A. PT269; B. PT270; C. PT273; D. PT274; E. PT279; F. PT284; G. PT285; H. PT287; K. PT81; L. PT84.

Chủng PT270 có viền tạo mũi, bề mặt khuẩn lạc nhẵn và cũng hình thành lớp. Khuẩn lạc chủng PT285 có viền xê thùy, còn chủng PT287 tạo viền răng cưa và bề mặt lồi.

Về màu sắc: sau 24 - 72 giờ có sự thay đổi màu sắc của khuẩn lạc. Với các chủng PT81 và PT84, chuyển từ trắng sang vàng ngà. Trong khi chủng PT269, PT273 màu trắng ngà. Chủng PT270, PT284 có màu kem. Đặc biệt, chủng PT274 không thay đổi màu sắc. Tiếp tục quan sát sự phát triển của khuẩn lạc đến 72 giờ không

thấy sự thay đổi về hình dạng và màu sắc của cả mười chủng.

Mười chủng *Thraustochytrids* với hình dạng tế bào khác nhau tạo thành bốn nhóm. Nhóm thứ nhất bao gồm chủng PT269, PT279, PT284 và PT287 hình thành tế bào dạng amíp và sinh sản phân đôi tế bào liên tiếp (hình 3) giống như đặc điểm của chi *Aurantiochytrium*.

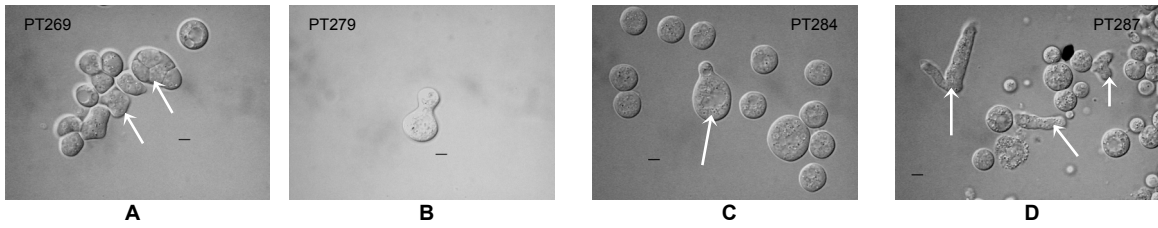
Nhóm hai gồm hai chủng PT273 và PT285 có đặc điểm của chi *Thraustochytrium* như các tế bào

không trải qua sự phân đôi tế bào mà trực tiếp hình thành túi bào tử (hình 4), phân cắt trong túi bào tử và phát triển thành động bào tử đơn.

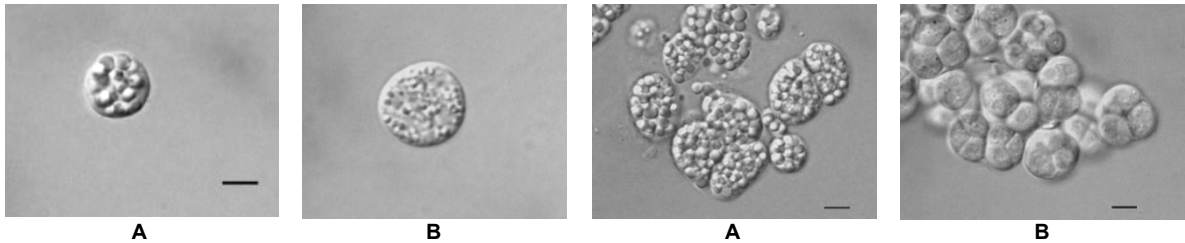
Nhóm ba duy nhất chủng PT274 sinh sản theo hai phương thức: (1) hình thành tế bào dạng amíp, amíp vờ tròn lên thành tế bào có kích thước tương tự như túi bào tử và sau đó hình thành túi bào tử, quá

trình biến đổi của amíp xảy ra trong thời gian ngắn thường không quan sát được lặp lại; (2) sinh sản phân đôi tế bào liên tiếp (Hình 5).

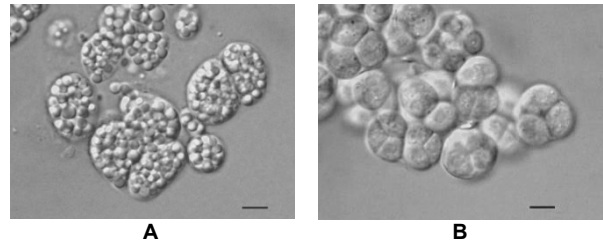
Và nhóm thứ tư gồm các chủng PT270, PT81 và PT84 sinh sản theo phương thức phân đôi tế bào liên tiếp, phát triển và giải phóng các động bào tử, đặc điểm này phù hợp với miêu tả của chi *Schizochytrium* (Hình 6).



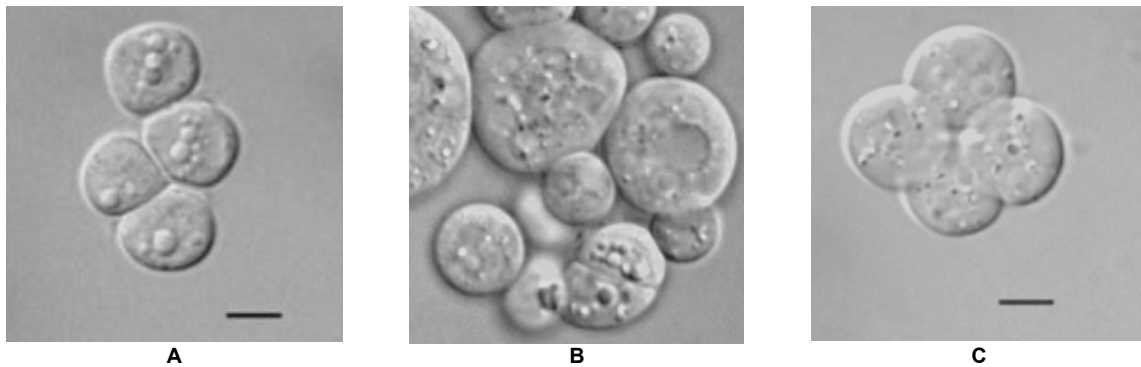
Hình 3. Tế bào dạng amíp (thanh kích thước 5 μm). A. PT269; A. PT279; C. PT284; D. PT287.



Hình 4. Túi bào tử (thanh kích thước 5 μm). A. PT273; B. PT285.



Hình 5. Chủng PT274 (A) túi bào tử; (B) sinh sản phân đôi tế bào liên tiếp (thanh kích thước 5 μm).



Hình 6. Hình dạng nhóm tế bào sinh sản theo phương thức phân đôi liên tiếp (thanh kích thước 5 μm). A. PT270; B. PT81; C. PT84.

Phân tích giải trình tự 18S rDNA

Sử dụng liên kết và so sánh các trình tự 18S rDNA với loài có mối quan hệ họ hàng gần đã được

đăng ký trong ngân hàng dữ liệu gen NCBI. Các ký hiệu chỉ và mã GenBank 18S rDNA của các chủng *Thraustochytrids* tham khảo, được trình bày ở bảng 3.

Kết quả ở hình 7 cho thấy cây phả hệ của mười

chủng *Thraustochytrids* được phân làm bốn nhóm. Chín chủng PT269, PT270, PT273, PT279, PT284, PT285, PT287, PT81 và PT84 có mối quan hệ giữa các nhánh phân loại với họ *Thraustochytridae* DQ367052. Với chủng PT274 nằm trong một cụm riêng biệt.

Bốn chủng PT269, PT279, PT284 và PT287 nằm trên cùng một nhánh và độ tương đồng 99% với *Aurantiochytrium* sp.B072 mã đăng ký JF266572. Ba chủng PT270, PT81 và PT84 có mối quan hệ gần gũi với *Schizochytrium* sp. BR2 mã đăng ký DQ525180 (tương đồng 99%).

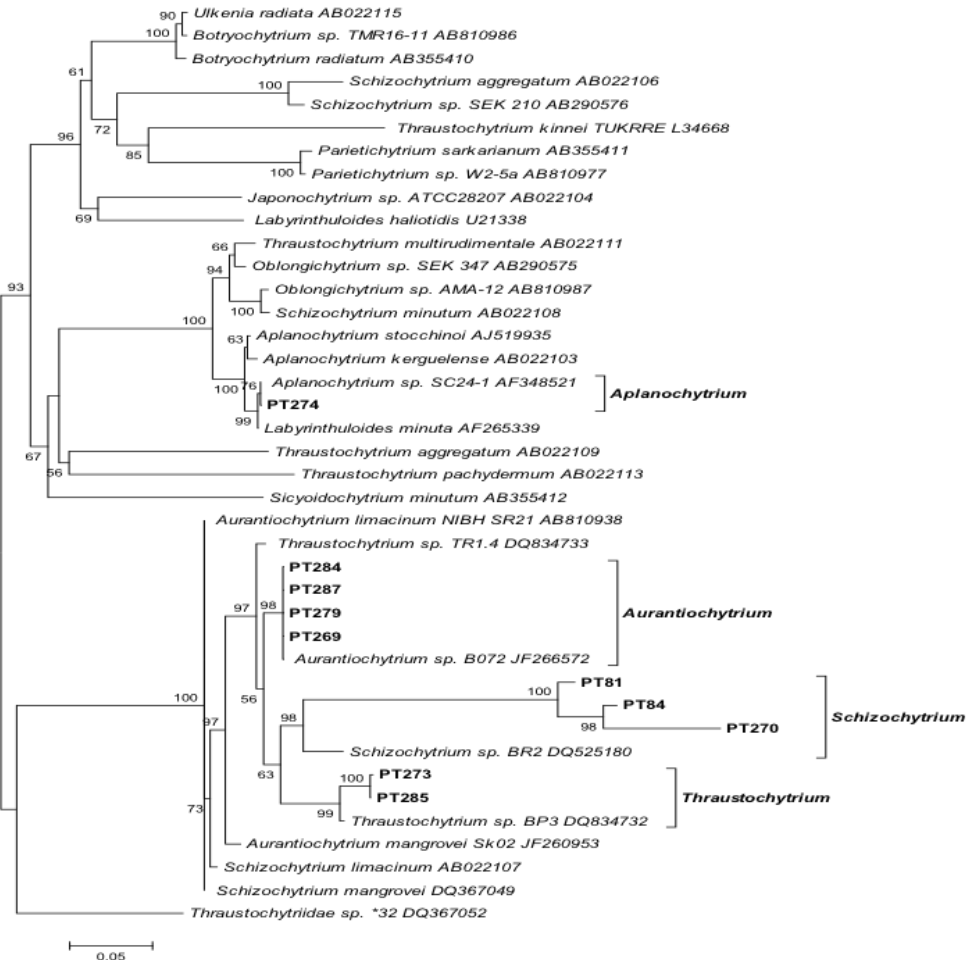
Chủng PT274 có độ tương đồng 99% với *Aplanochytrium* sp. SC24-1 (AF348521). Hai chủng PT273 và PT285 tương đồng 100% và có mối quan

hệ với *Thraustochytrium* sp. BP3 DQ834732.

Dựa trên đặc điểm hình thái và phân tích giải trình tự 18S rDNA xác định các chủng PT269, PT279, PT284 và PT287 thuộc chi *Aurantiochytrium*. Chủng PT273 và PT285 thuộc chi *Thraustochytrium*. Còn chủng PT274 thuộc chi *Aplanochytrium*. Ba chủng PT270, PT81 và PT84 lại thuộc chi *Schizochytrium*.

Phân loại khoa học của mười chủng *Thraustochytrids* như sau:

- Giới: Stramenopiles
- Ngành: Heterokonta
- Lớp: Labyrinthulomycetes
- Bộ: Thraustochytriales
- Họ: Thraustochytriaceae



Hình 7. Cây phả hệ dựa trên phân tích giải trình tự 18S rDNA của mười chủng *Thraustochytrids* và các chủng có mối quan hệ gần

Bảng 3. Các ký hiệu chi và mã GenBank 18S rDNA của các chủng Thraustochytrids tham khảo.

Nhóm phân loại	Ký hiệu chủng	Mã đăng ký trên ngân hàng gen	Tài liệu tham khảo
Chi <i>Aplanochytrium</i>			
<i>Aplanochytrium kerguelense</i>		AB022103	Honda <i>et al.</i> , 1999
<i>Aplanochytrium</i> sp.	SC24-1	AF348521	Leander <i>et al.</i> , 2004
<i>Aplanochytrium stocchinoi</i>		AJ519935	Moro <i>et al.</i> , 2003
Chi <i>Aurantiochytrium</i>			
<i>Aurantiochytrium limacinum</i>	NIBH SR21	AB810938	Nakazawa <i>et al.</i> , 2014
<i>Aurantiochytrium mangrovei</i>	SK02	JF260953	Chodchoey <i>et al.</i> , 2011
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	B072	JF266572	Chaisawang <i>et al.</i> , 2012
Chi <i>Botryochytrium</i>			
<i>Botryochytrium radiatum</i>		AB355410	Yokoyama <i>et al.</i> , 2007
<i>Botryochytrium</i> sp.	TMR16-11	AB810986	Nakazawa <i>et al.</i> , 2014
Chi <i>Japonochytrium</i>			
<i>Japonochytrium</i> sp.	ATCC28207	AB022104	Honda <i>et al.</i> , 1999
Chi <i>Labyrinthuloides</i>			
<i>Labyrinthuloides haliotidis</i>		U21338	Leipe <i>et al.</i> , 1996
<i>Labyrinthuloides minuta</i>		AF265339	-
Chi <i>Oblongichytrium</i>			
<i>Oblongichytrium</i> sp.	AMA-12	AB810987	Nakazawa <i>et al.</i> , 2014
<i>Oblongichytrium</i> sp.	SEK 347	AB290575	Yokoyama <i>et al.</i> , 2007
Chi <i>Parietichytrium</i>			
<i>Parietichytrium sarkarianum</i>		AB355411	Yokoyama <i>et al.</i> , 2007
<i>Parietichytrium</i> sp.	W2-5a	AB810977	Nakazawa <i>et al.</i> , 2014
Chi <i>Schizochytrium</i>			
<i>Schizochytrium aggregatum</i>		AB022106	Honda <i>et al.</i> , 1999
<i>Schizochytrium limacinum</i>		AB022107	Honda <i>et al.</i> , 1999
<i>Schizochytrium mangrovei</i>		DQ367049	Tsui <i>et al.</i> , 2009
<i>Schizochytrium minutum</i>		AB022108	Honda <i>et al.</i> , 1999
<i>Schizochytrium</i> sp.	BR2	DQ525180	Chatdumrong <i>et al.</i> , 2006
<i>Schizochytrium</i> sp.	SEK 210	AB290576	Yokoyama <i>et al.</i> , 2007
Chi <i>Sicyoidochytrium</i>			
<i>Sicyoidochytrium minutum</i>		AB355412	Yokoyama <i>et al.</i> , 2007
Chi <i>Thraustochytrium</i>			
<i>Thraustochytrium aggregatum</i>		AB022109	Honda <i>et al.</i> , 1999
<i>Thraustochytrium aureum</i>		AB022110	Honda <i>et al.</i> , 1999
<i>Thraustochytrium kinnei</i>	TUKRRE	L34668	Cavalier <i>et al.</i> , 1994
<i>Thraustochytrium multirudimentale</i>		AB022111	Honda <i>et al.</i> , 1999
<i>Thraustochytrium pachydermum</i>		AB022113	Honda <i>et al.</i> , 1999
<i>Thraustochytrium</i> sp.	TR1.4	DQ834733	Chatdumrong <i>et al.</i> , 2006
<i>Thraustochytrium</i> sp.	BP3	DQ834732	Chatdumrong <i>et al.</i> , 2006
Chi <i>Ulkenia</i>			
<i>Ulkenia radiata</i>		AB022115	Honda <i>et al.</i> , 1999
Chi khác			
<i>Thraustochytridae</i> sp.	#32	DQ367052	Tsui <i>et al.</i> , 2009

KẾT LUẬN

Dựa vào hình thái khuẩn lạc, mười chủng *Thraustochytrids* chia thành 3 dạng chính: dạng thứ nhất khuẩn lạc phát triển lan rộng tạo các lớp trên bề mặt và hình thành viền (PT269, PT270, PT284); dạng thứ hai khuẩn lạc hình tròn, không tạo viền (PT274, PT279, PT81, PT84) và dạng thứ ba khuẩn lạc có lớp bề mặt dày và hình thành lớp viền mỏng (PT273, PT285, PT287). Màu sắc khuẩn lạc có sự khác nhau giữa các chủng *Thraustochytrids*, hai chủng PT81, PT84 màu vàng ngà; PT274 màu trắng và PT269, PT270, PT273, PT279, PT284, PT285, PT287 trắng ngà vàng (trắng ngà, kem, trắng đục, trắng sữa). Từ những kết quả trên cho thấy đặc điểm khuẩn lạc thường không tương đồng với đặc điểm tế bào như trong cùng một chi lại có sự khác nhau về màu sắc và hình thái khuẩn lạc.

Hình dạng tế bào mười chủng *Thraustochytrids* tạo thành bốn nhóm: nhóm thứ nhất bao gồm chủng PT269, PT279, PT284, PT287 hình thành tế bào dạng amíp và sinh sản bằng cách phân đôi tế bào liên tiếp. Nhóm thứ hai gồm chủng PT273 và PT285 tế bào trực tiếp hình thành túi bào tử và phân cắt trong túi bào tử. Nhóm thứ ba, chủng PT274 sinh sản theo hai phương thức quá trình chuyển đổi nhanh từ tế bào dạng amíp và về tròn sau đó hình thành túi bào tử; và sinh sản theo phương thức phân đôi tế bào. Nhóm thứ tư gồm PT270, PT81 và PT84 phân đôi tế bào liên tiếp và giải phóng các động bào tử.

Dựa vào đặc điểm hình thái và phân tích giải trình tự 18S rDNA định danh mười chủng vi tảo di dưỡng *Thraustochytrids* thuộc bốn chi *Aurantiochytrium* (PT269, PT279, PT284, PT287), *Thraustochytrium* (PT273, PT285), *Aplanochytrium* (PT274) và *Schizochytrium* (PT270, PT81, PT84).

Lời cảm ơn: Nhóm tác giả chân thành cảm ơn đề tài nhánh Bảo tồn và lưu giữ nguồn gen vi sinh vật, Bộ Khoa học và Công nghệ đã hỗ trợ cho nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bongiorni L, Jain R, Raghukumar S, Aggarwal RK (2005) *Thraustochytrium gaertnerium* sp. nov.: a new thraustochytrid stramenopilan protist from mangroves of Goa, India. *Protist* 156: 303-315.

Cavalier Smith T, Allsopp MTEP, Chao EE (1994) *Thraustochytrids* are chromists, not fungi: 18s rRNA signatures of heterokonta. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci* 346(1318): 387-397.

Chaisawang M, Verduyn C, Chauvatcharin S, Supphantharika M (2012) Metabolic networks and bioenergetics of *Aurantiochytrium* sp. B-072 during storage lipid formation. *Braz J Microbiol* 43(3): 1192-205.

Chatdumrong W, Yongmanitchai W, Limtong S, Worawattanamateekul W (2006) Optimization of Docosahexaenoic Acid (DHA) Production and Improvement of Astaxanthin Content in a Mutant *Schizochytrium limacinum* Isolated from Mangrove Forest in Thailand sp. Isolated in Thailand. *Kasetsart J (Nat Sci)* 41: 324-334.

Chodchoey K, Verduyn C (2011) Growth, fatty acid profile in major lipid classes and lipid fluidity of *Aurantiochytrium mangrovei* Sk02 as a function of growth temperature. *Braz J Microbiol* 43(1): 187-200.

Fan K, Chen F (2007) *Production of High-Value Products by Marine Microalgae Thraustochytrids*. Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources: 293-323.

Fawley Marvin W, Fawley Karen (2004) A simple and rapid technique for the isolation of DNA from microalgae. *J Phycol* 40: 223-225.

Honda D, Yokochi T, Nakahara T, Raghukumar S, Nakagiri A, Schaumann K, Higashihara T (1999) Molecular phylogeny of labyrinthulids and thraustochytrids based on the sequencing of 18S ribosomal RNA gene. *J Eukaryot Microbiol* 46(6): 637-647.

Huang J, Aki T, Hachida K, Yokochi T, Kawamoto S, Shigeta S (2001) Profile of Polyunsaturated Fatty Acids Produced by *Thraustochytrium* sp. KK17-3. *JAOCS* 78(6): 605-610

Leander CA, Porter D, Leander BS (2004) Comparative morphology and molecular phylogeny of aplanochytrids (Labyrinthulomycota). *Eur J Protistol* 40 (4): 317-328.

Leipe DD, Tong SM, Goggin CL, Slemenda SB, Pieniazek NJ, Sogin ML (1996) 16S-like rDNA sequences from *Developayella elegans*, *Labyrinthuloides halitidis*, and *Proteromonas lacertae* confirm that the stramenopiles are a primarily heterotrophic group. *Europ J Protistol* 32: 449-458.

Lucia B, Ruchi J, Seshagiri R, Ramesh KA (2005) *Thraustochytrium gaertnerium* sp. nov.: a New Thraustochytrid Stramenopilan Protist from Mangroves of Goa, India. *Protist* 156: 303-315.

Moro I, Negrisol E, Callegaro A, Andreoli C (2003) *Aplanochytrium stochinoi*: a new Labyrinthulomycota from the southern ocean (Ross Sea, Antarctica). *Protist* 154 (3-4): 331-340.

Nakazawa A, Kokubun Y, Matsuura H, Yonezawa N, Kose R, Yoshida M, Tanabe Y, Kusuda E, Thang DV, Ueda M, Honda D, Mahakant A, Kaya K, Watanabe MM

- (2014) TLC screening of thraustochytrid strains for squalene production. *J Appl Phycol* 26: 29-41.
- Raghukumar S (1988a) *Schizochytrium mangrovei* sp. nov., a thraustochytrid from mangroves in India. *Trans Br Mycol Soc* 90: 627-631.
- Raghukumar S (1988b) *Schizochytrium octosporum* sp. nov. and other thraustochytrids from the North Sea (Rosfjord, Norway). *Trans Br Mycol Soc* 90: 273-278.
- Sparrow FK (1936) Biological observations on the marine fungi of Woods Hole waters. *Biol Bull* 70: 236-263.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2010) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 6.0. *doi:10.1093/molbev/mst197*.
- Tsui CK, Marshall W, Yokoyama R, Honda D, Lippmeier JC, Craven KD, Peterson PD, Berbee ML (2009) Labyrinthulomycetes phylogeny and its implications for the evolutionary loss of chloroplasts and gain of ectoplasmic gliding. *Mol Phylogenet Evol* 50(1): 129-140.
- Yang HL, Lu CK, Chen SF, Chen YM, Chen YM (2010) Isolation and characterization of Taiwanese heterotrophic microalgae: screening of strains for docosahexaenoic acid (DHA) production. *Maz Biotechnol* 12(2): 173-185.
- Yokoyama R, Honda D (2007) Taxonomic rearrangement of the genus *Schizochytrium* sensu lato based on morphology, chemotaxonomic characteristics, and 18S rRNA gene phylogeny (Thraustochytriaceae, Labyrinthulomycetes): emendation for *Schizochytrium* and erection of *Aurantiocytrium* and *Oblongichytrium* gen. nov. *Mycoscience* 48: 199-211.
- Yokoyama R, Salleh B, Honda D (2007) Taxonomic rearrangement of the genus *Ulkenia* sensu lato based on morphology, chemotaxonomical characteristics, and 18S rRNA gene phylogeny (Thraustochytriaceae, Labyrinthulomycetes): emendation for *Ulkenia* and erection of *Botryochytrium*, *Parietichytrium*, and *Sicyoidochytrium* gen. nov. *Mycoscience* 48: 329-341.

TAXONOMIC CHARACTERIZATION OF TEN THRAUSTOCHYTRIDS STRAINS ISOLATED FROM MANGROVE XUAN THUY, NAM DINH

Nguyen Thi Hoai Ha[✉], Pham Thi Bich Dao, Nguyen Dinh Tuan

Institute of Microbiology and Biotechnology, Vietnam National University, Hanoi

SUMMARY

Thraustochytrids have become of considerable industrial and scientific interest in the past decade due to their health benefits. Thraustochytrids are found in a wide variety of marine habitats such as the coastal, mangrove and sediments including the deep sea. Thraustochytrids are extremely common on the detritus, macroalgae and decaying leaf, they play an important role as organic matter-degrading microorganisms. Thraustochytrids are unicellular, eukaryotic, chemo-organotrophic organisms. Ten thraustochytrids strains PT269, PT270, PT273, PT274, PT279, PT284, PT285, PT287, PT81, PT84 were isolated from four locations in Xuan Thuy mangroves, Nam Dinh. In this report, classification is based on morphology and 18S rDNA sequences. Ten Thraustochytrid strains could be classified into three types of colony and four types of cell morphology. Molecular phylogenetic analysis of 18S rDNA sequences showed homology score to be 99-100% and these strains belonged to four genera in the family Thraustochytriaceae. PT269, PT279, PT284 and PT287 strains belong to *Aurantiocytrium* genus, they produce amoeboid cells and occur successive binary division. PT273 and PT285 strains belong to *Thraustochytrium* genus, thallus directly develop and cleave into sporangium. PT274 strain belong to *Aplanochytrium* genus with two distinct development, amoeboid cells are found, they rapidly round up and become sporangium; and successive binary cell division. PT270, PT81 and PT84 strains belong to genus *Schizochytrium*, they have successive binary cell division, zoospores release.

Keywords: *Xuanthuy mangrove, Straminipila, Thraustochytrids, Thraustochytriaceae, 18S rDNA*

[✉] Authors for correspondence: E-mail: nguyenhoaiha@gmail.com