

THIẾT KẾ MÔI CHUYỀN BIỆT ĐỂ NHẬN DIỆN VI TẢO NHÓM THRAUSTOCHYTRID

Nguyễn Lam Minh, Trần Thị Xuân Mai, Nguyễn Thị Liên
Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Đại học Cần Thơ

Liên hệ: lamminh09011992@gmail.com

TÓM TẮT

Việc nhận diện nhóm vi tảo biển dị dưỡng thraustochytrid bằng phương pháp truyền thống còn gặp nhiều khó khăn. Bằng quan sát hình thái dưới kính hiển vi quang học, chín dòng vi tảo được cung cấp bước đầu được xác định là thuộc nhóm thraustochytrid. Trong nghiên cứu này, chín dòng vi tảo này đã được xác định thuộc chi *Thraustochytrium* và *Schizochytrium* sử dụng hai cặp môi được thiết kế dựa trên trình tự vùng gen 18S rDNA của một số loài vi tảo mục tiêu. Trong đó, 2 dòng vi tảo là M19 và D14 thuộc chi *Thraustochytrium* và 7 dòng còn lại thuộc *Schizochytrium* dựa vào việc so sánh kết quả phản ứng chuỗi trùng hợp với cặp môi nhận diện *Schizochytrium*. Ngoài ra, 3 dòng vi tảo được giải trình tự bằng cặp môi Thraus-Schi1 với kích thước khoảng 1.000 bp là B3, M6 và D14. Dựa vào phân tích cây phả hệ và kết quả tìm kiếm trình tự tương đồng từ ngân hàng gen NCBI (National Center for Biotechnology Information), dòng B3 và M6 thuộc chi *Schizochytrium* và *Aurantiochytrium* (trong đó dòng B3 đồng hình cao với *Schizochytrium* sp. SKA10 ở mức độ 79% và dòng M6 ở mức 98% với *Schizochytrium* sp. KRT1), và dòng D14 thuộc chi *Thraustochytrium*, đồng hình ở mức 93% với *Thraustochytrium* sp. BP3.2.2. Các cặp môi được thiết kế trong nghiên cứu này đã giúp nhận diện nhanh các dòng vi tảo thuộc thraustochytrid.

Từ khóa: Acid béo không no, *Schizochytrium*, *Thraustochytrium*, vi tảo dị dưỡng

Nhận bài: 28/12/2017

Hoàn thành phản biện: 24/01/2018

Chấp nhận bài: 26/01/2018

1. MỞ ĐẦU

Thraustochytrid là nhóm vi tảo biển dị dưỡng phổ biến, được biết đến như là nguồn cung cấp dồi dào các hợp chất hoạt động sinh học có giá trị. Chúng thường được tìm thấy ở các hồ nước mặn cũng như ở vùng biển và vùng nước lợ ven biển, một số còn được tìm thấy ở các tầng đại dương (Schneider, 1977; Moss, 1986; Raghukumar và cs., 1990). Nhóm vi tảo này thường bám vào một số sinh vật không xương sống, rong rêu hay những lá cây rụng ở rừng ngập mặn. Trong những nghiên cứu gần đây, nhiều loài vi tảo thuộc thraustochytrid có khả năng sản xuất những hợp chất sinh học quý như Polyunsaturated Fatty Acid (PUFA) bao gồm Docosahexaenoic Acid (DHA) và Eicosapentaenoic Acid (EPA), nhóm vi tảo này cũng là đối tượng lý tưởng để sản xuất carotenoid và nhiên liệu sinh học diesel (Ratledge, 1993; Bowles và cs., 1999; Lewis và cs., 1999; Aasen và cs., 2016). Để mô tả và xác định thraustochytrid, các nhà khoa học có thể dựa trên hình thái của chúng cũng như các đặc điểm phát triển bao gồm sự phát triển các túi bào tử, mạng lưới ngoại chất, sự hình thành các bào tử động, độ dày của vỏ tế bào, sự hình thành sắc tố, hay sự di chuyển của các bào tử động trong khoảng thời gian sau khi được phóng thích ra (Porter, 1990). Theo nghiên cứu của Gaertner (1972), vi tảo thraustochytrid chỉ có thể được quan sát và xác định dưới điều kiện tiêu chuẩn

nhu quan sát trong điều kiện nuôi cấy có chứa phần thông và nước biển. Điều kiện môi trường khác nhau sẽ ảnh hưởng đến hình thái đặc trưng của các dòng vi tảo. Điều đó dẫn đến những khó khăn trong việc nhận diện vi tảo dựa trên hình thái tế bào. Các nghiên cứu về thiết kế môi chuyên biệt dựa trên vùng gen 18S rDNA đã được nhiều thành công trong việc nhận diện vi tảo thraustochytrid ở các nước trên thế giới (Mo và cs., 2002; Honda và cs., 1999; Yokoyama và Honda, 2007). Tuy nhiên, ở Việt Nam và đặc biệt là vùng Đồng bằng Sông Cửu Long vẫn chưa có nhiều nghiên cứu về nhóm vi tảo có giá trị này. Chính vì thế, đề tài “Thiết kế môi chuyên biệt để nhận diện các dòng vi tảo thraustochytrid” đã được thực hiện nhằm giúp việc nhận diện nhanh các dòng vi tảo này ở Việt Nam trở nên dễ dàng hơn so với phương pháp truyền thống trước đây.

2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Chín dòng vi tảo được cung cấp bởi Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, trường Đại học Cần Thơ.

Bảng 1. Các dòng vi tảo và nguồn gốc phân lập

Ký hiệu	Nguồn gốc phân lập	Địa điểm thu mẫu
B1	Lá Bần	Bến Tre
B3	Lá Bần	Bến Tre
M3	Lá Mắm	Bến Tre
M6	Lá Mắm	Bến Tre
M7	Lá Mắm	Bến Tre
M8	Lá Mắm	Bến Tre
M10	Lá Mắm	Trà Vinh
M19	Lá Mắm	Trà Vinh
D14	Lá Đước	Trà Vinh

Bảng 2. Thành phần môi trường nuôi cấy vi tảo (môi trường NM-5)

Thành phần	Nồng độ
D – Glucose	50 g/L
Yeast extract	10 g/L
Peptone	10 g/L
NaCl	1 g/L
MgSO ₄	10 g/L
Nước cất	Thêm cho đủ 1 lít
Streptomycin (Strep.)	300 mg/L
Ampicillin (Amp.)	200 mg/L

(Nguồn: Trần Thị Xuân Mai và cs., 2014)

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thiết kế các đoạn môi chuyên biệt nhận diện các dòng vi tảo thraustochytrid

Các trình tự vùng gen 18S rDNA của các loài vi tảo thraustochytrid mục tiêu (*Thraustochytrium kinnei*, *Thraustochytrium pachydermum*, *Thraustochytrium striatum*, *Thraustochytrium multirudimentale*, *Thraustochytrium aureum*, *Thraustochytrium aggregatum*, *Schizochytrium minutum*, *Schizochytrium limacinum* và *Schizochytrium aggregatum* với các số đăng ký lần lượt là L34668, AB022113, AB022112, AB022111, AB022110, AB022109, AB022108, AB022107, AB022106) được lấy từ ngân hàng gen của

NCBI. Ngoài ra, các trình tự của các dòng *Labyrinthula* sp. AN-1565 (AB022105), *Labyrinthuloides minuta* sp. (L27634), *Ulkenia profunda* sp. (L34054), *Ulkenia profunda* no.29 (AB022114), *Ulkenia radiata* sp. (AB022115), *Ulkenia visurgensis* sp. (AB022116) cũng được sử dụng như là các dòng đối chứng. Các cặp mồi chuyên biệt được thiết kế dựa trên các trình tự 18S rDNA của các dòng vi tảo mục tiêu bằng phần mềm DNAMAN 4.0. Sau đó, các cặp mồi được đặt hàng và sử dụng trong phản ứng PCR. Các dòng vi tảo mục tiêu được sử dụng trong nghiên cứu này là những đại diện đặc trưng cho các chi và được sử dụng phổ biến trong nhiều nghiên cứu về thiết kế mồi nhận diện thraustochytrid dựa trên vùng gen 18S rDNA (Mo và cs., 2002; Honda và cs., 1999; Yokoyama và Honda, 2007).

2.2.2. Thực hiện phản ứng PCR để kiểm tra tính đặc hiệu của các cặp mồi được thiết kế

Quy trình trích DNA vi tảo được thực hiện dựa theo quy trình trích Cetyl Trimethyl Amonium Bromide (CTAB) của Roger và Bendich (1988) có chỉnh sửa và bổ sung như sau: bổ sung 50 µl sodium dodecyl sulphate (SDS) 10% sau bước sử dụng dung dịch đệm 2X CTAB; các bước ly tâm được thực hiện với 13.000 vòng/phút trong 10 phút; dung dịch CTAB 10% được thay bằng dung dịch 2X CTAB; dung dịch ethanol 80% được thay bằng dung dịch ethanol 70%. Phản ứng PCR được thực hiện với DNA các dòng vi tảo phân lập được với các cặp mồi chuyên biệt tự thiết kế nhằm xác định tính đặc hiệu của các cặp mồi thiết kế. Chu trình nhiệt được điều chỉnh sao cho phù hợp với các cặp mồi sử dụng.

2.2.3. Thực hiện giải trình tự các dòng vi tảo phân lập được để kiểm tra tính đặc hiệu của các cặp mồi thiết kế

Hai hoặc ba dòng vi tảo được chọn để xác định trình tự nhằm đánh giá tính chuyên biệt của các cặp mồi. Sản phẩm PCR bằng cặp mồi Thraus-Schi2 sẽ được giải trình tự bằng máy giải trình tự ABI3130 tại phòng thí nghiệm Sinh học Phân tử, viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, trường Đại học Cần Thơ. Các kết quả giải trình tự gen 18S rDNA được so sánh với các trình tự nucleotide đã được công bố từ dữ liệu trong ngân hàng gen (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) bằng cách tìm kiếm các trình tự nucleotide đồng hình qua sử dụng chương trình nucleotide BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Sử dụng các trình tự đã công bố để so sánh vùng tương đồng bởi công cụ clustal W, từ đó cây phả hệ được xây dựng với phần mềm MEGA version 6.0 bằng phương pháp hợp lý cực đại với số lần phân tích mẫu lặp lại là 1.000 lần.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả thiết kế các cặp mồi chuyên biệt

3.1.1. Kết quả thiết kế hai cặp mồi nhận diện *Thraustochytrium* và *Schizochytrium*

Khi so sánh trình tự các dòng vi tảo thuộc chi *Thraustochytrium* và *Schizochytrium* với các chi vi tảo họ hàng là *Ulkenia* và *Labyrinthula*, kết quả tìm được 3 trình tự mồi có sự đồng hình cao giữa 2 chi *Thraustochytrium* và *Schizochytrium* nhưng lại có sự khác biệt so với 2 chi *Ulkenia* và *Labyrinthula*. Vị trí của 3 vùng trình tự được mô tả trong Hình 1. Dựa vào 3 vùng trình tự này, hai cặp mồi để nhận diện *Thraustochytrium* và *Schizochytrium* được thiết kế như sau:

Vùng 1 và vùng 2 tạo thành cặp mồi thứ nhất với kích thước bằng khoảng 500 bp: Mồi xuôi Thraus-Schi1 F (5' GCG AAT GGC TCA TTA TAT C 3') và mồi ngược Thraus-Schi1 R (5' TGC TAT TGG AGC TGG AAT 3')



Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm PCR bằng cặp mồi Thraus-Schi1 được điện di trên gel 1,5% Agarose.

(Từ giếng 1 đến giếng 9 lần lượt là các dòng: B1, B3, M6, M3, M7, M8, M19, M10 và D14. Giếng 10 là đối chứng âm. Giếng cuối (giếng 12) là thang chuẩn 100 bp của công ty Fermentas)

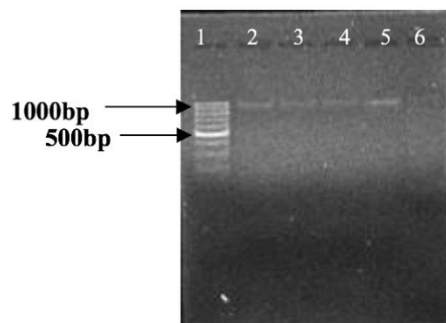
Gen mã hóa 18S rDNA là gen được sử dụng phổ biến trong nhiều nghiên cứu cho các loại vi sinh vật nhân thực. Trước đây, Mo và cs. (2002) cũng đã sử dụng kỹ thuật PCR để nhận diện 26 dòng vi tảo thraustochytrid đã được phân lập từ bể san hô và từ nuôi cấy sơ bộ *Botryllus schlosseri*. Theo Chatdumrong và cs. (2007), cặp mồi NS1 và NS8 được sử dụng để khuếch đại vùng gen 18S rDNA nhằm nhận diện chủng BR2.1.2 là *Thraustochytrium aggregatum* hay *Schizochytrium limacinum*. Vì vậy, kỹ thuật sinh học phân tử đã mang lại hiệu quả đáng kể trong việc nhận diện vi tảo thraustochytrid.

3.2.2. Kết quả PCR của cặp mồi Thraus-Schi2 (khoảng 1.000 bp)

Phản ứng PCR được thực hiện với chu kỳ nhiệt như ở Bảng 4 và sản phẩm điện di trên gel 1,5% Agarose (Hình 4).

Bảng 4. Chu kỳ nhiệt của cặp mồi Thraus-Schi2

Chu kỳ	Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Số lần lặp lại
1	94	4 phút	1
	94	45 giây	
2	54	45 giây	35
	72	2 phút	
3	72	5 phút	1
4	10	∞	1



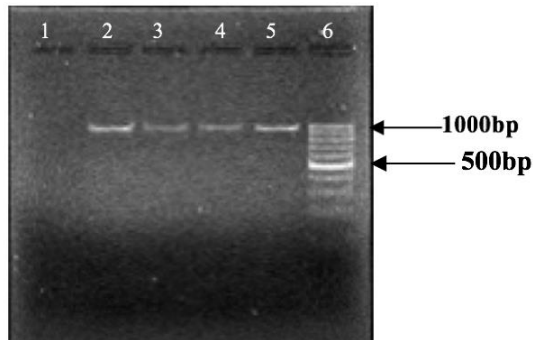
Hình 4. Kết quả điện di trên gel Agarose bằng cặp mồi Thraus-Schi2 ở nhiệt độ bắt mồi là 54°C.

(Giếng 1 là thang chuẩn SmartLadder của công ty Eurogentec, giếng 2 đến giếng 5 lần lượt là dòng B3, D14, M6 và M10, giếng 6 là đối chứng âm)

Kết quả điện di (Hình 4) cho thấy sản phẩm PCR đã được khuếch đại một băng khoảng 1.000 bp đúng như tính toán lý thuyết tuy nhiên các band rất mờ, do đó cần cải thiện điều kiện thực hiện phản ứng PCR.

Thay đổi chu kỳ nhiệt: để cải thiện sản phẩm PCR, thực hiện phản ứng PCR với các chu kỳ nhiệt khác nhau, trong đó thay đổi nhiệt độ giai đoạn bắt mồi trong khoảng từ 52°C đến 56°C và so sánh kết quả điện di trên gel Agarose 1,5%.

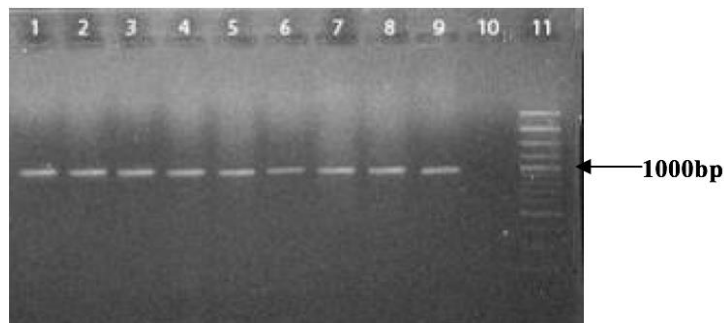
Kết quả điện di cho thấy band xuất hiện rõ và sáng ở nhiệt độ bắt mồi là 52°C (Hình 5).



Hình 5. Kết quả điện di trên gel Agarose bằng mồi Thraus-Schi2 ở nhiệt độ bắt mồi là 52°C.

(Giếng 2 đến giếng 6 lần lượt là dòng B3, D14, M6 và M10, giếng 1 là đối chứng âm và giếng 6 là thang chuẩn SmartLadder của công ty Eurogentec)

Tiếp tục thực hiện phản ứng PCR với 9 dòng vi tảo theo chu kỳ nhiệt đã được tối ưu. Dựa vào kết quả điện di (Hình 5) cho thấy rằng 9 dòng vi tảo đều có cùng sản phẩm PCR với 1.000 bp. Kết quả này cùng với kết quả phân tích bằng cặp mồi Thraus-Schi1 đã trình bày ở trên một lần nữa cho thấy các dòng vi tảo này đều thuộc hai chi *Thraustochytrium* và *Schizochytrium*.



Hình 6. Kết quả điện di trên gel Agarose với 9 dòng vi tảo bằng mồi Thraus-Schi2 ở nhiệt độ bắt mồi là 52°C.

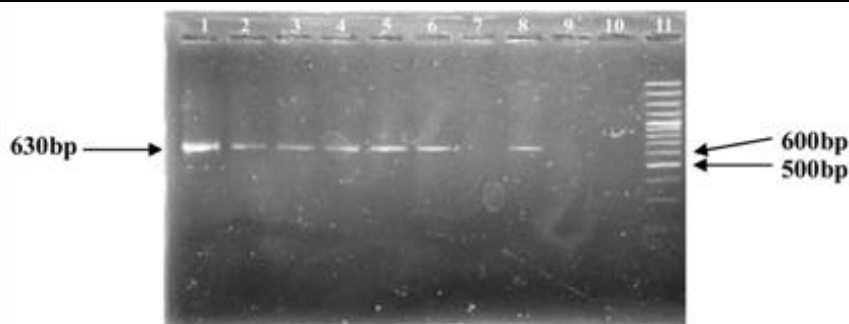
(Từ giếng 1 đến giếng 9 lần lượt là các dòng: B1, B3, M6, M3, M7, M8, M19, M10 và D14. Giếng 10 là đối chứng âm. Giếng cuối (giếng 11) là thang chuẩn 100 bp của công ty Fermentas)

3.2.3. Kết quả PCR của cặp mồi chuyên biệt nhận diện chi *Schizochytrium* (khoảng 630 bp)

Thực hiện phản ứng PCR với mồi Schi với chu kỳ nhiệt ở Bảng 5.

Bảng 5. Chu kỳ nhiệt của cặp mồi Schi

Chu kỳ	Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Số lần lặp lại
1	94	3 phút	1
	94	30 giây	
2	55	30 giây	35
	72	1 phút	
3	72	5 phút	1
4	10	∞	1

**Hình 7.** Kết quả điện di trên gel Agarose bằng cặp mồi Schi.

(Từ giếng 1 đến giếng 9 lần lượt là các dòng: B1, B3, M6, M3, M7, M8, M19, M10 và D14. Giếng 10 là đối chứng âm. Giếng cuối (giếng 11) là thang chuẩn 100bp của công ty Fermentas)

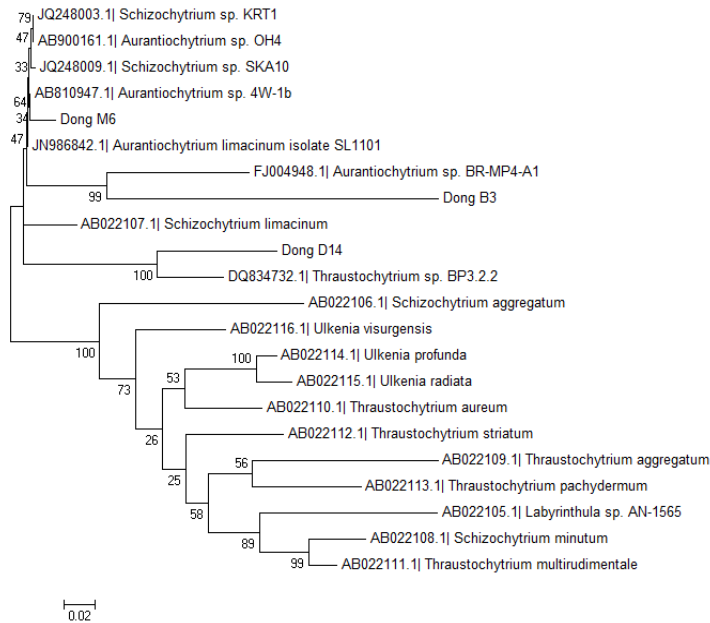
Dựa vào kết quả điện di trên gel Agarose 1,5% (Hình 7) cho thấy có 7 dòng đã khuếch đại được sản phẩm PCR với kích thước 600 bp đúng như lý thuyết, điều này có thể nhận định được rằng trong số 9 dòng vi tảo thì có 7 dòng thuộc *Schizochytrium* (bao gồm: dòng B1, B3, M3, M6, M7, M8 và M10). Kết hợp với kết quả nhận diện của 2 cặp mồi Thraus-Schi1 và Thraus-Schi2 cho thấy dòng D14 và M19 thuộc chi *Thraustochytrium*.

3.3. Kết quả giải trình tự

Ba dòng vi tảo B3, M6 và D14 được tiếp tục sử dụng để giải trình tự nhằm kiểm tra tính đặc hiệu của cặp mồi chuyên biệt đã thiết kế. Việc lựa chọn 03 dòng vi tảo này dựa trên những cơ sở sau: Thứ nhất, ba dòng vi tảo này được phân lập từ 3 loại lá khác nhau là lá Bần (dòng B3), lá Đước (dòng D14) và lá Mắm (dòng M6). Thứ hai, các mẫu lá được lấy từ 2 tỉnh khác nhau là Bến Tre (B3 và M6) và Trà Vinh (D14). Thứ ba, dựa vào kết quả phân tích bằng cặp mồi chuyên biệt đã thiết kế trong nghiên cứu này, dòng B3 và M6 thuộc *Schizochytrium* và dòng D14 thuộc *Thraustochytrium*. Thêm vào đó, cả 3 dòng vi tảo này đều thuộc những loài có khả năng sản xuất được DHA và DPA khá cao (Trần Thị Xuân Mai và cs., 2014)

Sản phẩm PCR của 3 dòng vi tảo B3, D14 và M6 bằng cặp mồi Thraus-Schi2 được thực hiện giải trình tự. Kết quả giải trình tự thu được của 3 dòng vi tảo đều cao hơn 900 bp. Các trình tự được so sánh với các trình tự tương đồng trên ngân hàng gen NCBI bằng công cụ BLAST. Kết quả cho thấy: dòng B3 có sự đồng hình với *Schizochytrium* sp. SKA10 với 79%, dòng D14 có sự đồng hình với *Thraustochytrium* sp. BP3.2.2 với 93% và dòng M6 có sự đồng hình với *Schizochytrium* sp. KRT1 với 98%.

Dựa vào trình tự của ba dòng vi tảo B3, M6 và D14, cây phả hệ được xây dựng bằng phần mềm MEGA 6.0 bằng phương pháp hợp lý cực đại với số lần phân tích mẫu lặp lại là 1.000.



Hình 8. Cây phả hệ của 3 dòng vi tảo B3, M6 và D14.

Dựa vào cây phả hệ có thể thấy được rằng 3 dòng vi tảo B3, M6 và D14 có mối quan hệ gần gũi với nhau, ba dòng vi tảo này đều được phân lập ở các vùng biển thuộc Đồng bằng Sông Cửu Long. Đặc biệt, 2 dòng vi tảo B3 và M6 có mối quan hệ rất gần gũi. Cây phả hệ cũng cho thấy dòng B3 và M6 thuộc 2 chi vi tảo *Aurantiochytrium* và *Schizochytrium*, trong khi dòng D14 thuộc chi *Thraustochytrium*. Theo nhiều nghiên cứu trước đây, dựa vào các đặc điểm hình thái thì 2 chi *Aurantiochytrium* và *Schizochytrium* được xếp vào cùng 1 chi là *Schizochytrium*. Theo nghiên cứu của Yokoyama và Honda (2007), dựa vào kỹ thuật sinh học phân tử kết hợp với các đặc điểm hình thái học và khả năng sản sinh các PUFA khác nhau, chi *Aurantiochytrium* đã được tách ra khỏi chi *Schizochytrium*. Mặc dù vậy, trong nghiên cứu này, dựa vào phân tích cây phả hệ bằng cặp môi Thraus-Schi2, hai chi *Aurantiochytrium* và *Schizochytrium* đều cùng thuộc về một nhóm. Như vậy, dòng B3 và M6 thuộc về cả 2 chi *Schizochytrium* và *Aurantiochytrium*. Điều này cũng phù hợp với kết quả nhận diện của các cặp môi trong nghiên cứu này. Từ đó cho thấy các cặp môi chuyên biệt được thiết kế trong nghiên cứu này có thể được sử dụng để nhận diện nhanh vi tảo cho hiệu quả cao.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã thiết kế được hai cặp môi Thraus-Schi1 và Thraus-Schi2, nhận diện chi vi tảo *Thraustochytrium* và *Schizochytrium* và một cặp chuyên biệt nhận diện *Schizochytrium*. Trong số 9 dòng vi tảo nghiên cứu, bằng kết quả nhận diện của các cặp môi được thiết kế cho thấy tất cả 9 dòng đều thuộc chi *Thraustochytrium* và *Schizochytrium*, trong đó có 2 dòng thuộc *Thraustochytrium* (dòng D14 và M19) và 7 dòng thuộc *Schizochytrium* (B1, B3, M3, M6, M7, M8 và M10). Ba dòng vi tảo được giải trình tự là B3, M6, D14, trong đó dòng B3 và M6 có quan hệ gần gũi hơn so với dòng D14 với dòng B3 đồng hình cao với

Schizochytrium sp. SKA10 ở mức độ 79% và dòng M6 ở mức 98% với *Schizochytrium* sp. KRT1, và dòng D14 đồng hình ở mức 93% với *Thraustochytrium* sp. BP3.2.2.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tài liệu tiếng Việt

Trần Thị Xuân Mai, Nguyễn Thị Liên, Lê Bích Tuyền và Dương Tấn Phát, (2014). *Nhận diện và tuyển chọn một số dòng vi tảo biển dị dưỡng Thraustochytrid có khả năng sản xuất acid béo không no và carotenoid ở một số vùng biển thuộc Đồng bằng Sông Cửu Long*. Đề tài Khoa học và Công nghệ cấp Trường. Đại học Cần Thơ.

2. Tài liệu tiếng nước ngoài

Aasen I. M., Ertesvåg H., Heggeset T. M. B., Liu B., Brautaset T., Vadstein O., and Ellingsen T. E., (2016). Thraustochytrids as production organisms for docosahexaenoic acid (DHA), squalene, and carotenoids. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(10), 4309-4321.

Bowles R. D., Hunt A. E., Bremer G. B., Duchars M. G., and Eaton R. A., (1999). Long-chain n-3 polyunsaturated fatty acid production by members of the marine protistan group the thraustochytrids: screening of isolates and optimization of docosahexaenoic acid production. *J Biotechnol*, 70, 193–202.

Chatdumrong W., Yongmanitchai W., Limtong S., and Worawattanamateekul W., (2007). Optimization of docosahexaenoic acid (DHA) production and improvement of astaxanthin content in a *Schizochytrium limacinum* isolated from mangrove forest in Thailand. *Kasetsart Journal (Nat. Sci.)*, 41, 324-334.

Gaertner A., (1972). Characters used in the classification of thraustochytriaceous fungi. *Veroeff Inst Meeresforsch Bremerhav*, 13, 183–194.

Honda D., Yokochi T., Nakahara T., Raghukumar S., Nakagiri A., Schaumann K., and Higashihara T., (1999). Molecular phylogeny of labyrinthulids and Thraustochytrids based on the sequence of 18S ribosomal RNA gene. *J. Eukaryot Microbiol*, 46, 637–646

Lewis T. E., Nichols P. D., and McMeekin T. A., (1999). The biotechnological potential of thraustochytrids. *Mar Biotechnol*, 1, 580–587.

Mo C., Douek J. and Rinkevich B., (2002). Development of a PCR strategy for thraustochytrid identification based on 18S rDNA sequence. *Marine Biology*, 140, 883-889.

Moss S. T., (1986). Biology and phylogeny of the Labyrinthales and Thraustochytriales. In S. T. Moss (Eds.), *The biology of marine fungi*. Cambridge: Cambridge University Press: 105-129.

Porter D., (1990). Phylum Labyrinthulomycota. In: L. Margulis, J. O. Corliss, M. Melkonian, D. J. Chapman (Eds), *Handbook of Protoctista*, 388-398. Boston: Jones and Bartlett.

Raghukumar S., Rahukumar C., and Rajendran A., (1990). Abundance of thraustochytrid fungi in the Arabian Sea. *Estuar Coast Shelf Sci*, 31, 351-358.

Ratledge C., (1993). Single cell oils—have they a biotechnological future? *Trends Biotechnol.*, 11, 278–284.

Rogers S. O., and Bendich A. J., (1988). Extraction of DNA from plant tissues. *Plant Molecular Biology Manual*, A6, 1 – 10.

Schneider J., (1977). Fungi. In G. Rheinheimer (Eds.), *Microbial ecology of a brackish water environment*. Berlin: Springer-Verlag, 90-102

Yokoyama R., and 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 *Aurantiochytrium* and *Oblongichytrium* gen. nov. *Mycoscience*, 4, 199-211.

DESIGN OF SPECIFIC PRIMERS FOR THE IDENTIFICATION OF THRAUSTOCHYTRIDS

Nguyen Lam Minh, Tran Thi Xuan Mai, Nguyen Thi Lien
Biotechnology Research and Development Institute, Can Tho University

Contact email: lamminh09011992@gmail.com

ABSTRACT

Microalgae possess a numerous concentration in polyunsaturated fatty acid such as Omega 3 and Omega 6, especially docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic (EPA). Identification of these heterotrophic microalgae by traditional method has faced several drawbacks. Throughout this research, 9 given microalgae were identified by molecular technique. As a result, all of these belonged to *Thraustochytrium* and *Schizochytrium* groups by testing with group-specific primers designed basing on 18S rDNA regions of target microalgae. Basically, all strains were *Thraustochytrium* and *Schizochytrium* included two *Thraustochytrium* (strains M19.1 and D14) and seven *Schizochytrium* by testing with *Schizochytrium* specific primers. Furthermore, in this research, three microalgae B3, M6 and D14 were sequenced by group-specific primers with approximate 1,000 bp products. The phylogenetic tree illustrated that strain B3 (highly homologous with *Schizochytrium* sp. SKA10 at 79%) and strain M6 (highly homologous with *Schizochytrium* sp. KRT1 at 98%) were close to *Schizochytrium* genus and strain D14 belonged to *Thraustochytrium* genus with 93% homologous with *Thraustochytrium* sp. BP3.2.2. In this research, designed primers helped to quickly identify genera of thraustochytrid.

Key words: Heterotrophic microalgae, Polyunsaturated fatty acid, *Schizochytrium*, *Thraustochytrium*.

Received: 29th December 2017 Reviewed: 22nd January 2018

Accepted: 28th January 2018