

**GHI NHẬN MỚI VÀ MỐI QUAN HỆ TIẾN HÓA CỦA  
EPIPHYTE (*Melanothamnus thailandicus*) TRÊN  
RONG SỤN (*Kappaphycus alvarezii*) TẠI KHÁNH HÒA  
NEW RECORD AND THE MOLECULAR PHYLOGENY OF  
EPIPHYTE (*Melanothamnus thailandicus*) ON RED ALGAE (*Kappaphycus alvarezii*) IN  
KHANH HOA**

**Đặng Thúy Bình<sup>1</sup>, Khúc Thị An<sup>1</sup>,  
Văn Hồng Cẩm<sup>1</sup>, Trần Văn Tuấn<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Viện Công nghệ sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nha Trang  
Tác giả liên hệ: Đặng Thúy Bình (Email: binhdt@ntu.edu.vn)

Ngày nhận bài: 25/03/2020; Ngày phản biện thông qua: 21/05/2020; Ngày duyệt đăng: 17/06/2020

**TÓM TẮT**

Rong sụn (*Kappaphycus alvarezii* Doty) là loài rong có giá trị kinh tế cao, phân bố ở vùng biển Châu Á Thái Bình Dương, trong đó có Việt Nam. Trong những năm gần đây, nghề nuôi rong sụn phát triển ở các tỉnh Miền Trung góp phần xóa đói giảm nghèo. Tuy nhiên, bệnh do rong phụ sinh (epiphyte) ảnh hưởng đến sản lượng và chất lượng rong sụn. Mẫu rong sụn nhiễm epiphyte được thu tại vịnh Cam Ranh và Vân Phong, Khánh Hòa. Epiphyte được khảo sát và định loại dựa trên đặc điểm hình thái, kiểm chứng phân loại và khảo sát mối quan hệ tiến hóa bằng chỉ thị *rbcL* của DNA lục lạp. Nghiên cứu phát hiện dạng true epiphyte (u lồi dạng sợi), định loại và ghi nhận mới *Melanothamnus thailandicus*, ở Việt Nam và trên song sụn. Trình tự *rbcL* của epiphyte thể hiện sự tương đồng cao (99,98%) với loài *M. thailandicus* phân bố ở Thái Lan. Cây phát sinh loài cho thấy *M. thailandicus* ở Khánh Hòa và Thái Lan sắp xếp cùng nhánh, và cùng với các loài thuộc giống *Melanothamnus* tạo thành nhánh đồng dạng. Nghiên cứu định loại chính xác epiphyte, khảo sát mối quan hệ phát sinh loài, bổ sung thành phần loài rong của Việt Nam, và góp phần phát hiện sớm tác nhân gây bệnh trong nghề nuôi rong sụn.

**Từ khóa:** Rong sụn, Epiphyte, *Kappaphycus alvarezii*, *Melanothamnus*, Khánh Hòa

**ABSTRACT**

*Kappaphycus alvarezii* Doty is a species of red algae with high economic value, distributed in Asia Pacific waters, including Vietnam. In recent years, seaweed farming has rapidly developed in the Central Provinces, contributing to poverty reduction. However, parasitic epiphyte affects the yield and quality of *K. alvarezii*. Samples of epiphyte infected *K. alvarezii* were collected in Cam Ranh and Van Phong Bays, Khanh Hoa. Epiphyte was investigated and identified based on morphological characteristics. Taxonomic verification and molecular phylogeny were examined by *rbcL* gene of Chloroplast DNA. The study discovered a true epiphyte, identified as *Melanothamnus thailandicus*, a new record in Vietnam, and on *K. alvarezii*. The *rbcL* sequence of *M. thailandicus* exhibits a high similarity (99.98%) with this species distributed in Thailand. Phylogenetic tree showed that *M. thailandicus* in Khanh Hoa and Thailand were clustered in the same clade, and together with species of the genus *Melanothamnus* formed monophyletic lineage. Current research identified parasitic epiphyte on *K. alvarezii*, examined the molecular phylogeny, contributing to update list of seaweed species in Vietnam, as well as early pathogen detection for seaweed aquaculture.

**Key words:** Red algae, Epiphyte, *Kappaphycus alvarezii*, *Melanothamnus*, Khanh Hoa

**I. ĐẶT VẤN ĐỀ**

Rong sụn (*Kappaphycus alvarezii* Doty) sinh trưởng tự nhiên ở vùng biển Châu Á Thái Bình Dương, nhất là vùng Đông Nam Á. Rong

sụn có giá trị kinh tế cao, dùng để chế biến carrageenan, một chế phẩm được ứng dụng rộng rãi trong các ngành công nghiệp chế biến thực phẩm, y dược, mỹ phẩm. Nghề trồng rong

sụn hiện nay đem lại lợi ích kinh tế khá lớn cho nhiều nước trên thế giới, đặc biệt là các nước Đông Nam Á như Philippines, Malaysia, Indonesia và Việt Nam với tổng sản lượng lên đến 95% tổng sản lượng rong sụn khô tiêu thụ trên toàn thế giới, ước chừng khoảng 160.000 tấn khô/năm [3,12].

Khánh Hòa với lợi thế đường bờ biển dài 200 km, với hơn 200 hòn đảo lớn nhỏ, nhiều vũng, vịnh lớn (Vân Phong, Nha Trang, Cam Ranh), có khí hậu ôn hòa là điều kiện thuận lợi để nuôi trồng rong sụn [2,3]. Tuy nhiên, hiện nay nghề trồng rong sụn đang phải đối mặt với rất nhiều khó khăn và thách thức như nguồn giống và chất lượng giống không đảm bảo, năng suất và chất lượng rong giảm, đặc biệt khí hậu thay đổi phức tạp (cường độ ánh sáng tăng, độ mặn nước biển cao, mực nước biển dâng) do ảnh hưởng của biến đổi khí hậu toàn cầu làm dễ dẫn đến bùng phát các dịch bệnh như bệnh ice-ice (bệnh trắng lùn thân) và bệnh epiphyte (rong tảo phụ sinh) trên rong nuôi [4].

Các nghiên cứu trên thế giới về bệnh epiphyte cho thấy epiphyte gây ảnh hưởng rất lớn đến năng suất và chất lượng của rong sụn [8,17]. Các công bố đã chỉ ra mùa vụ là nhân tố chính ảnh hưởng đến việc bùng phát dịch bệnh do epiphyte và gây nhiễm khuẩn thứ cấp ở rong sụn [13,20,22].

Ở Việt Nam các nghiên cứu chủ yếu tập trung vào các kỹ thuật nuôi trồng và chiết suất carrageenan từ rong sụn [2,3,5]. Epiphyte hiện diện thường xuyên và là một thành phần

quan trọng trong hệ sinh thái biển [6]. Đối với nghề nuôi rong sụn, bệnh trắng lùn thân (ice-ice disease) đã ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của rong sụn [1,4]. Tuy nhiên, các nghiên cứu về bệnh do epiphyte vẫn còn hạn chế.

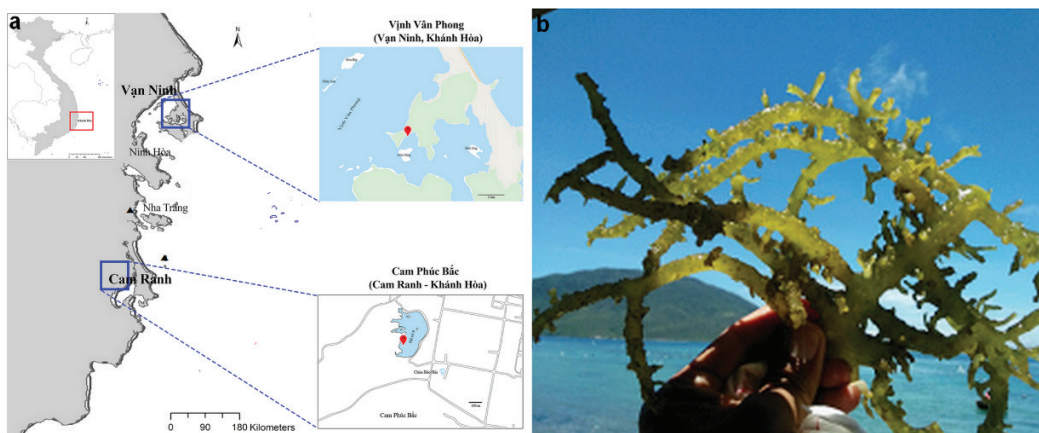
Trong những thập kỷ gần đây, chỉ thị phân tử được sử dụng rộng rãi trong phân loại sinh vật. Đối với thực vật, chỉ thị Ribulose biphosphate carboxylase large subunit (rbcL) của DNA lục lạp chứng tỏ là công cụ hữu hiệu trong định loại và khảo sát mối quan hệ phát sinh loài, đặc biệt đối với rong biển [16], trong đó có rong phụ sinh [9,15].

Nghiên cứu hiện tại định loại và khảo sát mối quan hệ tiến hóa với ghi nhận mới loài rong nâu dạng sợi sống phụ sinh trên rong sụn dựa trên đặc điểm hình thái và di truyền. Phát hiện này bổ sung dữ liệu về thành phần rong phụ sinh trên rong sụn, góp phần phát hiện sớm mầm bệnh trong phát triển nghề nuôi rong.

## II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 1. Địa điểm và phương pháp thu mẫu

Mẫu rong sụn được thu tại các vị trí khác nhau, trải đều trên diện tích nuôi trồng của các hộ nuôi tại Cam Phúc Bắc (11°58'7"N, 109°12'8"E), Cam Ranh - Khánh Hòa (50 mẫu) và Vịnh Vân Phong (12°39'38"N, 109°20'47"E), Vạn Ninh, Khánh Hòa (50 mẫu) từ tháng 6 năm 2017 đến tháng 9 năm 2018 (Hình 1).



Hình 1. Bản đồ thu mẫu (a) rong sụn nhiễm epiphyte (b) tại Khánh Hòa. Khung hình vuông màu xanh chỉ khu vực thu mẫu (Địa điểm được chi tiết tại vịnh Vân Phong và Cam Ranh).

Các mẫu rong sau khi thu được bao bọc bằng giấy báo, sau đó vận chuyển về phòng thí nghiệm trong các thùng xốp được làm âm (nhiệt độ  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) bằng nước biển. Mẫu rong sau đó được lưu giữ trong các bể kính (80/50/30 cm) chứa nước biển, chiếu sáng tự nhiên, và sục khí. Mẫu rong được rửa sạch lần nữa bằng bàn chải mềm và bảo quản trong formalin 5% (đệm nước biển, pH 7.8, độ mặn 30 ppt) [20].

## 2. Định loại epiphyte bằng phương pháp hình thái và di truyền

### 2.1. Định loại epiphyte bằng đặc điểm hình thái

Sử dụng dao lam cắt những lát cắt mỏng <0,1mm trên thân rong tại những vị trí nhiễm epiphyte (có biểu hiện chấm đen, phồng lên hoặc lộ lỗ). Lát cắt được quan sát dưới kính hiển vi quang học (Olympus DP50) ở các độ phóng đại 100 - 400 [20]. Sau đó dùng panh, kẹp và kim nhỏ để gỡ các epiphyte ra khỏi thân rong và quan sát dưới kính hiển vi quang học (Olympus DP50). Epiphyte được định loại dựa theo Trono (1999) [19] và Muangmai et al. (2014) [15].

### 2.2. Định loại epiphyte bằng phương pháp sinh học phân tử

#### Tách chiết và kiểm tra DNA tổng số

Mẫu rong phụ sinh được thu nhận trong ống ly tâm ependorf 1,5ml, nghiền trong Nitơ lỏng thành dạng bột mịn. Sau đó, DNA tổng số được tách chiết bằng bộ kit Wizard® SV Genomic DNA Purification System (Promega, Mỹ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất có hiệu chỉnh. Ở bước thu hồi, thay vì rửa giải một lần duy nhất với thể tích 250 µl Nuclease-Free Water, tiến hành rửa giải 3 lần với 70 µl AE Buffer nhằm thu được DNA có chất lượng tốt và nồng độ cao. Sản phẩm tách chiết DNA tổng số được điện di trên gel agarose 1,5% bằng hệ thống điện di ngang (Biorad), nhuộm Ethidium bromide và quan sát bằng thiết bị UV Transilluminator (M-20E, Mỹ).

#### Khuếch đại đoạn gen *rbcL* của DNA lục lạp và giải trình tự

Nghiên cứu tiến hành phản ứng PCR khuếch đại đoạn gen Ribulose bisphosphate carboxylase large subunit (*rbcL*) của DNA lục lạp sử dụng cặp mồi F57-5'-GTA ATT CCA

TAT GCT AAA ATG GG-3' và R1381-5'ATC TTT CCA TAG ATC TAA AGC-3' [10]. Phản ứng PCR được tiến hành với tổng thể tích 25 µL gồm: 5 µl Green Gotaq® Flexi Buffer (Promega) 5X, 3 µl  $\text{MgCl}_2$  25mM, 1 µl dNTPs 10mM, 1 µl mỗi mồi (10 mM), 0,2 µl GoTaq polymerase (5 U/µl), 5 µl ADN và nước cho đủ thể tích. Thành phần phản ứng được hiệu chỉnh bằng cách cho thêm PEG 10% và bột Skim Milk 0,1% (W/v) (mỗi loại 0,5 µl) để tăng độ nhạy của phản ứng [7]. Phản ứng được chạy trên máy luân nhiệt C1000 Touch (Bio-Rad) theo chu trình nhiệt độ như sau: Biến tính ban đầu tại  $94^{\circ}\text{C}$  trong 3 phút; sau đó là 38 chu kỳ của  $94^{\circ}\text{C}$  trong 45 giây, nhiệt độ bắt cặp  $49^{\circ}\text{C}$  trong 50 giây,  $72^{\circ}\text{C}$  trong 1 phút; cuối cùng là bước kéo dài tại  $72^{\circ}\text{C}$  trong 10 phút và giữ mẫu ở  $4^{\circ}\text{C}$ . Sản phẩm PCR được giải trình tự theo nguyên tắc Dye – labelled dideoxy terminator (Big Dye Terminator v.3.1, Applied Biosystems) với các đoạn mồi tương tự như phản ứng PCR theo chương trình luân nhiệt như sau:  $96^{\circ}\text{C}$  trong 20 giây,  $50^{\circ}\text{C}$  trong 20 giây, cuối cùng là  $60^{\circ}\text{C}$  trong 4 phút. Sản phẩm sau đó được phân tích bằng thiết bị ABI Prism 3.700 DNA Analyser (Applied Biosystems) tại Công ty 1<sup>st</sup> Base, Singapore.

## 3. Kiểm chứng phân loại và xây dựng mối quan hệ phát sinh chủng loại

Trình tự của mẫu rong phụ sinh được kết nối sử dụng tính năng Contig Express thuộc phần mềm Geneious Pro v.5.5.7 [14]. Sau đó, các trình tự được kiểm chứng bằng chương trình BLAST Nucleotide trên website của Ngân hàng quốc tế Genbank. Trình tự rong phụ sinh thu được và các trình tự cùng loài và giống có trên Genbank được đóng hàng và so sánh sự khác biệt di truyền dựa trên phần mềm Bioedit [11].

Mối quan hệ phát sinh loài của epiphyte được khảo sát dựa trên trình tự loài rong thu được (loài *Melanothamnus thailandicus*), trình tự cùng loài (3 trình tự), 10 trình tự của loài cùng giống (trước kia được định danh là giống *Neosiphonia*), và 4 trình tự loài khác giống (*Polysiphonia* spp.) trên Genbank. Thông tin về trình tự, địa điểm thu mẫu và mã số

genbank được trình bày ở Bảng 1. Phân tích được tiến hành dựa trên thuật toán Neighbour Joining (NJ), với giá trị tin cậy (Bootstrap –

BT) là 1000 sử dụng phần mềm Mega 7.0 [18]. *Spyridiocolax capixaba* và *Spyridia clavata* (Spyridiaceae) được sử dụng làm nhóm ngoại.

**Bảng 1. Thông tin về trình tự, địa điểm thu mẫu và mã số Genbank của các loài epiphyte. Tên loài được liệt kê theo Genbank. Tên loài cập nhật được mô tả ở hình 6.**

STT	Loài	Địa điểm thu mẫu	Mã số Genbank	Nguồn
1	<i>Melanothamnus thailandicus</i>	Việt Nam	MT499883	Nghiên cứu hiện tại
2	<i>Neosiphonia thailandica</i>	Thái Lan	KM502785-87	Muangmai (2014)
3	<i>Neosiphonia yongpili</i>	Hàn Quốc	KT964453	Kim và Kim (2016)
4	<i>Neosiphonia yendoii</i>	Hàn Quốc	KX265484	Kim et al. (2016)
5	<i>Neosiphonia sphaerocarpa</i>	Hàn Quốc	KX265479	Kim et al. (2016)
6	<i>Neosiphonia japonica</i>	Nhật Bản	KX265440	Kim et al. (2016)
7	<i>Neosiphonia tongatensis</i>	Panama	HM573570	Mamoozadeh và Freshwater (2012)
8	<i>Neosiphonia harlandii</i>	Hàn Quốc	DQ787485	Kim và Yang (2006)
9	<i>Neosiphonia decumbens</i>	Hàn Quốc	DQ787480	Kim và Yang (2006)
10	<i>N.teradomariensis</i>	Hàn Quốc	KX265441	Kim et al. (2016)
11	<i>Neosiphonia flavimarina</i>	Hàn Quốc	KX265439	Kim et al. (2016)
12	<i>Melanothamnus harveyi</i>	Úc	MF101437	Díaz-Tapia et al. (2017)
13	<i>Polysiphonia pacifica</i>	Canada	MF120858	Savoie và Saunders (2019)
14	<i>Polysiphonia stricta</i>	Canada	EU492916	Stuercke (2006)
15	<i>Polysiphonia adamsiae</i>	Úc	MH101825	Díaz-Tapia et al. (2008)
16	<i>Polysiphonia atlantica</i>	Tây Ban Nha	JX828142	Bárbara et al. (2013)
17	<i>Spyridiocolax capixaba</i>	Brazil	MH884603	Chen et al. (2019)
18	<i>Spyridia clavata</i>	Panama	KU756119	Won et al. (2019)

### III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

#### 1. Định loại dựa trên đặc điểm hình thái

Sau khi quan sát các lát cắt, kết hợp với quan sát hình thái từng mẫu epiphyte dưới kính hiển vi quang học, đối chiếu với các tài liệu về phân loại, nghiên cứu định loại và ghi nhận mới 1 loài epiphyte trên rong sụn dựa trên đặc điểm hình thái.

***Melanothamnus thailandicus* (N. Muangmai & C.Kaewsuralikhit) Díaz-Tapia & Maggs, 2017**

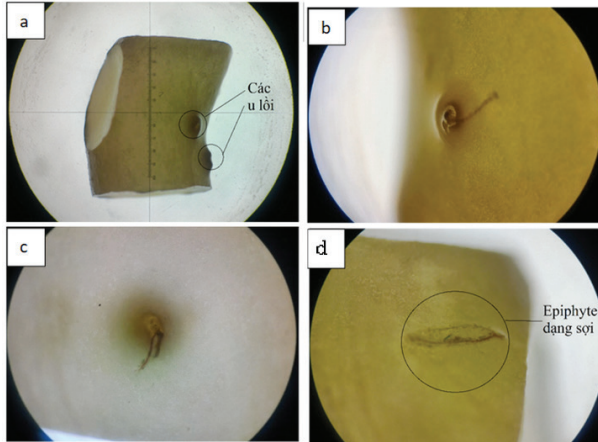
*Địa điểm thu mẫu:* Vịnh Cam Ranh và Vịnh Vân Phong, Khánh Hòa

*Vật chủ:* *Gracilaria fisher* (Thái Lan), *Kappaphycus alvarezii* (Việt Nam, ghi nhận mới)

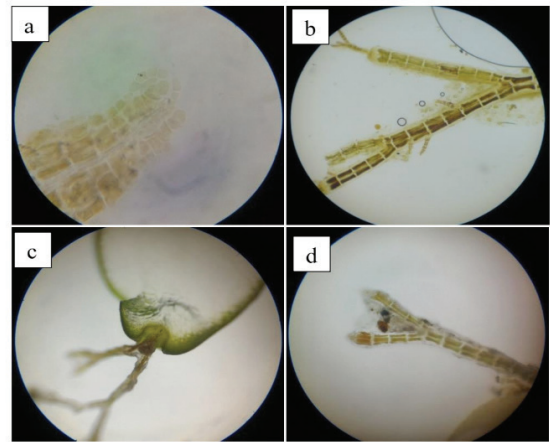
*Dạng Epiphyte (true epiphyte):* Đầu tiên,

epiphyte hình thành các đốm đen li ti, chưa có hình dạng rõ ràng, xung quanh các đốm đen có dấu hiệu của sự tổn thương cấu trúc mô, sau đó, tạo thành các u lồi (Hình 2a), có thể chỉ là các u lồi có đỉnh đen, ngay tâm hình thành nên dạng sợi, ban đầu chỉ là sợi nhỏ, nhưng dần dần hình thành dạng sợi lớn (Hình 2b,c) rồi sau đó có khả năng phân nhánh tạo dạng cây (Hình 2d).

*Đặc điểm hình thái:* Kích thước chiều dài từ 0,3 - 2 cm, trung bình 1,5 ±0,05 (n=30) có màu nâu đỏ khi quan sát dưới kính hiển vi, thân chia thành các đốt theo chiều dọc, phân nhánh ở gốc, dạng chữ Y (Hình 3b,c), có 4 tế bào quanh tế bào trung tâm ở mỗi đốt (Hình 3b), nhánh mang bào tử chỉ có 3 tế bào (Hình 3d). Đỉnh sinh trưởng chia thành 3 thùy, 1 thùy lớn ở giữa, 2 thùy nhỏ 2 bên (Hình 3a).



**Hình 2. Các dạng của epiphyte dưới kính hiển vi soi nổi.** a) Dạng u lồi; b và c) Dạng u lồi mọc sợi, d) Dạng sợi.



**Hình 3. Hình thái ngoài của *M. thailandicus*.** a) Đỉnh sinh trưởng. b) Phân nhánh chữ Y. c) Phân nhánh ở gốc. d) Nhánh mang bào tử.

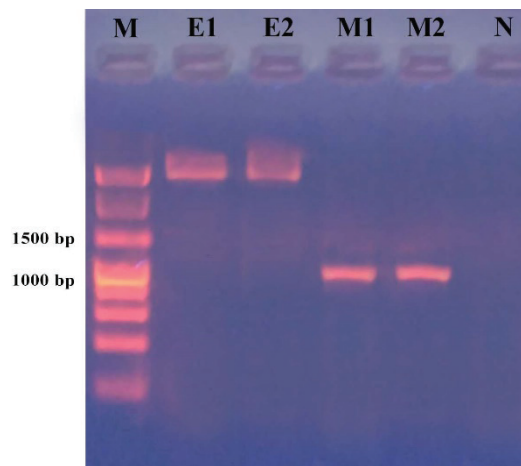
**2. Kiểm chứng định loại epiphyte bằng phương pháp sinh học phân tử**

**2.1. Tách chiết DNA và khuếch đại gen *rbcL* của DNA lục lạp**

Kết quả điện di DNA tổng số tách chiết từ mẫu epiphyte là 1 băng rõ nét nhưng có vết sáng kéo dài (lần rửa giải thứ nhất - E1) do có nhiều DNA bị đứt gãy, và 1 băng cho dài sáng mờ hơn nhưng không có vết sáng kéo dài (lần

rửa giải thứ hai - E2) (Hình 4). Để đảm bảo chất lượng DNA cho phản ứng PCR, nghiên cứu sử dụng DNA tách chiết từ mẫu rửa giải E2 để khuếch đại đoạn gen *rbcL*.

Sử dụng DNA tổng số đã tách chiết làm khuôn, cặp mồi F57 và R1381 [10], sản phẩm PCR của gen *rbcL* thu được cho kết quả phù hợp với tính toán lý thuyết. Các mẫu đều có băng với kích thước tương ứng 1324 bp (Hình 4).



**Hình 4: Hình ảnh điện di DNA tổng số và sản phẩm PCR gen *rbcL* của loài *Melanothamnus thailandicus***

M: Thang chuẩn DNA 100 bp, E1, E2: DNA tổng số ở lần rửa giải 1 và 2, M1, M2: sản phẩm PCR của *M. thailandicus*, N: mẫu đối chứng âm.

**2.2. Kiểm chứng định loại bằng chỉ thị phân tử**

Sản phẩm khuếch đại gen *rbcL* của loài *M. thailandicus* được giải trình tự và đóng hàng, thu được trình tự dài 1120 bp. Sử dụng

tính năng Blast, và so sánh trình tự khác biệt, trình tự loài *M. thailandicus* thể hiện sự tương đồng 99,98% (1 sai khác nucleotide tại vị trí 683 trên 1120 bp). Sự khác biệt di

truyền là 0,02 % khi so sánh với các trình tự của loài này trên Genbank (Hình 5).

*M. thailandicus* được mô tả bởi Muangmai et al (2014) [15] với tên loài *Neosiphonia thailandica* ở cảng Sri Racha, Vịnh Thái Lan.

Tên loài	665	675	685	695	705	715
<i>M.thailandica</i>	CATAGAATAT	AGAAATCTTT	CTTTCCA <b>G</b> CG	CATAAAAAGGC	TGCGAATTAA	TGTTTTCATC
M.thKM502785	CATAGAATAT	AGAAATCTTT	CTTTCCA <b>A</b> CG	CATAAAAAGGC	TGCGAATTAA	TGTTTTCATC
M.thKM502787	CATAGAATAT	AGAAATCTTT	CTTTCCA <b>A</b> CG	CATAAAAAGGC	TGCGAATTAA	TGTTTTCATC
M.thKM502786	CATAGAATAT	AGAAATCTTT	CTTTCCA <b>A</b> CG	CATAAAAAGGC	TGCGAATTAA	TGTTTTCATC

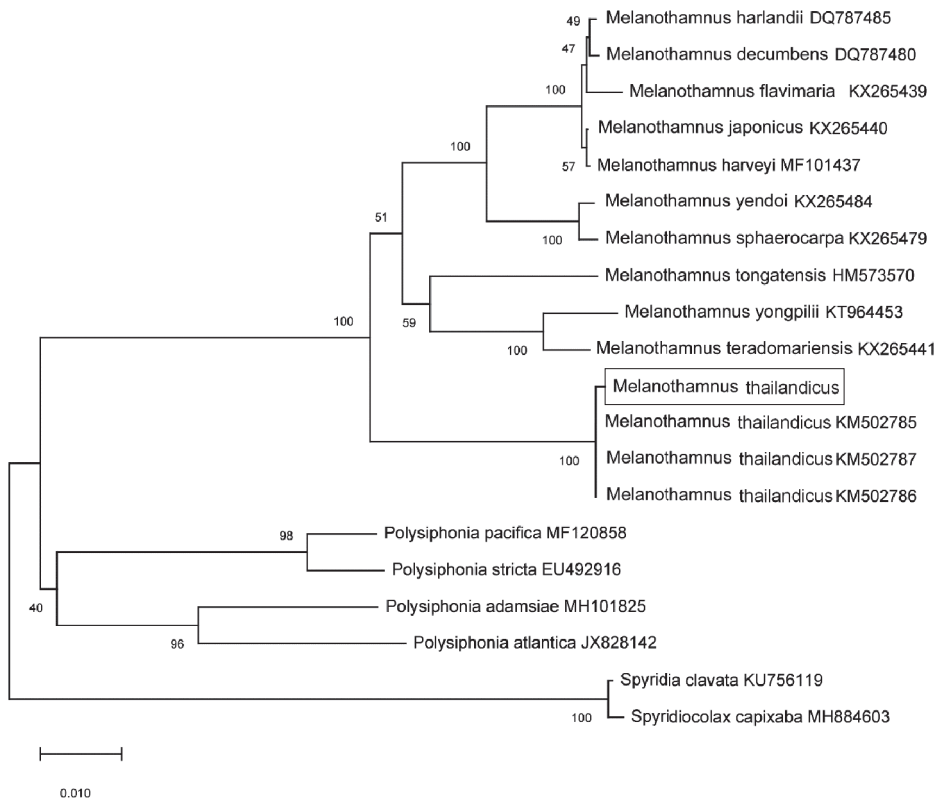
**Hình 5: Vị trí khác biệt Nucleotide (vị trí 683, in đậm) của trình tự rbcL loài *M. thailandicus* so với các trình tự trên Genbank.**

Nghiên cứu hiện tại cho thấy sự tương đồng về mặt hình thái (phân nhánh gốc chữ Y, đỉnh sinh trưởng có 3 tế bào), và di truyền (tương đồng là 99,98% dựa trên chỉ thị rbcL của DNA lục lạp) có thể định loại chính xác loài này là *Melanothamnus thailandicus*. Theo Muangmai et al (2014) [15], *M. thailandicus* được tìm thấy trên *Gracilaria fisher*, vì vậy đây là lần

Đặc trưng hình thái cơ bản là các nhánh bào tử có 3 tế bào xung quanh. Phân tích mối quan hệ phát sinh loài cho thấy *M. thailandicus* sắp xếp chung nhánh với các loài *Neosiphonia*, và gần gũi với loài *N. sphaerocarpa* và *P. forfex*.

đầu tiên loài này được ghi nhận trên rong sụn.  
**2.3. Khảo sát mối quan hệ phát sinh loài *Melanothamnus thailandicus***

Dựa trên trình tự loài *M. thailandicus* từ nghiên cứu hiện tại, và các trình tự có sẵn trên Genbank (Bảng 1), phân tích mối quan hệ phát sinh loài với giá trị BT trên các nhánh được biểu hiện ở Hình 6.



**Hình 6: Cây phát sinh loài (phương pháp NJ, phần mềm Mega) của các loài *Melanothamnus*. Giá trị tin cậy (Boostraps) được biểu hiện trên các nhánh. Hình chữ nhật là loài trong nghiên cứu hiện tại. Tên mới được cập nhật theo Díaz-tapia et al. (2017) [9]**

Trên Hình 6, Loài *M. thailandicus* (tên cũ *Neosiphonia thailandica*) được xếp chung một nhánh riêng biệt với các loài này thu từ Thái Lan (BT 100%), giúp khẳng định sự định loại chính xác và vị trí phân loại của loài. Loài *M. thailandicus* cùng với các loài cùng giống tạo thành một nhánh đồng dạng với giá trị BT cao (100%). Các loài *Melanothamnus* spp. thể hiện mối quan hệ gần gũi với các loài thuộc giống *Polysiphonia*.

Theo Muangmai et al. (2014) [15], *N. thailandica* có quan hệ gần gũi với loài *N. sphaerocarpa* và *Polysiphonia forfex*. Díaz-tapia et al. (2017) [9] đề xuất giống *Melanothamnus* (bao gồm các loài của giống *Fernandosiphonia* và *Neosiphonia*, và xếp 3 loài trên vào giống *Melanothamnus*. Giống *Melanothamnus* (gồm 46 loài) đặc trưng bởi định sinh trưởng có 3 tế bào. Nguồn gốc tiến hóa của giống *Melanothamnus* được ước tính

là 75,7 - 95,78 triệu năm trước. Mặc dù phát sinh trong kỷ Phần trắng, *Melanothamnus* là một giống chủ yếu ở Ấn Độ - Thái Bình Dương, do đó sự vắng mặt của giống này ở phía đông bắc Đại Tây Dương hiện vẫn chưa thể giải thích [9].

#### IV. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ:

Nghiên cứu ghi nhận mới epiphyte trên rong sụn. Dựa trên đặc điểm hình thái và di truyền, nghiên cứu định loại chính xác loài *Melanothamnus thailandicus* và khảo sát mối quan hệ tiến hóa. Cần có nghiên cứu chuyên sâu và trên diện rộng các dạng/loài epiphyte trên rong sụn nhằm bổ sung thành phần loài, tác nhân gây bệnh góp phần phát hiện sớm và có biện pháp phòng, trừ bệnh thích hợp.

**LỜI CẢM ƠN:** Nhóm tác giả xin gửi lời cảm ơn đến Ths. Trương Thị Oanh, và Ths. Trần Quang Sáng đã hỗ trợ xử lý hình ảnh và số liệu di truyền.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

##### Tiếng Việt

1. Bùi Đình Lâm, Đinh Thị Ngọc Mai, Nguyễn Lâm Anh, Hoàng Thị Lan, Đinh Thị Thu Hằng, Trần Thị Hồng Hà, Lê Mai Hương, Đặng Diễm Hồng (2010), “Đa dạng sinh học của các loài vi sinh vật cơ hội gây bệnh trắng nhũn thân (ice – ice disease) trên Rong Sụn (*Kappaphycus alvarezii*, *K. striatum*) ở miền trung Việt Nam”. *Tap chí Khoa học và Công nghệ*. 48, Tr. 311–319.
2. Đinh Thị Hải Yến, (2005) “Thử nghiệm trồng rong sụn (*Kappaphycus alvarezii* Doty) tại Đầm Báy, Nha Trang, Khánh Hòa”, Kỹ yếu Hội Nghị Khoa Học Toàn Quốc về Sinh Thái và Tài Nguyên Sinh Vật Lần Thứ 6. Tr. 1828–1833.
3. Huỳnh Quang Năng (2006), “Hoạch định vùng phát triển trồng rong sụn (*Kappaphycus alvarezii*) ven biển phía Nam Việt Nam”. Báo cáo khoa học, Tr. 25-28.
4. Lê Mai Hương, Trần Mai Đức (2010), “Nghiên cứu công nghệ sản xuất và ứng dụng chế phẩm vi sinh trong phòng bệnh nhũn thân (ice-ice disease) ở rong sụn Việt Nam”, Báo cáo đề tài nghiên cứu khoa học chương trình CNSH thủy sản.
5. Ngô Thị Thu Thảo, Huỳnh Hàn Châu, Trần Ngọc Hải (2010), “Ảnh hưởng của việc nuôi kết hợp các mật độ rong sụn (*Kappaphycus alvarezii*) với tôm chân trắng (*Litopenaeus vannamei*)”. *Tap chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ* 16a, Tr. 100–110.
6. Nguyễn Hữu Đại (1999), “Rong biển phụ sinh (Epiphyte) trên cỏ biển ở Khánh Hòa”. *Tuyển tập Nghiên cứu biển IX*, Tr. 196–204.

##### Tiếng Anh

7. Arbeli, Z., Fuentes, C.L., (2007), "Improved purification and PCR amplification of DNA from environmental samples". *FEMS Microbiology Letters* 272, pp. 269–275. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00764.x>.

8. Borlongan, I.A.G., Luhan, M.R.J., Padilla, P.I.P., Hurtado, A.Q., (2016), "Photosynthetic responses of 'Neosiphonia sp. epiphyte-infected' and healthy *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta) to irradiance, salinity and pH variations", *Journal of Applied Phycology*. 28, pp. 2891–2902 <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0833-4>.
9. Díaz-tapia, P., Mcivor, L., Freshwater, D.W., Verbruggen, H., Wynne, M.J., Maggs, C.A., Gray, V.S.F., (2017). "The genera *Melanothamnus* Bornet & Falkenberg and *Vertebrata* S . F . Gray constitute well-defined clades of the red algal tribe Polysiphoniae". *European Journal of Phycology* 52, 1–30. <https://doi.org/10.1080/09670262.2016.1256436>.
10. Freshwater, D.W., Ueness, J., (1994). "Phylogenetic relationships of some European *Gelidium* (Gelidiales, Rhodophyta) species, based on rbcL nucleotide sequence analysis". *Phycologia* 33.
11. Hall, T.A., (1999). "BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows95/98/NT". *Nucleic Acids Symposium Series*. 41, pp. 95–98.
12. Hayashi, L., Anicia., Hurtado, Msuya, F., Bleicher-Lhonneur, G., Critchley, Alan, (2010). "A Review of *Kappaphycus* Farming: Prospects and Constraints, in: Seaweeds and Their Role in Globally Changing Environments". *Springer Dordrecht Heidelberg*, London, pp. 254–283. <https://doi.org/10.1007/978-90-481-8569-6>.
13. Hurtado, A., Critchley, A., (2006). "Seaweed industry of the Phillipines and the problem of epiphytism in *Kappaphycus* farming, in: & Critchley, Ang, P.O. (Eds.)", *Advances in Seaweed Cultivation and Utilisation in Asia*. University of Malaya, Kuala Lumpur, pp. 21–28.
14. Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., Drummond, A., (2012). "Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data". *Bioinformatics* 28, pp. 1647–1649. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>
15. Muangmai, N., Yamagishi, Y., Maneekat, S., Kaewsuralikhit, C., (2014). "The new species *Neosiphonia thailandica* sp. nov. (Rhodomelaceae, Rhodophyta) from the Gulf of Thailand". *Botanica Marina*. 57, pp. 459–467. <https://doi.org/10.1515/bot-2014-0042>
16. Nguyen, X., Nguyen, T., Dao, V., Liao, L., (2019). "New record of *Grateloupia taiwanensis* S . -M . Lin et H . -Y . Liang in Vietnam : Evidence of morphological observation and rbc L sequence analysis". *Biodiverstas* 20, 688–695. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d200311>
17. Rantetondok, Alexander., Latama, G., (2017). "Epiphytic and Ice-ice Diseases of Seaweed, *Kappaphycus alvarezii* and its Effect on Growth Rate and Carrageenan Qualit". *International Journal of Aquaculture* 7, pp. 134–138. <https://doi.org/doi: 10.5376/ija.2017.07.0021>.
18. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., (2013). "MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0". *Moecular Biology and Evoluion* 30, pp. 2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>.
19. Trono, C., (1999). "Seaweeds, in: Carpenter, K.E. and Niem, V.H. (Ed.)", *The Living Marine Resources of the Western Central Pacific*, Vol. 1. FAO Species Identification Guide for Fishery Purposes. . FAO, Rome, pp. 19–99.
20. Vairappan, C., Chung, CS., Matsunaga, S., (2014). "Effect of epiphyte infection on physical and chemical properties of carrageenan produced by *Kappaphycus alvarezii* Doty (Soliericeae, Gigartinales, Rhodophyta)". *Journal of Applied Phycolog* 26, pp. 923–931. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0126-0>.
21. Vairappan, C.S., (2006). "Seasonal occurrences of epiphytic algae on the commercially cultivated red alga *Kappaphycus alvarezii* (Solieriaceae, Gigartinales, Rhodophyta)". *Journal of Applied Phycolog* 18 (3), pp. 611–617. <https://doi.org/10.1007/s10811-006-9062-6>
22. Vairappan, C.S., Chung, C.S., Lhonneur, G.B., Critchley, A., (2007). "Distribution and symptoms of epiphyte infection in major carrageenophyte-producing farms". *Journal of Applied Phycolog*. <https://doi.org/10.1007/s10811-007-9299-8>.