

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Lê Quang Huy

**NGHIÊN CỨU PHÁT HIỆN VI NẤM NỘI SINH
TỪ MỘT SỐ CÂY DƯỢC LIỆU VIỆT NAM**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ
NGÀNH SINH HỌC THỰC NGHIỆM**

Hà Nội - Năm 2023

LÊ QUANG HUY

SINH HỌC THỰC NGHIỆM

2023

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Lê Quang Huy

**NGHIÊN CỨU PHÁT HIỆN VI NẤM NỘI SINH
TỪ MỘT SỐ CÂY DƯỢC LIỆU VIỆT NAM**

Chuyên ngành : Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8 42 01 14

**LUẬN VĂN THẠC SĨ NGÀNH
SINH HỌC THỰC NGHIỆM**

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

GS.TS. NGUYỄN HUY HOÀNG

Hà Nội - Năm 2023

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi hoàn toàn chịu trách nhiệm.

Học viên



Lê Quang Huy

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới GS.TS. Nguyễn Huy Hoàng, Viện Nghiên cứu hệ Gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, người đã tận tình chỉ bảo, hướng dẫn cho tôi trong suốt quá trình thực hiện luận văn tốt nghiệp này.

Đồng thời, tôi xin cảm ơn toàn thể cán bộ nghiên cứu Phòng Hệ gen học chức năng, Viện Nghiên cứu hệ Gen đã trực tiếp tạo điều kiện và giúp đỡ tôi trong quá trình làm thực nghiệm để có thể hoàn thành luận văn tốt nghiệp đúng thời gian quy định.

Tôi xin chân thành cảm ơn các thầy cô giáo Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã truyền đạt cho tôi những kiến thức quý báu trong quá trình học tập và rèn luyện tại trường, đặc biệt là các thầy cô trong Ban chủ nhiệm khoa và Văn phòng khoa Công nghệ sinh học, các thầy cô đã luôn tạo điều kiện và giúp đỡ tôi trong suốt thời gian học tập.

Tôi cũng xin cảm ơn ban lãnh đạo cùng toàn thể cán bộ công nhân viên Công ty Cổ phần Kỹ thuật và Sinh học Ứng dụng Việt Nam đã tạo điều và giúp đỡ tôi trong quá trình tôi thực hiện luận văn tốt nghiệp này.

Cuối cùng, tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành đến gia đình và bạn bè, đã quan tâm và tạo điều kiện thuận lợi cho tôi hoàn thành tốt nhiệm vụ được giao trong thời gian học tập và làm luận văn tốt nghiệp này.

Hà Nội, tháng 5/2023

Học viên



Lê Quang Huy

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	iii
LỜI CẢM ƠN	iv
MỤC LỤC	v
Danh mục các ký hiệu, chữ cái viết tắt	vii
Danh mục các bảng	vii
Danh mục các hình vẽ	viii
MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. TỔNG QUAN VỀ CÂY DƯỢC LIỆU VIỆT NAM	3
1.1.1. Cây dược liệu Việt Nam	3
1.1.2. Giới thiệu chung về cây Dừa cạn	4
1.1.3. Giới thiệu chung về cây Bạch hoa xà thiệt thảo	5
1.2. TỔNG QUAN VỀ VI SINH VẬT	7
1.2.1. Khái niệm chung	7
1.2.2. Mối quan hệ của vi sinh vật	8
1.2.3. Mối quan hệ giữa vi sinh vật và thực vật:	8
1.2.4. Vai trò của vi sinh vật đất đối với thực vật	9
1.2.5. Vi sinh vật nội sinh	9
1.3. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU CÁC CHỦNG NẤM NỘI SINH	15
1.3.1. Tổng quan tình hình nghiên cứu trên thế giới	15
1.3.2. Tổng quan tình hình nghiên cứu trong nước	19
CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	23
2.1. VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU	23
2.1.1. Vật liệu thực vật	23
2.1.2. Hóa chất, dụng cụ, thiết bị và môi trường	23
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	25
2.2.1. Thu thập và định danh mẫu cây dược liệu	25
2.2.2. Phương pháp xác định vi nấm nội sinh từ các cây dược liệu Việt Nam	29
2.2.3. Phương pháp xây dựng cây phân loại	32
2.2.4. Phương pháp phát hiện nhanh các chủng có hoạt tính sinh học bằng phương pháp TLC	32
2.2.5. Phân tích thông kê	33
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	34
3.1. KẾT QUẢ THU THẬP VÀ ĐỊNH DANH CÁC MẪU CÂY DƯỢC LIỆU	34
3.1.1. Kết quả thu thập mẫu cây dược liệu	34
3.1.2. Kết quả định danh các cây dược liệu thu thập	36
3.1.3. Phân lập nấm nội sinh từ mẫu cây dược liệu	44
3.2. CÂY PHÁT SINH CHỦNG LOẠI VI SINH VẬT	47
3.2.1. Tách DNA tổng số	47
3.2.2. Xác định các loài nấm bằng giải trình tự ITS	48

3.2.3.	Cây phát sinh chủng loại.....	51
3.2.4.	Xác định sơ bộ các chủng nấm phân lập được có khả năng sinh hoạt chất chống ung thư.....	59
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....		61
KẾT LUẬN.....		61
KIẾN NGHỊ.....		61
DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ.....		62
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....		63

Danh mục các ký hiệu, chữ cái viết tắt

Ký hiệu, từ viết tắt	Ý nghĩa
<i>C. colombiae</i>	<i>Cladosporium colombiae</i>
<i>C. endophytica</i>	<i>Cladosporium endophytica</i>
<i>C. halotolerans</i>	<i>Cladosporium halotolerans</i>
<i>C. pseudochalastosporoides</i>	<i>Cladosporium pseudochalastosporoides</i>
<i>C. roseus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>
GC-MS	Gas Chromatography Mass Spectrometry Sắc ký khí khối phổ
ITS	Internal Transcribed Spacer
LB	Luria Bertani
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDA	Potato Dextrose Agar
PDB	Potato Dextrose Broth
v/v	Volume/volume – thể tích/thể tích
VSV	Vi sinh vật
w/v	Weight/volume – khối lượng/thể tích

Danh mục các bảng

Ký hiệu bảng	Tên bảng	Trang
Bảng 2.1	Thành phần của dung dịch đệm rửa	23
Bảng 2.2	Thành phần của dung dịch đệm tách	24
Bảng 2.3	Danh sách trình tự các môi sử dụng trong nghiên cứu	24
Bảng 2.4	Thành phần của phản ứng PCR/tổng thể tích mẫu	27
Bảng 2.5	Chu kì phản ứng PCR	28
Bảng 3.1	Danh sách mẫu cây dược liệu thu thập được	35
Bảng 3.2	Nồng độ và độ tinh sạch các mẫu dược liệu nghiên cứu	37
Bảng 3.3	Xác định loài cây dược liệu thu thập được	44
Bảng 3.4	Đặc điểm hình thái của 5 loài nấm nội sinh	46
Bảng 3.5	Xác định các loài nấm dược phân lập từ cây Dừa cạn và Bạch hoa xà thiệt thảo	57

Danh mục các hình vẽ

Ký hiệu hình	Tên hình	Trang
Hình 1.1	Hình ảnh cây Dừa cạn	4
Hình 1.2	Hình ảnh cây Bạch hoa xà thiệt thảo	6
Hình 1.3	Công thức cấu tạo của vinblastine và vincristine	14
Hình 2.1	Các bước của quy trình nghiên cứu	25
Hình 2.2	Sơ đồ quá trình Tách chiết DNA tổng số bằng phương pháp CTAB cải tiến	26
Hình 2.3	Quy trình chọn lọc và bảo quản nấm nội sinh trên môi trường PDA	30
Hình 3.1	Vị trí địa lý các địa phương đã tiến hành thu thập mẫu dược liệu	34
Hình 3.2	Hình ảnh mẫu cây dược liệu thu thập được	35
Hình 3.3	Kết quả điện di DNA tổng số các mẫu dược liệu nghiên cứu	36
Hình 3.4	Kết quả so sánh với cặp môi ITS với các trình tự trên ngân hàng Genbank	38
Hình 3.5	Kết quả so sánh với cặp môi trnL với các trình tự trên ngân hàng Genbank	39
Hình 3.6	Kết quả so sánh với cặp môi Rbcl với các trình tự trên ngân hàng Genbank	41
Hình 3.7	Kết quả so sánh với cặp môi trnL với các trình tự trên ngân hàng Genbank	42
Hình 3.8	Kết quả so sánh với cặp môi ITS với các trình tự trên ngân hàng Genbank	43
Hình 3.9	Hình thái của nấm nội sinh được phân lập từ cây Dừa cạn và cây Bạch hoa xà thiệt thảo	45
Hình 3.10	DNA tổng số và sản phẩm PCR khuếch đại vùng ITS của các chủng nấm nội sinh trong cây Dừa cạn và cây Bạch hoa xà thiệt thảo	48

Hình 3.11	Kết quả so sánh với các trình tự trên ngân hàng Genbank (chủng DP1)	52
Hình 3.12	Kết quả so sánh với các trình tự trên ngân hàng Genbank (chủng PD2)	53
Hình 3.13	Kết quả so sánh với các trình tự trên ngân hàng Genbank (chủng HP-L1)	54
Hình 3.14	Kết quả so sánh với các trình tự trên ngân hàng Genbank (chủng PT-T12)	55
Hình 3.15	Kết quả so sánh với các trình tự trên ngân hàng Genbank (chủng BR2)	56
Hình 3.16	Cây phát sinh loài của các chủng nấm nội sinh phân lập được và <i>Cladosporium</i>	58
Hình 3.17	Sắc ký bản mỏng TLC các alkaloid dịch chiết từ các chủng nấm nội sinh đã phân lập được	60

MỞ ĐẦU

Cây dược liệu đã được sử dụng trong hàng nghìn năm nay như các loại thuốc dân gian rất hiệu quả và có tương đối ít hoặc không có tác dụng phụ. Nghiên cứu thành phần của các cây dược liệu, các nhà nghiên cứu đã xác định được rất nhiều các chất có hoạt tính sinh học quý trong việc chữa bệnh. Việc sử dụng các chất có hoạt tính trong chữa bệnh đã được minh chứng rất rõ ràng. Tuy nhiên, khi đã trở thành thuốc thì việc đảm bảo đủ nguyên liệu từ tự nhiên, cây trồng hoặc tổng hợp toàn phần là một bài toán khó giải cho các nhà nghiên cứu dược học và các công ty dược phẩm.

Trở ngại này là do nguồn tài nguyên thiên nhiên của cây dược liệu đang dần cạn kiệt và bởi mức độ thấp mà các sản phẩm này tích lũy trong cây thuốc. Vì vậy, hướng tiếp cận hiện nay được các nhà nghiên cứu quan tâm là nghiên cứu các gen liên quan đến các quá trình trao đổi chất trên con đường tổng hợp các hợp chất có hoạt tính làm thuốc cũng như các phương pháp để tăng cường sản xuất các hợp chất có hoạt tính.

Bên cạnh đó, các nghiên cứu gần đây cho thấy các loại nấm nội sinh trên thực vật có vai trò quan trọng trong việc sản sinh các hợp chất này. Các phát hiện cho thấy nấm nội sinh liên quan đến cây thuốc có thể sản xuất các hợp chất cùng loại với thực vật và các sản phẩm tự nhiên khác bằng cách lên men. Hơn thế nữa, các chủng nấm nội sinh có thể sản xuất một lượng lớn các hợp chất này do đó có thể đáp ứng nhu cầu thực tế.

Các kết quả nghiên cứu trên đây cho thấy có rất nhiều chủng vi nấm nội sinh thuộc các chi khác nhau có khả năng sản sinh ra các hợp chất có hoạt tính tương tự như thực vật đã được phân lập mới. Vì thế, việc nghiên cứu các hợp chất có hoạt tính từ các cây thuốc và nghiên cứu phân lập các vi nấm có khả năng sinh tổng hợp các hợp chất này từ các cây thuốc là hướng nghiên cứu cấp thiết và có nhiều triển vọng.

Một hướng nghiên cứu gần đây đã và đang được nhiều quốc gia quan tâm và thực hiện đó là việc ứng dụng công nghệ sinh học (nghiên cứu các gen tham gia vào con đường sinh tổng hợp các chất có hoạt tính, sử dụng kỹ thuật di truyền và sử dụng các phương pháp lên men nhằm nâng cao khả năng sinh

tổng hợp của các chủng vi nấm...) trong việc tạo nguồn nguyên liệu cho việc sản xuất công nghiệp các chế phẩm sinh học, các loại thuốc... từ vi nấm nội sinh trên các loài cây dược liệu, đây là hướng nghiên cứu cấp thiết và có ứng dụng thực tiễn hiện nay.

Vì vậy để phục vụ cho việc nghiên cứu ứng dụng vi sinh vật nội sinh trên cây dược liệu có khả năng tham gia vào con đường sinh tổng hợp các chất có hoạt tính, chúng tôi đã tiến hành đề tài: "*Nghiên cứu phát hiện vi nấm nội sinh từ một số cây dược liệu Việt Nam*". Với phạm vi giới hạn nghiên cứu, đối tượng nghiên cứu của đề tài là cây Dừa cạn và cây Bạch hoa xà thiệt thảo.

- **Mục đích nghiên cứu:**

Thu thập, định danh mẫu cây Dừa cạn và cây Bạch hoa xà thiệt thảo, đồng thời phân lập và định danh được một số chủng vi nấm nội sinh có khả năng sinh các hợp chất có hoạt tính sinh học từ 2 đối tượng cây dược liệu nghiên cứu.

- **Nội dung nghiên cứu:**

Thu thập và định danh các mẫu cây Dừa cạn và cây Bạch hoa xà thiệt thảo tại các địa điểm Đan Phượng, Phú Diễn (Hà Nội) và Việt Hà (Hải Dương).

Phân lập và định danh các chủng vi nấm nội sinh từ các mẫu cây Dừa cạn và Bạch hoa xà thiệt thảo thu thập được.

Xác định sơ bộ các chủng vi nấm nội sinh có khả năng sinh các hợp chất có hoạt tính sinh học bằng phương pháp sắc kí lớp mỏng TLC.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

Vi sinh vật nội sinh sống trong các mô khỏe mạnh của thực vật trong ít nhất một phần vòng đời của chúng mà không gây ra bất kỳ triệu chứng bệnh rõ ràng nào trên vật chủ của chúng [1]. Những vi sinh vật nội sinh này cũng được công nhận là nguồn sản sinh phong phú các chất chuyển hóa thứ cấp có tầm quan trọng như các hợp chất có hoạt tính chống ung thư, kháng khuẩn và chống viêm khớp mạnh mẽ [2]. Nấm nội sinh liên quan đến cây thuốc có thể sản xuất các hợp chất giống hoặc tương tự như các hợp chất có nguồn gốc từ cây thuốc [3]. Tuy nhiên, việc phân lập và nghiên cứu các điều kiện nuôi cấy nhằm tìm kiếm các chủng nấm nội sinh và nâng cao khả năng sinh tổng hợp các hợp chất có hoạt tính còn chưa nhiều.

Có nhiều loại nấm nội sinh trong cây dứa cạn được phân lập có khả năng sinh các vincristine và vinblastine như nấm nội sinh *Talaromyces radicus*, *Fusarium oxysporum* và *Alternaria* sp. Các kết quả nghiên cứu trên cho thấy có rất nhiều chủng vi nấm nội sinh thuộc các chi khác nhau có khả năng sản sinh ra các hợp chất có hoạt tính tương tự như thực vật. Mặc dù có nhiều hoạt chất có hoạt tính dược học như chống ung thư, kháng khuẩn, kháng virus chống viêm và tăng cường miễn dịch [3].

Các nghiên cứu gần đây cho thấy các loại nấm nội sinh trên thực vật có vai trò quan trọng trong việc sản sinh các hợp chất này. Các phát hiện cho thấy nấm nội sinh liên quan đến cây thuốc có thể sản xuất các hợp chất cùng loại với thực vật và các sản phẩm tự nhiên khác bằng cách lên men. Hơn thế nữa, các chủng nấm nội sinh có thể sản xuất một lượng lớn các hợp chất này do đó có thể đáp ứng nhu cầu thực tế [4].

1.1. TỔNG QUAN VỀ CÂY DƯỢC LIỆU VIỆT NAM

1.1.1. Cây dược liệu Việt Nam

Cây dược liệu là những loại cây được sử dụng như những nguyên liệu với nhiều tác dụng phòng bệnh, chữa bệnh... Các loài thực vật đã được phát hiện, nghiên cứu sâu đến khi đạt tiêu chuẩn để sử dụng trong phòng bệnh hay chữa bệnh, đó là các cây dược liệu, hay dân gian còn gọi là cây thảo dược.

Việt Nam ta là đất nước nguồn tài nguyên thiên nhiên vô cùng phong phú và đa dạng, đặc biệt phải kể đến là cây dược liệu có dược lực cao rất phong phú và vô cùng đa dạng, đồng thời với đó các cây dược liệu này cũng mang tới giá trị kinh tế cao.

Cây dược liệu từ xưa đã và đang được các bà con vùng cao sử dụng như những bài thuốc cổ truyền – dân gian để chăm sóc sức khỏe, phòng và điều trị bệnh.

Các cây dược liệu ở Việt Nam có giá trị cao phải kể đến như sâm Ngọc Linh, hà thủ ô, tam thất, ráy gai, hoàng liên chân gà, ba kích, trinh nữ hoàng cung, đảng sâm... Với sự đa dạng đó Việt Nam là một trong những quốc gia có tiềm năng về nguồn tài nguyên dược liệu.

1.1.2. Giới thiệu chung về cây Dừa cạn

Tên khoa học là *Catharanthus roseus* (L.) G. Don; *Vinca rosea* L; *Lochnera rosea* Reich.

Thuộc họ Trúc đào *Apocynaceae*.

Tên thường dùng: Dừa cạn, hay còn gọi là Trường xuân, Hoa hải đăng, Bông dừa, Dương giác, Pervenche de Madagascar.



Hình 1.1. Hình ảnh cây dừa cạn (*Catharanthus roseus*) “Nguồn Internet”

Dừa cạn là một loại cây thuốc nam quý (Hình 1.1). Đặc điểm của Dừa cạn là nhỏ cao khoảng 0.4m đến 0.8m, với bộ rễ khá phát triển, ở phía gốc cây là thân gỗ, còn phần phía trên mềm. Dừa cạn thường mọc thành bụi có mật độ dày, có cành đứng. Lá của Dừa cạn thường mọc đối, lá thuôn dài, đầu lá hơi nhọn, phía cuống lá thường hẹp nhọn, dài khoảng từ 3cm đến 8cm, rộng

khoảng từ 1cm đến 2.5cm. Hoa của Dừa cạn thường có màu trắng hoặc màu hồng, có mùi thơm, mọc riêng lẻ ở phía trên các kẽ lá. Quả của Dừa cạn thường dài khoảng từ 2cm đến 4cm, quả rộng khoảng từ 2mm đến 3mm, quả thường mọc thẳng đứng, có hơi ngả sang hai bên, trên vỏ quả có vạch dọc, hơi tù, chứa khoảng từ 12 cho đến 20 hạt nhỏ màu nâu nhạt, hạt có hình trứng. Dừa cạn thường có hoa và quả gần như quanh năm.

Ở Việt Nam, nơi nào cũng đều trồng được Dừa cạn, tuy nhiên Dừa cạn thường được tìm thấy nhiều tại các tỉnh gần biển. Trước đây Dừa cạn thường chỉ được trồng làm cảnh nhưng gần đây Dừa cạn đã được trồng để thu hoạch phục vụ cho công tác chế biến thuốc trong điều trị trị cao huyết áp, tiểu đường, sốt rét, bệnh máu trắng, thông tiểu.

Các hoạt chất có trong Dừa cạn còn phụ thuộc vào địa điểm trồng và thời điểm thu hái. Ví dụ như giống Dừa cạn được trồng ở Việt Nam được đánh giá là thảo dược tốt tương đương Dừa cạn ở Madagascar.

Dừa cạn có hoạt chất alkaloid với nhân indol được tìm thấy trong tất cả các bộ phận của cây, đặc biệt được phát hiện nhiều nhất trong rễ và lá. Dừa cạn được trồng và thu hái Việt Nam có tỷ lệ alkaloid toàn phần là khoảng từ 0.1% đến 0.2%. Trong rễ lại chứa nhiều hoạt chất nhất khoảng từ 0.7 đến 2.4%, nhiều hơn hoạt chất được chiết suất từ thân khoảng 0.46% và chiết suất từ lá được khoảng 0.37-1.15%. Các hoạt chất được chiết xuất chủ yếu gồm có: vinblastin, vincristin tetrahydroalstonin, prinin, vindolin, catharanthin, vindolinin, ajmalicin, vincosid...

Ngoài ra, người ta còn chiết xuất được từ cây Dừa cạn các chất như acid pyrocatechic, flavonoid anthocyanic, acid ursoloc và cholin [5].

1.1.3. Giới thiệu chung về cây Bạch hoa xà thiệt thảo

Tên khoa học là *Hedyotis diffusa* Willd. hay *Oldenlandia diffusa* Roxb.

Thuộc họ Cà phê *Rubiaceae*

Tên thường dùng là Bạch hoa xà thiệt thảo hay thường được biết đến với các tên khác Giáp mãnh thảo, Xà thiệt thảo, Xà châm thảo, Long thiệt thảo, Lữ đồng, Nhị điệp lục, Cỏ rươi rấn hoa trắng, Bồi ngòi bò....



Hình 1.2. Hình ảnh cây Bạch hoa xà thiệt thảo “Nguồn Internet”

Bạch hoa xà thiệt thảo là loài cây thảo mọc bò, dài khoảng 20-25 cm. Thân vuông màu nâu nhạt, cành lá sum suê (Hình 1.2). Lá mọc ở đốt, hình mác thuôn, dài khoảng từ 1cm đến 3.5 cm, rộng khoảng từ 1cm đến 3 cm, có đầu và góc nhọn, có mặt trên hơi nhám hoặc mặt nhẵn, mặt dưới với màu xám nhạt, có gân giữa nổi rõ. Hoa của chúng thường có màu trắng, ít khi có màu hồng, hoa có cuống, hoa mọc theo đôi ở kẽ lá hoặc đơn độc. Quả khô, đầu bằng, bao bọc bởi những lá đài tồn tại, hạt có nhiều cạnh. Mùa hoa quả gần như quanh năm [6].

Cây Bạch hoa xà thiệt thảo thường rất dễ bị nhầm lẫn với cây trong cùng họ như cây lưỡi răn, cây xương cá, cây an điền [6].

Nhiều nghiên cứu đã phân lập được nhiều thành phần hóa học quan trọng của Bạch hoa xà thiệt thảo khi áp dụng các công nghệ phân tích tiên bộ như phương pháp khối phổ (Mass spectrometer - MS), phương pháp sắc ký lỏng khối phổ (Liquid chromatograph-mass spectrometer LC-MS). Tổng hợp cho đến nay, các nhà khoa học đã tìm ra khoảng 171 hợp chất được tìm thấy trong bạch hoa xà thiệt thảo trong đó gồm có các iridoid, triterpene, flavonoid, anthraquinone, phenolic acid và dẫn xuất, sterol, alkaloid, dầu dễ bay hơi, polysaccharide, cyclotide và coumarin [4].

Theo Đông y thì cây Bạch hoa xà thiệt thảo có vị ngọt đắng, có tính hàn, có tác dụng thanh nhiệt, giải độc, lợi tiểu, tiêu thũng, tán kết, chống u... Bạch hoa xà thiệt thảo thường được sử dụng để hỗ trợ chữa các bệnh viêm như viêm họng, viêm đường tiết niệu, viêm gan, sỏi mật, phù thũng... [7].

Ngay như nước lã giềng Trung Quốc, Bạch hoa xà thiệt thảo được sử dụng như là vị thuốc chống viêm, điều trị phế nhiệt, chống hen suyễn, viêm

họng, viêm amidan, chữa viêm đường tiết niệu... Dùng ngoài để chữa vết thương, rắn cắn, côn trùng đốt, đau lưng, đau khớp. Ngoài ra, nó còn được dùng điều trị hỗ trợ trong ung thư dạ dày, trực tràng, ung thư gan thời kỳ đầu [6].

Ở Ấn Độ, Bạch hoa xà thiết thảo được dùng làm thuốc chữa bệnh gan mật, vàng da, sốt, lậu, máu xấu [6].

1.2. TỔNG QUAN VỀ VI SINH VẬT

1.2.1. Khái niệm chung

Vi sinh vật trong tiếng Hy Lạp là mikros có nghĩa là nhỏ, bios có nghĩa là cuộc sống, còn logos có nghĩa là học thuyết. Vì vậy vi sinh vật được coi như là một phần của ngành khoa học sinh học chuyên nghiên cứu về hình thái, sinh hoá và sinh lý, cũng như các đặc điểm tính chất có lợi cũng như có hại của vi sinh vật để áp dụng các đặc điểm đó vào trong các hoạt động thực tiễn của con người một cách hiệu quả.

Vi sinh vật là các sinh vật đơn bào hoặc đa bào, nhân sơ hoặc nhân thực, có kích thước rất nhỏ và thường chỉ quan sát được qua kính hiển vi. Vi sinh vật bao gồm cả vi khuẩn, virus, nấm, tảo và nguyên sinh động vật.

Vi sinh vật thường có các đặc điểm như:

- Kích thước của vi sinh vật thường rất nhỏ bé, đơn vị thường dùng để đo kích thước của vi sinh vật là micromet.
- Vi sinh vật thường có quá trình hấp thu chất dinh dưỡng nhiều và quá trình chuyển hóa chất dinh dưỡng rất nhanh.
- Vi sinh vật có quá trình sinh trưởng và phát triển nhanh và mạnh hơn nhiều so với các sinh vật khác.
- Vi sinh vật thường có khả năng thích ứng mạnh, dễ phát sinh các thay đổi để phù hợp với điều kiện môi trường thay đổi.
- Vi sinh vật có rất nhiều chủng loại với số lượng và chủng loại vi sinh vật có thể biến đổi nhanh theo thời gian. Các nhà khoa học đã tìm thấy khoảng hơn 100.000 loài vi sinh vật khác nhau, gồm có hơn 69.000 loài nấm, hơn 30.000 loài động vật nguyên sinh, hơn 1.200 loài vi tảo, hơn

2.500 loài vi khuẩn lam, hơn 1.500 loài vi khuẩn, hơn 1.200 loài virus và Rickettsia. Tuy nhiên do vi sinh vật dễ phát sinh đột biến nên số lượng các loài vi sinh vật được tìm thấy được sẽ ngày càng tăng.

- Vi sinh vật sinh sống ở các môi trường rất đa dạng như môi trường nước, môi trường đất - mặt đất, môi trường không khí và trên cơ thể của động vật, thực vật hay cơ thể người.
- Vi sinh vật được phân bố rộng khắp mọi nơi, ngay cả những nơi có điều kiện môi trường khắc nghiệt như môi trường cực nóng của miệng núi lửa, môi trường cực lạnh của Nam cực, hay những nơi tối tăm, áp suất cao như đáy đại dương... Tuy nhiên, vi sinh vật được tìm thấy trong đất vẫn nhiều nhất, hình thành nên hệ sinh thái đất. Hệ sinh thái đất là một thể thống nhất gồm có các nhóm vi sinh vật sống trong đất, chúng thường có quan hệ tương hỗ lẫn nhau và dưới tác động của môi trường sống, chúng có sự trao đổi vật chất và năng lượng với nhau. Trong hệ sinh thái đất các vi sinh vật thường là các nhóm có đặc tính hình thái, sinh lý và sinh hoá rất khác nhau [8].

1.2.2. Môi quan hệ của vi sinh vật

Quan hệ cộng sinh là quan hệ mà hai bên cùng có lợi, phụ thuộc lẫn nhau chúng không thể sống thiếu nhau, bên này không thể sống thiếu bên kia và ngược lại.

Quan hệ ký sinh là quan hệ mà vi sinh vật này sống trên vi sinh vật khác gọi là vật chủ, chúng hoàn toàn ăn bám và gây hại cho vật chủ.

Quan hệ hỗ sinh là quan hệ giữa hai bên cùng có lợi tuy nhiên khi thiếu một bên chúng vẫn tồn tại và phát triển được không nhất thiết phải có nhau mới sống được.

Quan hệ đối kháng là mối quan hệ giữa hai nhóm vi sinh vật đối kháng lẫn nhau, một bên tồn tại là đối thủ của bên kia và ngược lại [8].

1.2.3. Mối quan hệ giữa vi sinh vật và thực vật:

Vi sinh vật có những tác động tích cực và tiêu cực đến cây trồng. Một mặt nó cung cấp cho cây trồng chất dinh dưỡng, các chất kích thích sinh

trưởng và các vitamin. Mặt khác, nó cũng gây một số bệnh hại cây trồng. Do vậy, cần điều chỉnh để các vi sinh vật có ích được phát triển tốt và cũng tăng cường các vi sinh vật đối kháng với vi sinh vật có khả năng gây bệnh cho cây trồng [8].

1.2.4. Vai trò của vi sinh vật đất đối với thực vật

Vi sinh vật sống trong đất tham gia tích cực vào quá trình phân giải rác hữu cơ, biến chúng thành CO₂ và các hợp chất vô cơ dùng làm thức ăn cho cây trồng (N, P, K, S, Ca...).

Mặt khác, vi sinh vật sống trong đất còn tham gia tích cực vào quá trình hình thành chất mùn. Trong đất, chất mùn là kho dự trữ thức ăn cho cây trồng và là yếu tố kết dính để tạo cấu tạo của đất. Đất có cấu tạo là đất có đủ điều kiện thích hợp về độ ẩm, về không khí, về chất hữu cơ đối với cây trồng [8]. Do vậy, vi sinh vật có vai trò rất quan trọng với cây trồng.

Sự đa dạng về chủng loại của vi sinh vật trong đất cũng đồng thời với sự đa dạng về chức năng của chúng trong đất. Theo nhiều tác giả [9, 10, 11], vi sinh vật đất có một số chức năng như sau:

- Cố định Nitơ phân tử.
- Chuyển hoá các hợp chất photphat khó tan thành dễ tan giúp cây trồng hấp thụ được.
- Phân huỷ phế thải và cặn bã chất hữu cơ.
- Tham gia các chu trình chuyển hoá vật chất, làm tăng khả năng dinh dưỡng cho cây.

1.2.5. Vi sinh vật nội sinh

1.2.5.1. Khái niệm vi sinh vật nội sinh

Vi sinh vật nội sinh là những vi sinh vật liên kết với thực vật, sống trong các mô sống của cây chủ mà không gây ra bất kỳ tác hại nào cho cây chủ theo các nghiên cứu của Ahmed và cộng sự năm 2012 cũng như nghiên cứu của Hallmann và cộng sự năm 1997. Các vi sinh vật nội sinh phổ biến bao gồm các loài nấm, vi khuẩn và xạ khuẩn, chúng có thể được phân lập từ các cây trồng nông nghiệp hay cây cỏ hoang dại, từ cả cây một lá mầm và cây

hai lá mầm. Những vi sinh vật nội sinh này cũng được công nhận là nguồn sản sinh phong phú các chất chuyển hóa thứ cấp có tầm quan trọng như các hợp chất có hoạt tính chống ung thư, kháng khuẩn và chống viêm khớp mạnh mẽ [2]. Qua nghiên cứu của Jia và cộng sự được công bố năm 2016 chỉ ra rằng nấm nội sinh liên quan đến cây thuốc có thể sản xuất các hợp chất giống hoặc tương tự như các hợp chất có nguồn gốc từ cây thuốc. Ví dụ, các chủng nấm *Alternaria* sp. phân lập từ cây hoàng bá có thể sản sinh berberine; các chủng nấm *Fusarium solani* từ cây hạnh phúc và cây sài long có thể sinh ra chất camtothecin; và rất nhiều loài nấm nội sinh phân lập từ cây thông có thể sản sinh ra chất paclitaxel. Tuy nhiên, việc phân lập và nghiên cứu các điều kiện nuôi cấy nhằm tìm kiếm các chủng nấm nội sinh và nâng cao khả năng sinh tổng hợp các hợp chất có hoạt tính còn chưa nhiều [12].

Vi sinh vật nội sinh phân bố và khu trú ở tất cả các loại cây trồng và đã được phân lập từ hầu hết tất cả cây trồng đã được kiểm tra đến nay. Vùng rễ là nơi xuất phát nhiều vi khuẩn nội sinh chui vào rễ, thân, lá để sống nội sinh; sau khi xâm nhập vào cây chủ có thể tập trung tại vị trí xâm nhập hoặc di chuyển đi khắp nơi trong cây đến các hệ mạch của rễ, thân, lá, hoa thúc đẩy các quá trình chuyển hóa trong cây, sự phát triển lông rễ một cách mạnh mẽ và giảm sự kéo dài rễ [13].

Bên cạnh đó, vi sinh vật nội sinh có khả năng kiểm soát sinh học với các loại nấm, vi khuẩn và tuyến trùng gây bệnh trên thực vật. Do đó, khi cư trú trong mô thực vật, vi sinh vật nội sinh đem lại cho cây trồng nhiều điều kiện thuận lợi giúp cây trồng phát triển tốt [12].

Vai trò và ứng dụng của vi sinh vật nội sinh:

- Sản xuất ra chất kích thích sinh trưởng (Phytostimulate)
- Sản xuất ra chất tạo màu (Pig-ment Product)
- Sản xuất ra enzym (Enzym Product)
- Sản xuất ra chất kháng khuẩn (Antimicrobi activity)
- Sản xuất ra chất có hoạt tính sinh học và các hợp chất khác (Source - Bio-active and Novel-Compound)

- Giúp mối liên hệ giữa vi sinh vật trên và dưới đất (Reciprocal-Interact Community)
- Ứng dụng trong phòng chống tác nhân sinh học (Bio-control-Agent)
- Ứng dụng vào trong chu trình tuần hoàn dinh dưỡng (Nutrient-Cycle)
- Ứng dụng vào việc cải tạo môi trường (Bioremediate/Bio-degrade)
- Ứng dụng vào sản xuất các hợp chất hữu cơ bay hơi (Product- Organic-Compound) [12].

1.2.5.2. Nấm nội sinh

Khái niệm nấm nội sinh

Nấm nội sinh (Endophyte-fungal, Endophytic-fungi) là những vi sinh vật được phát hiện ở trong các mô thực vật, chúng không gây tác động bất lợi đến cây [14]. Nấm nội sinh có khả năng tổng hợp nhiều enzyme, hormone tăng trưởng thực vật và các dược chất tương tự như trên cây chủ của chúng. Nấm nội sinh cũng có thể góp phần vào việc tăng trưởng của cây thông qua các con đường khác nhau như tiết ra phyto hormones [15], tiết ra hợp chất siderophores [16], tác dụng cố định đạm [17], hoặc qua con đường phytoremediation [18]. Nấm nội sinh có thể được chuyển sang các thế hệ kế tiếp qua các mô, hạt cây giống hoặc mầm cây của cây chủ [19]. Nhiều công trình đã cho thấy các sản phẩm từ thiên nhiên thu được từ các vi khuẩn endophytic có khả năng kháng khuẩn, kháng ung thư, giảm thiểu oxy hóa, kháng tiểu đường, gây ức chế hệ thống miễn dịch, kháng huyết khối, kháng viêm và kháng lại bệnh Alzheimer và một số bệnh khác [20].

Mối quan hệ cộng sinh hoặc tương sinh giữa nấm nội sinh và cây trồng. Trong suốt quá trình phát triển, các vi sinh vật và thực vật tương tác với nhau dẫn đến chúng xuất hiện hiện tượng đột biến gene, từ đó chúng tạo nên những chủng nấm nội sinh mới có ích. Đây được xem như là một tác nhân chính giúp cho việc cân bằng hệ sinh vật trên thực vật, giúp cho thực vật chủ có thể ngăn chặn được các yếu tố vi sinh vật có hại [14, 21].

Các chủng nấm nội sinh giúp quá trình thích nghi đối với hệ sinh thái của cây chủ được tăng cao. Trên một số loài thực vật có các chủng nấm nội,

chúng có thể chịu đựng được hạn hán hoặc chịu được các tác nhân gây hại như kim loại nặng trong môi trường sống của chúng [22].

Có nhiều chủng vi nấm nội sinh sống trên cây Dừa cạn có khả năng sinh tổng hợp các hợp chất như vincristine và vinblastine như nấm nội sinh *Talaromyces radicus*, *Fusarium oxysporum* và *Alternaria* sp. Các kết quả nghiên cứu trên cho thấy có rất nhiều chủng vi nấm nội sinh thuộc các chi khác nhau có thể sản sinh ra các chất có hoạt tính tương tự như thực vật. Mặc dù theo nghiên cứu của Chel và cộng sự được công bố năm 2020 có nhiều hoạt chất có hoạt tính dược học như chống ung thư, kháng khuẩn, kháng virus chống viêm và tăng cường miễn dịch nhưng cho đến nay chưa có các chứng minh nào về việc phân lập các chủng nấm nội sinh từ các cây Bạch hoa xà thiệt thảo.

Các chủng vi nấm *Cladosporium cladosporioides* được tìm thấy từ trên cây thông có thể sinh tổng hợp được lượng paclitaxel lên đến 800 $\mu\text{g/l}$ và phân lập từ cây xà túc thạch sam có thể sản sinh 56,84 $\mu\text{g/l}$ huperzine A [23]. Chủng nấm nội sinh *Cladosporium* sp. phân lập từ cây đước có thể sản sinh ra các indole alkaloid [24].

Phân lập nấm nội sinh

Trên thế giới có khoảng 300 nghìn loài thực vật. Đó là một số lượng quá lớn mà ta không thể thử nghiệm hết cũng như không thể chọn lựa một cách ngẫu hứng khi đưa vào nghiên cứu. Do đó, việc chọn thực vật để phân lập nấm nội sinh cũng cần phải dựa trên những đối tượng cây có đặc điểm sinh học. Một số nguyên tắc cơ bản sau đây thường được áp dụng:

Với thực vật sống trong môi trường sinh học bất thường, môi trường bất thường và các điều kiện tự nhiên khắc nghiệt bắt buộc cây muốn tồn tại thì cần có yếu tố đặc biệt nào đó giúp cây có khả năng chống chịu cao. Và ta mong đợi nhân tố đó chính là các nấm nội sinh có ích. Ví dụ: *Rhyncholacis penicillata* là một loài cây sống dưới nước ở Tây Nam Venezuela, nơi mà môi trường nước rất khắc nghiệt, cây luôn bị va đập bởi tác dụng nước cuốn, mảnh vụn, đá sỏi... làm cho cây bị tổn thương. Từ đó các nấm gây bệnh thực vật có thể xâm nhập, nhưng cây vẫn khỏe mạnh, vì cây được sự bảo vệ bởi các nấm nội sinh có trong cây [25].

Một số loài thực vật dược liệu dân gian đã được sử dụng theo kinh nghiệm dân gian, từ đời này sang đời khác để chữa lành vết thương, kháng nấm, kháng khuẩn... ví dụ như, *Kennedia nigricans*, một loài cây leo ở Úc đã được dân gian sử dụng nhựa cây để trị vết thương, sát trùng. Từ cây này đã phân lập được chủng *Streptomyces* sp. NRRL 30562 sản xuất kháng sinh phổ rộng munumbicin, kháng được nấm gây bệnh thực vật, vi khuẩn và *Plasmodium* [26].

Các thực vật có tính đặc thù về sinh thái: tuổi thọ cao bất thường, phát triển trong các vùng có biến đổi sinh học lớn, hay sống trong khu vực đất đai cổ xưa... cũng là những đối tượng nghiên cứu rất lý tưởng để cung cấp các nấm nội sinh mới lạ.

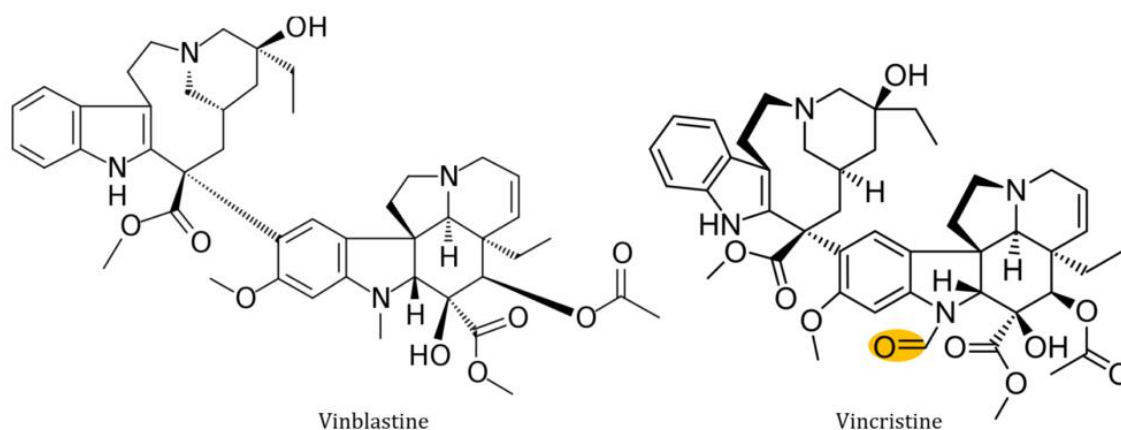
Nấm nội sinh có mặt ở khắp nơi trong thế giới thực vật, số lượng của chúng tìm thấy thay đổi tùy thuộc vào bộ phận cây, chủng loại cây và môi trường sống của nó. Đã có nhiều kỹ thuật phân lập nấm nội sinh được đề nghị bởi nhiều tác giả khác nhau. Nhưng tất cả các quy trình phân lập đều dựa trên cơ sở chung nhất đó là: giải quyết tốt giai đoạn xử lý bề mặt, diệt các sinh vật ngoại nhiễm bằng chất sát trùng hoặc các phương pháp sát trùng. Sau đó tạo điều kiện không nhiễm để chỉ thu nhận các nấm nội sinh phát triển từ nội mô thực vật. Tiếp theo chọn nuôi cấy trên môi trường thích hợp và thử hoạt tính sinh học [15, 25].

1.2.5.3. Vinblastin và vincristin có hoạt tính chống ung thư

Cây Dừa cạn đã được nghiên cứu một cách rộng rãi do chúng có chứa nhiều loại alkaloid terpenoid-indol, các alkaloid có nhiều tác dụng đối với con người và đã được sử dụng làm một số loại thuốc chữa bệnh như lợi tiểu, huyết áp, tiểu đường. Trong đó các loại alkaloid thì có 2 loại đặc biệt là vincristine và vinblastine, chúng có hoạt tính chống ung thư. Ngoài ra còn có ajmalicine và serpentine, là các hợp chất đơn phân, chúng được sử dụng trong điều trị bệnh tim mạch và giúp tuần hoàn máu [27].

Trong năm 1958, các nhà nghiên cứu của Canada đã tinh chiết được một alkaloid hoạt tính mạnh dưới dạng tinh thể, chúng được đặt tên là vincalukoblastine, sau này được gọi là vinblastine.

Sau đó, các nhà phát triển tại công ty dược phẩm Eli-Lilly đã phát hiện ra một hoạt tính có lợi của các alkaloid gây bệnh ung thư máu Leukemia P1534 trên chuột từ Dừa cạn. Một số alkaloid mang cấu trúc tương tự như vinblastine có hoạt tính đã được phân lập và thử nghiệm bởi Gordon Svoboda được gọi là vincristine như leurosine, leurosidine và leurocristine. Vào các năm 1960 các thử nghiệm lâm sàng trên người với vinblastine được công bố rộng rãi, sau đó các nghiên cứu với vincristine và leurosine cũng đã được công bố vào năm 1962 và 1963.



Hình 1.3. Công thức cấu tạo của vinblastine và vincristine

Trong cấu trúc các alkaloid gây độc tế bào như vinblastine, vincristine, leurosidine và leurosine đều chứa hai indol. Vì vậy các alkaloid này còn được gọi là các bisindolic-alkaloid (Hình 1.3). Trong các nghiên cứu của Giáo sư Rene Paris và Helene Moyse vào đầu những năm 1950 về hóa thực vật của Dừa cạn: từ rễ cây Dừa cạn thu được dạng kết tinh của hợp chất alkaloid, được đặt tên là vinceine. Ngoài ra còn có những công bố khác về một số hợp chất alkaloid như ajmalicine, vincaine, vinceine và raubasine. Tuy nhiên trên thực tế các hợp chất này chỉ là một. Cũng trong những năm 1950 này, một số nhà khoa học tại Nhật Bản, Ấn Độ đã tách được thêm các hợp chất như yohimbine, serpentine và tetrahydroalstonine từ cây Dừa cạn. Ngoài ra còn có những hợp chất alkaloid không có hoạt tính gây độc tế bào tuy nhiên chúng chiếm hàm lượng lớn trong lá của cây Dừa cạn như catharanthine và vindoline [28].

Vào các năm 1965 và 1966, dựa trên kỹ thuật nhiễu xạ tinh thể tia X cấu hình hóa học của vinblastine và vincristine được xác định chính xác. Vào

các năm 1963 và 1965, FDA Hoa Kỳ đã chấp thuận sử dụng vincristine (1963) và vinblastine (1965), sau khi các nghiên cứu dược lý – lâm sàng đã được công bố xác thực. Do đó vào thời điểm đó, hợp chất vincristine được khuyến cáo sử dụng để điều trị bệnh bạch cầu Leukemia cấp tính ở trẻ em, vinblastine được sử dụng điều trị u lympho Hodgkin. Hiện nay, hợp chất vinblastine đã được mở rộng sử dụng trong việc chữa các bệnh như u lympho không Hodgkin, ung thư tinh hoàn, ung thư vú. Còn hợp chất vincristine được sử dụng trong việc chữa các bệnh về ung thư đường hô hấp (phế quản, phổi) [28].

1.3. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU CÁC CHỦNG NẤM NỘI SINH

1.3.1. Tổng quan tình hình nghiên cứu trên thế giới

Cho đến năm 1955, thế giới chỉ mới khám phá ra được khoảng 500 chất kháng sinh, tuy nhiên chỉ với 20 năm sau đó, thế giới đã nghiên cứu ra được hơn 5.000 chất có hoạt tính kháng khuẩn. Theo nghiên cứu của Berdy năm 1984 đã chỉ ra rằng trên thế giới tìm ra được hơn 13.000 hợp chất có khả năng kháng khuẩn, và chúng đều được tìm thấy trong tự nhiên... [1,29].

Trong các năm 1995 – 1996, các nhà nghiên cứu đã phân lập được hàng trăm loài nấm nội sinh từ cây thông đỏ có nguồn gốc ở Châu Âu, Châu Á và Bắc Mỹ. Các cây thông đỏ là một kho báu chứa nhiều vi sinh vật chưa từng được phát hiện và rất đáng chú ý, chúng tương tác với nhau và với cây chủ như những chủng nấm nội sinh sau có khả năng tổng hợp taxol: *Taxomyces andreanae*, *Pestalotiopsis microspora*. Ngoài ra các nhà khoa học cũng đã phát hiện được có sự tổng hợp taxol ở nhiều nấm nội sinh khác phân lập từ cây thông đỏ *Taxus brevifolia* thông qua các bằng chứng miễn dịch học, trong đó bao gồm nhiều chủng của *Penicillium* sp., *Pestalotiopsis* sp. và *Truncatella* sp. [1,29].

Trong các đề tài khoa học gần đây cho thấy các chủng vi nấm nội sinh trên thực vật có vai trò rất quan trọng trong việc sinh tổng hợp các hợp chất này. Các phát hiện cho thấy nấm nội sinh liên quan đến cây thuốc có thể sản xuất các hợp chất cùng loại với thực vật và các sản phẩm tự nhiên khác bằng cách lên men. Năm 2011 Malik và cộng sự đã công bố nghiên cứu các chủng nấm nội sinh có thể sản xuất một lượng lớn các hợp chất này do đó có thể đáp

ứng nhu cầu thực tế. Ví dụ để có được 1 kg taxol người ta chỉ cần sử dụng 15.000 kg vỏ cây *Taxus (Taxus brevifolia)* cho quá trình lên men của chủng vi nấm.

Năm 2003, Strobel và cộng sự đã nghiên cứu về chủng nấm nội sinh *Cryptosporiosis quercina* được phân lập từ cây *Tripterigeum wilfordii*, nấm này có thể sản xuất cryptocandin và cryptocin. Trong đó, cryptocandin kháng một số nấm gây bệnh cho người như *Candida albicans*, *Trichophyton* sp. và chống một số nấm gây bệnh thực vật như *Sclerotinia sclerotiorum* và *Botrytis cinerea*. Cryptocin có tác dụng kháng *Pryriaria oryzae* và một số nấm gây bệnh thực vật [25].

Năm 2003, Taechowisan và cộng sự đã nghiên cứu về endophyte có hoạt tính kháng nấm từ rễ cây Gừng *Zingiber officinale* và Riềng nếp *Alpinia galanga* [15].

Vào năm 2005, nhà khoa học Raviraja đã tìm ra được 18 chủng nấm nội sinh, các chủng nấm nội sinh này được phân lập từ các loài cây thuốc Ấn Độ: *Curvularia clavata*, *Curvularia lunata*, *Fusarium oxysporum*... [30].

Camptothecin được ghi nhận ở nấm nội cộng sinh ở cả 2 loại cây *Camptotheca acuminata* và *Nothapodytes foetida*. Camptothecin được Puri và cộng sự phân lập vào năm 2005 từ vi nấm *Entrophosphora infrequens* phân lập từ vỏ trong cây *Nothapodytes foetida*. Camptothecin được chiết xuất từ vi nấm *Neurospora crassa* phân lập từ hạt cây *Camptotheca acuminata*. Camptothecin và 2 dẫn xuất (9-methoxycamptothecin và 10-hydroxycamptothecin), được phân lập từ vi nấm *Fusarium solani*, một loại nấm nội sinh của *Camptotheca acuminata*, có khả năng chống ung thư [31].

Năm 2006, Eyberger và cộng sự đã phát hiện vi nấm *Trametes hirsuta* nội sinh ở mẫu rễ khô cây *Podophyllum hexandrum* thu thập ở Himalaya, Ấn Độ, và 2 chủng nấm *Phialocephala fortinii* từ rễ của *Podophyllum peltatum* đều có khả năng sinh podophyllotoxin [31].

Năm 2007, Li và cộng sự đã tìm ra nấm *Acremonium* từ *Huperzia serrate* có khả năng sản xuất huperzine A có tác dụng là chất ức chế enzyme acetylcholinesterase, và được dùng trong điều trị bệnh Alzheimer [32].

Năm 2012, Agnes Joseph Aswathy và cộng sự đã nghiên cứu về endophyte trong cây Nghệ (*Curcuma longa*). Các chất dinh dưỡng trong thân rễ của cây nghệ là môi trường sống đa dạng cho các nhóm vi khuẩn khác nhau. Một số vi khuẩn nội sinh liên quan có thể thúc đẩy tăng trưởng. Hai chủng endophyte *Paenibacillus* sp. được phân lập từ thân rễ củ nghệ và cả hai chủng đã được tìm thấy có khả năng để sản xuất Indole-3-acetic acid qua phân tích sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC - highperformance liquid chromatography) [33].

Cùng trong năm 2012 Cui và cộng sự đã phát hiện nấm nội sinh *Fusarium oxysporum* phân lập từ cây *Ginkgo biloba* có khả năng sản xuất ginkgolid B dùng để điều trị bệnh tim mạch [23].

Năm 2014, Lena Hammerschmidt và cộng sự của Viện Sinh dược và Công nghệ Sinh học, Đại học Heinrich-Heine, Duesseldorf, Cộng hòa Liên bang Đức phân lập và xác định cấu trúc các hợp chất từ các dịch chiết của nấm nội ký sinh *Acremonium strictum* Gams, phân lập từ cây Đước đôi (*Rhizophora apiculata* Blume) thu hái tại Việt Nam. Trong đó có 5 dẫn xuất polyketide mới 60-hydroxypestalotiopsone C (1), acropyrone (2), bicytosporone D (3), waol acid (4), và pestalotiopene C (5) và 7 hợp chất đã biết (6-12). Các hợp chất 6, 7 và 9 thể hiện hoạt tính gây độc tế bào ở mức độ trung bình đối với hai dòng tế bào ung thư ở người là ung thư biểu mô buồng trứng nhạy cảm với cisplatin (A2780) và dòng kháng cisplatin (A2780 CisR), trong khi chỉ có chất 9 biểu hiện hoạt tính kháng khuẩn đối với *Staphylococcus aureus* với giá trị MIC 14,3 μ M [34].

Năm 2015, trong nghiên cứu của Palem và cộng sự chỉ ra rằng nấm nội sinh *Talaromyces radicus* phân lập từ *Catharanthus roseus* có khả năng sản sinh ra vincristine và vinblastine [35]. Trước đó các nghiên cứu của Xianzhi và cộng sự năm 2004 cũng như Ashuthosh và cộng sự năm 2013, chỉ ra rằng Vincristine được sinh ra từ chủng vi nấm nội sinh *Fusarium oxysporum* và vinblastine thu nhận từ chủng vi nấm *Alternaria* sp. phân lập trên *Catharanthus roseus*. Cũng trong năm 2013 Kumar và cộng sự cũng đã phát hiện ra chủng nấm *Nigrospora sphaerica* phân lập từ *Catharanthus roseus* cũng có khả năng sản sinh các loại vinca alkaloid.

Nhiều nấm nội sinh trong cây đã được phân lập, chúng có khả năng sản sinh những chất biến dưỡng có hoạt tính sinh học như kháng khuẩn, kháng nấm, kiềm hãm khối u, chống oxy hóa và các hoạt tính sinh học khác. *Fusarium* sp. là nấm phân lập từ cây *Selaginella pallescens*, được thu nhập từ vùng Bảo vệ thực vật của Guanacaste của Costa Rica, sản xuất được một pentaketide mới là CR 377 cho tác dụng mạnh trên *Candida albicans* [36]. *Pestalotiopsis microspora* thường gặp ở rừng mưa nhiệt đới, sản xuất nhiều chất có tác dụng sinh học, một trong những chất này là axit ambuic có tác dụng kháng nấm. Ngoài ra, nhiều chủng nấm trong chi *Pestalotiopsis* đã được phân lập từ các nguồn thực vật khác, các chủng nấm này có thể sản xuất các kháng sinh kháng nấm. *Muscodor albus* là nấm được phân lập từ cành của cây Quế (*Cinnamomum zeylanicum*), nấm này sản xuất một số chất bay hơi có thể ức chế vi khuẩn và nấm. Thành phần chính của những hợp chất này đã được xác định cấu trúc hóa học bằng sắc ký khí ghép với khối phổ (GC-MS), từ đó được tổng hợp hóa học. Các chất tổng hợp được có hiệu quả kháng khuẩn, kháng nấm, không độc với người [37]. *Nodulisporium* sp. được phân lập từ cây *Bontia daphnoides* sản xuất hợp chất nodulisporic có hiệu lực trừ sâu, chống lại ấu trùng của ruồi xanh, nặng [38].

Các kết quả nghiên cứu trên đây cho thấy có rất nhiều chủng vi nấm nội sinh thuộc các chi khác nhau có khả năng sản sinh ra các hợp chất có hoạt tính tương tự như thực vật đã được phân lập mới. Vi nấm nội sinh rất phong phú và đã được tìm thấy ở hầu hết các loài thực vật [39]. Các vi nấm nội sinh đang đóng một vai trò quan trọng trong việc sản sinh ra nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học có giá trị trong điều trị nhiều bệnh khác nhau [40]. Nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học có giá trị với các đặc tính chống ung thư, kháng khuẩn và diệt côn trùng đã được chiết xuất thành công từ vi nấm nội sinh [41]. Nấm nội sinh có thể là phương pháp thay thế để phát hiện ra các loại thuốc mới cũng như các tác nhân hóa trị liệu thu được từ nấm nội sinh đã được kiểm tra và chúng cho thấy hiệu quả chống lại các loại ung thư khác nhau. Điều này cho thấy Vi nấm đang trở thành đối tượng cho các nghiên cứu nhằm sản xuất với lượng lớn các chất có hoạt tính đáp ứng cho nhu cầu sử dụng hiện nay [42].

Vì thế, việc nghiên cứu các hợp chất có hoạt tính từ các cây thuốc và nghiên cứu phân lập các vi nấm có khả năng sinh tổng hợp các hợp chất này từ các cây thuốc là hướng nghiên cứu cấp thiết và có nhiều triển vọng.

1.3.2. Tổng quan tình hình nghiên cứu trong nước

Ở Việt Nam cũng đã có các báo cáo nghiên cứu về vi sinh vật nội sinh có khả năng sinh tổng hợp các chất có hiệu quả kháng khuẩn hiệu quả.

Từ năm 1994, các nhà nghiên cứu trong nước đã phân lập được 6 chủng nấm nội sinh từ vỏ cây thông đỏ và đã xác định được tên của 6 chủng nấm này. Cây thông đỏ là loài thực vật đặc hữu có ở Việt Nam, từ lâu đã được nhân dân ta sử dụng như một vị thuốc và được đánh giá là loại dược liệu quý hiếm có tác dụng điều trị nhiều bệnh lý khác nhau. Chúng thường được phân bố ở các tỉnh phía Bắc như: Mai Châu, Hòa Bình, các tỉnh miền Trung như: Nghệ An, Hà Tĩnh, Phú Yên, Khánh Hòa, và chủ yếu là ở tỉnh Lâm Đồng. Trong tất cả các mẫu vỏ cây thông đỏ được lấy mẫu đều phát hiện chủng nấm *Pestalotiopsis maculans* (corda) NagRai. Chúng phù hợp nhất với hình thái chủng nấm *Pestalotiopsis* sp. được tìm thấy trong vỏ cây thông đỏ ở Mỹ và được các nhà khoa học tiến hành lên men, nuôi cấy, chiết rút, chạy sắc kí bản mỏng cùng với chất taxol chuẩn.

Năm 2005, Lê Mai Hương cùng các cộng sự thuộc phòng sinh học thực nghiệm - Viện Hóa học các Hợp chất Thiên nhiên đã tiến hành nhiệm vụ “Nghiên cứu khu hệ nấm nội ký sinh trong các cây Thông”. Nghiên cứu này tập trung chủ yếu vào 3 loài Thông là Thủy tùng *Glyptostrobus pensilis*, Thông đỏ Bắc *Taxus chinensis* và Thông đỏ lá dài *Taxus wallichiana*. Mục tiêu của việc nghiên cứu là cung cấp cơ sở khoa học cho chính quyền địa phương và ngành Lâm nghiệp về giá trị bảo tồn và sử dụng hợp lý nguồn tài nguyên quý hiếm, cũng như cho ngành Y học ứng dụng kết quả nghiên cứu để giảm thiểu và điều trị bệnh ung thư. Địa điểm triển khai khảo sát thực địa, thu thập mẫu của nhiệm vụ này ở tại một số tỉnh phía Bắc như Hà Giang, Cao Bằng, Lào Cai, Hòa Bình, Sơn La và một số tỉnh miền Trung như Lâm Đồng, Đắk Lắk. Sau chuyến thực địa, các nhà nghiên cứu đã thu thập được 118 mẫu tại các tỉnh khảo sát. Các mẫu này được kiểm định rồi đem nuôi cấy, lên men và tách chiết sơ bộ các chủng nấm phân lập để sàng lọc hoạt tính sinh học,

tách chiết hóa học theo định hướng hoạt tính một số chủng nấm tiêu biểu. Lê Mai Hương và cộng sự đã phân lập, sàng lọc hoạt tính kháng nấm, kháng khuẩn của 45 mẫu cây lấy ở vùng Yên Tử, Hà Nội và vườn thuốc Mê Linh thu được 89 chủng nấm nội sinh trong đó có 32 chủng có hoạt tính kháng sinh chiếm 36%; 20 chủng có hoạt tính kháng nấm và kháng khuẩn chiếm 22,5% tổng số, 26 chủng có hoạt tính kháng khuẩn chiếm 29,2 % tổng số, 27 chủng có hoạt tính kháng nấm chiếm 30,33% tổng số chủng phân lập. Từ 32 chủng có hoạt tính, bằng phương pháp lên men tách chiết sơ bộ đã chọn được 9 chủng có hoạt tính mạnh, hoạt phổ rộng, đặc biệt chủng có kí hiệu N2 có hoạt tính cao nhất, kháng *Bacillus subtilis* (ATCC25922) và *Fusarium oxysporum* [43].

Năm 2009, Trần Thị Như Hằng và cộng sự nghiên cứu về nấm nội sinh trên cây khồ sâm *Croton tonkinensis* Gapnep. và bùm bụp *Mallotus paella* Lour. thu được chủng nấm *Trichoderma konilangbra* KS14 sản sinh chất ergosterol, ergosterol peroxide, sorbicillin cho hoạt tính kháng vi sinh vật, độc tế bào, chống oxy hóa và hoạt tính enzym ngoại bào; sorbicillin cho hoạt tính kháng *Staphylococcus aureus* với MIC=25mg/ml. Chất ergosterol peroxid biểu hiện hoạt tính độc tế bào mạnh với cả 3 dòng tế bào thử là ung thư gan, ung thư màng tử cung và ung thư màng tim [44].

Năm 2009, tại Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam, Phạm Quang Thu và cộng sự cũng đã nghiên cứu vi sinh vật nội sinh và các hợp chất hóa học có hoạt tính kháng nấm gây bệnh ở các dòng Keo tai tượng tại Thừa Thiên Huế. Phân lập được 8 chủng vi khuẩn nội sinh và 13 chủng nấm nội sinh từ 35 dòng Keo tai tượng khảo nghiệm tại Thừa Thiên Huế, trong đó có 15 chủng gồm vi khuẩn và nấm nội sinh trên tổng số 21 chủng có hoạt tính ức chế nấm *Ceratocystis* sp. ở mức độ mạnh và rất mạnh và chỉ có 8 trên tổng số 21 chủng ức chế nấm *Corticium salmonicolor* ở mức độ mạnh và rất mạnh [45].

Năm 2010, Nguyễn Đình Nga và cộng sự sàng lọc các chủng nấm nội sinh thực vật trên cây ngũ sắc *Lanata camara* L. thu được chủng *Pseudeurotium* NS-T1 kháng *Candida albicans*, trên cây mã đề *Plantago major* L. thu được chủng *Fusarium* MĐ-TR1 và MĐ-TR3 cho hoạt tính kháng *C. albicans* và MRSA; tía tô *Perilla ocymoides* L. thu được chủng

Trichoderma TT-L1 kháng *Candida albicans* và MRSA; trầu *Piper betle* L. thu được chủng *Fusarium* TR-T1 kháng *Candida albicans*...[46].

Năm 2014, Đàm Sao Mai và cộng sự đã phát hiện ra môi trường nuôi cấy thích hợp cho nấm nội cộng sinh *Fusarium oxyporum* được phân lập trên Thông đỏ *Taxus wallichiana* tại vùng Lạc Dương, Lâm Đồng và lượng taxol sinh ra ở môi trường nuôi cấy là 250,98 mg/kg khối lượng khô [47].

Cũng trong năm 2016 đã có nhiều nghiên cứu về nấm nội sinh có khả năng sinh hợp chất có hoạt tính sinh học. Trong đó nhóm tác giả Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã nghiên cứu phân lập, sàng lọc và định danh các chủng vi sinh vật có hoạt tính kháng sinh từ vùng biển Đông Bắc Việt Nam.

Nhóm tác giả Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam cũng đã nghiên cứu phân lập hợp chất có hoạt tính kháng sinh và kháng ung thư từ xạ khuẩn nội cộng sinh trên cây Quế *Cinnamomum cassia* (L.) J. Presl và cây Màng tang *Litsea cubeba* (Lour.) Pers.

Nhóm tác giả Võ Thị Ngọc Mỹ và đồng tác giả từ Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành và Trường Đại học Y – Dược Thành phố Hồ Chí Minh đã nghiên cứu phân lập và sàng lọc các chủng vi sinh vật nội sinh có hoạt tính chống oxy hóa từ một số cây họ *Zingiberaceae* và *Rutaceae* [48].

Nhóm tác giả Nguyễn Thiện Phú và Vũ Thị Thương từ Trường Đại học Sư phạm Thành phố Hồ Chí Minh đã nghiên cứu phân lập và tuyển chọn các chủng nấm sợi có khả năng tạo lovastatin từ rừng ngập mặn Cần Giờ.

Năm 2017 nhóm tác giả Trương Minh Phụng và đồng tác giả thuộc Trung Tâm Nghiên cứu và Ứng dụng Sinh học và Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh đã nghiên cứu hoạt tính kháng khuẩn của các chủng xạ khuẩn nội sinh trong cây Trinh nữ hoàng cung *Crinum latifolium* [49].

Tuy nhiên, việc tiến hành nghiên cứu nấm nội sinh trong cây dược liệu có khả năng sinh tổng hợp các hợp chất có hoạt tính chữa bệnh mới chỉ bắt

đầu như nghiên cứu nấm nội sinh trên cây thông đỏ lá dài có khả năng sản sinh paclitaxel. Việc phân lập và nghiên cứu các điều kiện nuôi cấy nhằm tìm kiếm các chủng nấm nội sinh và nâng cao khả năng sinh tổng hợp các hợp chất có hoạt tính còn thiếu rất nhiều.

CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU

2.1.1. Vật liệu thực vật

Mẫu cây dược liệu: cây Dừa cạn và cây Bạch hoa xà thiệt thảo

Địa điểm thu thập mẫu cây dược liệu tại các địa điểm sau:

- Đan Phượng (Hà Nội)
- Phú Diễn (Hà Nội)
- Hải Dương.

2.1.2. Hóa chất, dụng cụ, thiết bị và môi trường

Các hóa chất sử dụng: Nitor lỏng, PVP (Poly vinyl pyrrolidone), CTAB, NaCl, Tris-HCl, EDTA, Sorbitol, NaH₂PO₄, H₂O deion, Isopropanol, Ethanol, Chloroform, Isoamyl alcohol, RNase, đệm rửa, đệm tách, javen, cồn 75°, cefotaxime, H₂O deion...

Dụng cụ và thiết bị: Cối, chày sứ, giấy thấm khử trùng, panh, dao, kéo, đĩa cấy, đĩa petri, bình pyrex 500ml, Tủ cấy, tủ nuôi, máy PCR, máy điện di, máy voltex, máy li tâm, nồi hấp tiệt trùng, máy lọc nước...

Môi trường: Môi trường thạch LB (Luria Bertani), PDA (Potato Dextrose Agar) (Hãng Himedia, Ấn Độ).

Các hóa chất khác sau: cefotaxime, HCl, NaOH, methanol, bản mỏng silicagel-G, chất chuẩn vinblastin và vincristine, thuốc thử dragendorf...

Bảng 2.1. Thành phần của dung dịch đệm rửa

Component	stock	working
Tris-HCl, pH8	1M	50mM
EDTA	0.5M	50mM
sorbitol		0.35M

Bảng 2.2. Thành phần của dung dịch đệm tách

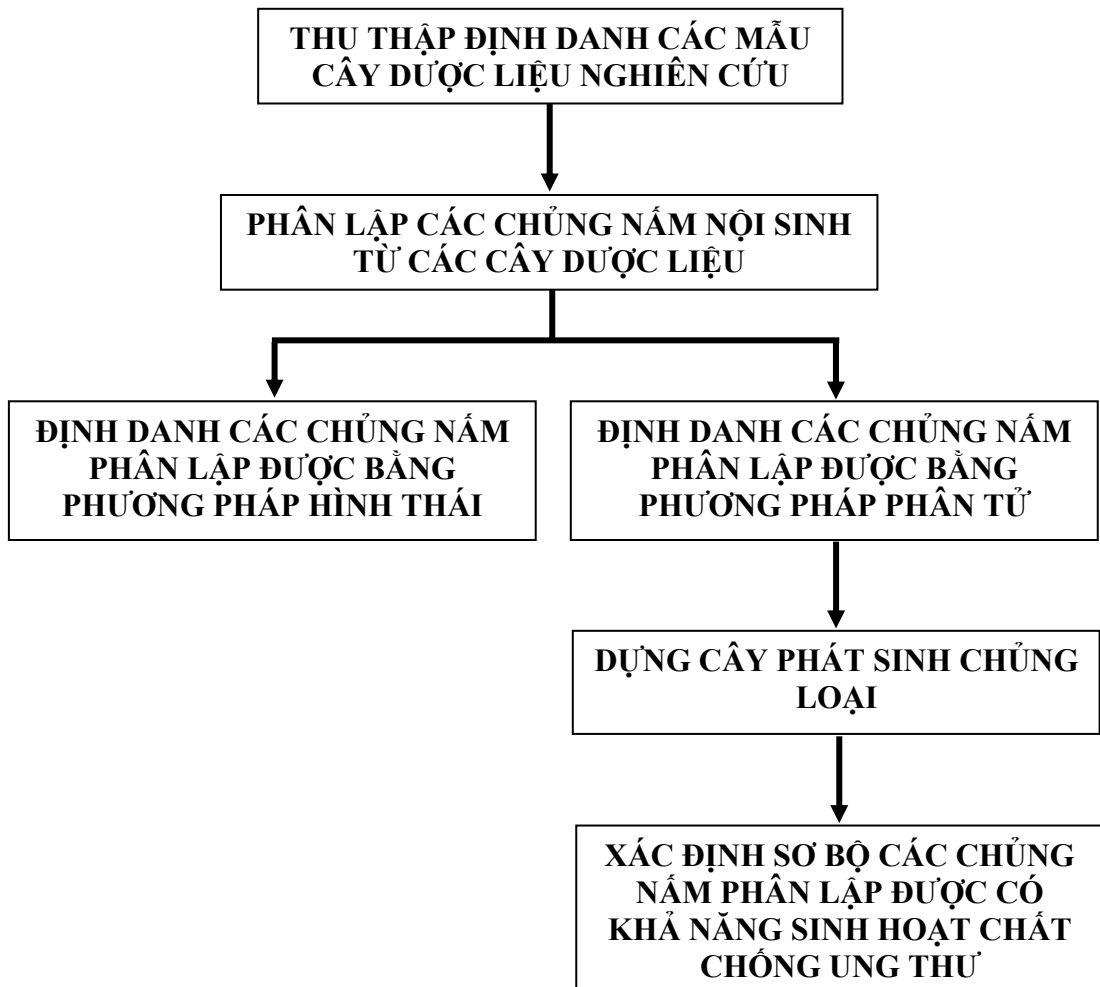
Component	stock	working
Tris-HCl, pH8	1M	100mM
EDTA	0.5M	50mM
NaCl	5M	1.4M
CTAB		2%
PVP		2%

Bảng 2.3. Danh sách trình tự các môi sử dụng trong nghiên cứu

TT		Tên môi	Trình tự môi
1	<i>RbcL</i>	P2F	ATGTCACCACAAACAGAAAC
		P2R	TCGCATGTACCTGCAGTAGC
2	<i>matK</i>	P9F	CGATCTATTCATTCAATATTTC
		P9R	TCTAGCACACGAAAGTCGAAGT
3	<i>ITS</i>	P12F	ACGAATTCATGGTCCGGTGAAGTGTTTCG
		P12R	TAGAATTCCCCGGTTCGCTCGCCGTTAC
4	<i>ITS nấm</i>	ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'
		ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC

Các thí nghiệm được thực hiện tại phòng Hệ gen học chức năng, Viện Nghiên cứu hệ Gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU



Hình 2.1. Sơ đồ quy trình nghiên cứu

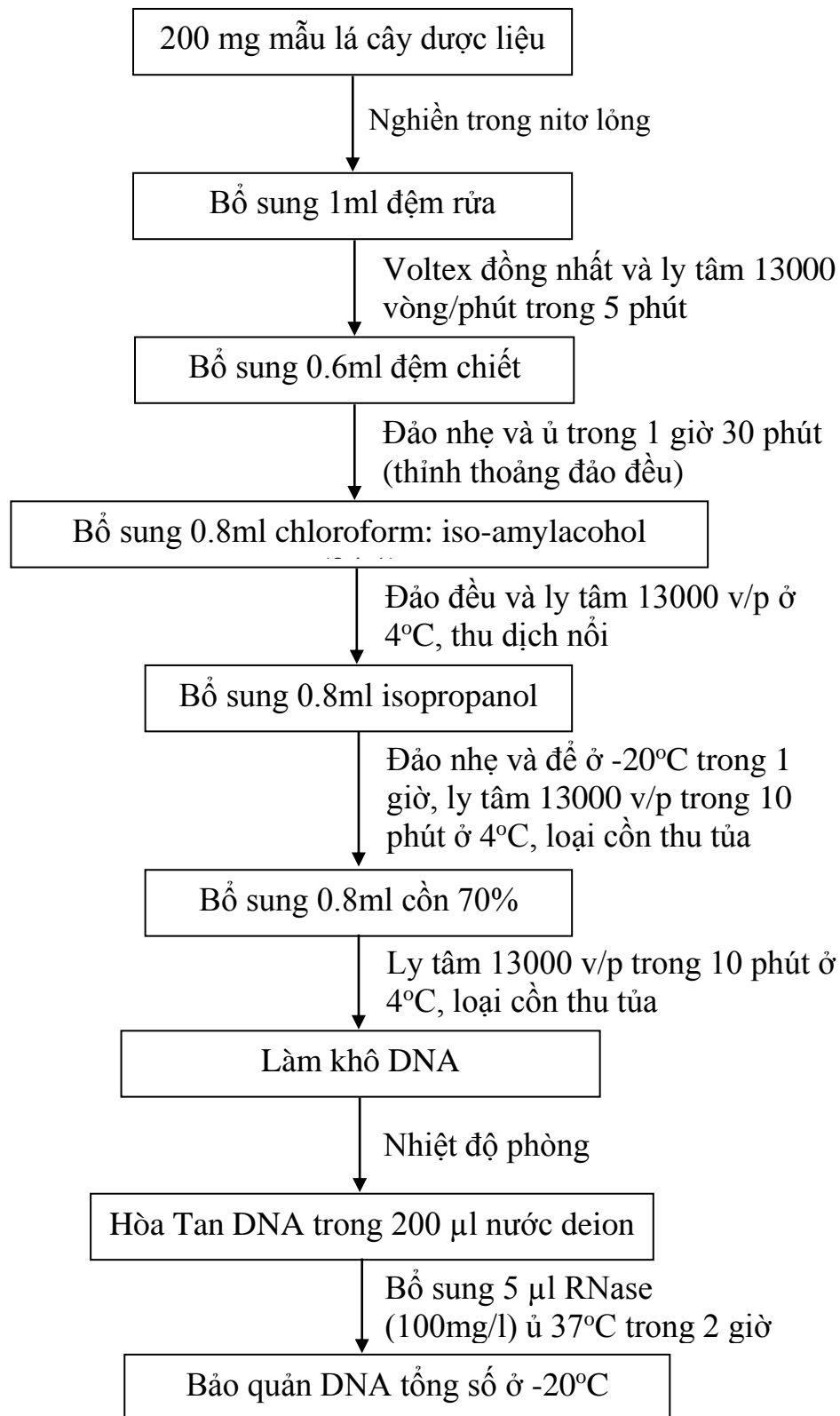
2.2.1. Thu thập và định danh mẫu cây dược liệu

2.2.1.1. Phương pháp thu thập mẫu nghiên cứu

Các mẫu cây dược liệu thu thập được là những mẫu cây mẫu cây đầy đủ lá, thân, rễ và hoa (nếu có), mọc tự nhiên, khỏe mạnh, không sâu bệnh, có độ tuổi trên một năm.

2.2.1.2. Phương pháp định danh mẫu dược liệu nghiên cứu

Tách chiết DNA tổng số bằng phương pháp CTAB cải tiến



Hình 2.2. Sơ đồ quá trình Tách chiết DNA tổng số bằng phương pháp CTAB cải tiến

Bước 1: Cân 200mg mẫu lá cây dược liệu và nghiền trong nitơ lỏng thành dạng bột mịn, chuyển vào ống eppendorf 2ml.

Bước 2: Bổ sung 1ml đệm rửa vào ống eppendorf 2ml, vortex thành dịch đồng nhất. Ly tâm 13000 vòng/phút(v/p) trong 5 phút.

Bước 3: Bổ sung 0.6ml đệm chiết, đảo nhẹ thành hỗn hợp đồng nhất. Ủ trong 1 giờ 30 phút (thỉnh thoảng đảo đều).

Bước 4: Bổ sung 0.8ml chloroform: isoamylalcohol (24:1 v/v), đảo đều. Ly tâm 13000v/p ở 4°C. Hút dịch nổi cho vào ống eppendorf 1,5 ml mới.

Bước 5: Bổ sung 0.8 ml isopropanol, đảo nhẹ, để ở tủ -20°C trong 1 giờ (ít nhất 20 phút). Ly tâm 13000 v/p trong 10 phút ở 4°C, loại cặn thu tủa.

Bước 6: Bổ sung 0.8 ml cồn 70%. Ly tâm 13000 v/p trong 10 phút ở 4°C, loại cặn thu tủa.

Bước 7: Làm khô DNA ở nhiệt độ phòng.

Bước 8: Hòa tan DNA trong 200 µl nước khử ion. Bổ sung 5 µl RNase (100mg/l) ủ 37°C trong 2 giờ.

Bước 9: Bảo quản DNA tổng số ở -20°C.

Phân tích di truyền bằng kỹ thuật PCR

Phản ứng PCR được thực hiện trên máy PCR PTC – 100 (MJ. Research., Mỹ) với tổng thể tích là 25 µl/mẫu trong đó chứa các thành phần và nồng độ của các chất tham gia phản ứng như sau:

Bảng 2.4: Thành phần của phản ứng PCR/tổng thể tích mẫu

Thành phần phản ứng	Thể tích (µl)
Nước khử ion vô trùng	12.8
Buffer (10X)	2.5
MgCl ₂ (25 mM)	2.5
dNTP (10mM)	2.5
Primer - F (100 pmol/µl)	1
Primer - R (100 pmol/µl)	1
Tag DNA polymerase (6 unit/ µl)	0.7
DNA	2
Tổng thể tích	25

Bảng 2.5: Chu kì phản ứng PCR

Bước	Phản ứng	Nhiệt	Thời gian	Chu kì
1	Biến tính	94	2	
2	Biến tính	94	30	} 30
3	Gắn mồi	55	50	
4	Kéo dài chuỗi	72	1	
5	Hoàn tất kéo dài chuỗi	72	10	
6	Kết thúc phản ứng	4	∞	

Phương pháp điện di trên gel agarose

Sản phẩm PCR được điện di trên gel điện di agarose 1 – 1.5% chạy ở hiệu điện thế 60 – 80 V trong 45 phút bằng phương pháp nhuộm hiện hình với ethidium bromide. Kích thước tương đối của các băng nhân bản được so sánh với marker 1 kb (GeneRuler 1 kb DNA Ladder SM0311, Thermo Scientific).

Nhuộm DNA bằng ethidium bromide

Sau khi điện di kết thúc, có thể nhuộm miếng gel với dung dịch ethidium bromide 0.5ug/ml (trong nước) trong vòng 15 – 60 phút và quan sát dưới đèn UV.

Quan sát và chụp ảnh

Bản gel sau khi nhuộm ethidium bromide được quan sát dưới ánh sáng tử ngoại với bước sóng $\lambda = 302$ nm. Khi chụp ảnh gel, những miếng gel mỏng (2-3mm) với nồng độ agarose thấp sẽ cho kết quả đẹp hơn những miếng gel dày hoặc có nồng độ agarose cao.

Giải trình tự và so sánh với trình tự tham khảo trên cơ sở dữ liệu GenBank

Sản phẩm PCR đặc hiệu được tinh sạch và giải trình tự bằng máy giải trình tự API 3730 (PE Applied Biosystems).

Các trình tự barcode thu được của các mẫu dứa cạn được so sánh với trình tự tham khảo trên cơ sở dữ liệu GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) bằng chương trình BLASTN theo nghiên cứu của Altschul và cộng sự (1997).

Đối với thực vật, quá trình tìm kiếm một chỉ thị DNA chung cho các loài thực vật gặp nhiều khó khăn. Hệ gen ty thể ở thực vật thường quá bảo thủ nên không được dùng cho chỉ thị DNA, trong khi đó hệ gen lục lạp lại mang nhiều đặc điểm mong muốn đối với chỉ thị DNA như ở hệ gen ty thể ở động vật. ở hệ gen nhân, vùng DNA nằm giữa các gen hay còn gọi là ITS (Internal Transcribed Spacer) cũng được sử dụng làm DNA chỉ thị trong một số nghiên cứu. Mặc dù một vài locus trong hệ gen lục lạp và gen nhân được nghiên cứu làm chỉ thị trong nghiên cứu DNA barcode song kết quả thu được vẫn có những hạn chế. Điều này cho thấy việc cần thiết sử dụng kết hợp các locus để bổ sung cho nhau đem lại hiệu quả cao hơn trong đánh giá, phân loại các loài thực vật. Trên thực tế từ lâu *rbcL* đã được sử dụng trong nghiên cứu phát sinh loài, bên cạnh đó trình tự gen *matK* có tỷ lệ tiến hóa cao nhất trong các gen lục lạp cũng có khả năng phân biệt loài cao.

2.2.2. Phương pháp xác định vi nấm nội sinh từ các cây dược liệu Việt Nam

2.2.2.1. Quy trình khử trùng bề mặt bằng phương pháp của Robert & Terry (1978) có cải tiến

Để đảm bảo chắc chắn nấm thu được là nấm nội sinh, nhóm nghiên cứu đã tiến hành vào mẫu để loại bỏ hết các vi nấm và vi khuẩn ngoại sinh trên cây Dứa cạn và cây Bạch hoa xà thiệt thảo. Nguyên liệu thực vật tươi được sử dụng để phân lập bao gồm thân, rễ, lá và hoa [50].

Các mẫu rễ, thân, lá và hoa được làm sạch dưới vòi nước chảy để loại bỏ đất. Sau khi đã làm sạch, các mẫu thân và rễ được cắt thành các đoạn có kích thước 3 cm, các mẫu lá cắt thành các lá riêng biệt và khử trùng bề mặt bằng cách rửa qua nước cất vô trùng 10 lần, rửa bằng cồn 75° trong thời gian 1 phút, rồi rửa lại nước cất vô trùng 1 lần, tiếp tục rửa với dung dịch nước

javen thương phẩm có chứa 5% NaOCl (v/v), lắc trong 30 phút. Sau đó, các mẫu được rửa lại bằng nước cất vô trùng trong 5 phút và thấm khô bằng giấy vô trùng. Sau đó các phần mẫu thử được đặt trên môi trường thạch LB (Hãng Himedia, Ấn Độ) có bổ sung cefotaxime 200 $\mu\text{g/ml}$ (Hãng Flamingo Pharm, Ấn Độ). Các đĩa được ủ ở 25°C và theo dõi hàng ngày. Sau 5 ngày nuôi cấy, nếu mẫu nào không xuất hiện vi khuẩn hoặc vi nấm xung quanh thì được coi là sạch và đủ tiêu chuẩn cho phân lập vi nấm nội sinh [51].

2.2.2.2. Phân lập chủng nấm nội sinh

Bước 1. Sau khi được khử trùng bề mặt, các mẫu thân, lá và rễ được nghiền nát bằng cối và chày vô trùng.

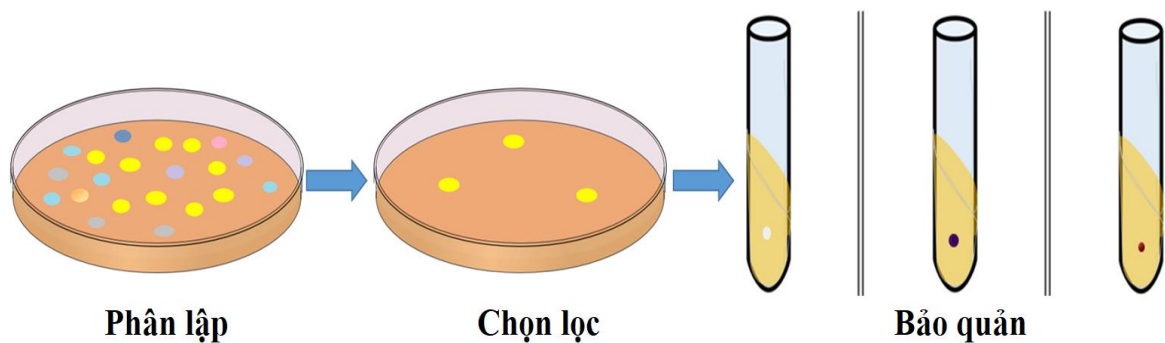
Bước 2. Các mẫu nghiền này được đặt lên đĩa thạch Potato Dextrose Agar (PDA) (Hãng Himedia, Ấn Độ) có bổ sung 200 $\mu\text{g/ml}$ cefotaxim và được ủ ở 25±2°C.

Các khuẩn lạc nấm xuất hiện từ mô thực vật sau khi được nghiền nát được coi là vi nấm nội sinh. Việc quan sát được thực hiện hàng ngày cho đến khi thấy sự phát triển của nấm nội sinh.

2.2.2.3. Tuyển chọn bằng hình thái và bảo quản nấm nội sinh

Với mục tiêu chọn các chủng nấm nội sinh từ cây dừa cạn các tản nấm mọc riêng rẽ được lựa chọn và cấy chuyển sang đĩa thạch Potato Dextrose Agar (PDA) mới và ủ ở 25°C trong khoảng 7-10 ngày.

Các chủng nấm nội sinh sau khi làm sạch được bảo quản ở ống thạch nghiêng PDA ở 4°C và trong 25% glycerol ở -80°C (Hình 2.3).



Hình 2.3. Quy trình chọn lọc và bảo quản nấm nội sinh trên môi trường PDA

Phương pháp tách chiết DNA tổng số từ nấm nội sinh

Để tách chiết DNA, sợi nấm được chuyển từ môi trường thạch PDA vào bình tam giác 250ml có chứa 100ml môi trường Potato Dextrose Broth (PDB). Sau 7 ngày sinh trưởng ở $25 \pm 2^\circ\text{C}$, khoảng 100 mg sinh khối sợi nấm được thu thập bằng cách ly tâm. DNA tổng số được chiết xuất bằng phương pháp mini-CTAB có cải tiến để tối ưu hóa. Nồng độ và chất lượng của DNA thu được được kiểm tra bằng máy quang phổ Nanodrop® 1000 và điện di trên gel. Tất cả các mẫu DNA thu thập được bảo quản ở -20°C cho các thí nghiệm tiếp theo [52].

2.2.2.4. Giải trình tự gen bằng PCR khuếch đại vùng ITS

Vùng đệm trong được sao mã ITS được khuếch đại sử dụng cặp mồi ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') và ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') theo nghiên cứu của White và cộng sự (1990). PCR được thực hiện trên Eppendorff Mastercycler Pro S (Merck, USA). Thành phần phản ứng có tổng thể tích 25 μl bao gồm: 8,5 μl nước khử ion vô trùng, 2 μl DNA khuôn (30ng/ μl), 2 μl mồi (10 μM), 12,5 μl dung dịch 2X PCR master mix. Phản ứng PCR được thực hiện với chu trình như sau: 1 chu kỳ 94°C trong 4 phút; 35 chu kỳ (Biến tính ở 94°C trong 30 giây, ủ ở 55°C trong 30 giây, và kéo dài ở 72°C trong 1 phút); và 1 chu kỳ 72°C trong 7 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di gel trên gel agarose 1% (dùng đệm TAE 1x) ở hiệu điện thế 100V trong 45 phút, nhuộm với ethidium bromide, và được chụp lại dưới ánh sáng UV (Clever Scientific®, UK). Sản phẩm PCR đặc hiệu được tinh sạch và giải trình tự bằng máy phân tích DNA ABI 3500 (PE Applied Biosystems) [53].

Các trình tự ITS thu được của các mẫu nấm nội sinh được so sánh với trình tự tham khảo trên cơ sở dữ liệu GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) bằng công cụ trực tuyến BLASTN (RRID: SCR_001598).

2.2.3. Phương pháp xây dựng cây phân loại

Cây phát sinh chủng loài được thực hiện bằng phần mềm MEGA7 (RRID:SCR_000667) dựa trên trình tự ITS của các chủng nấm nội sinh phân lập được và trình tự nucleotide trong *Albifimbria terrestris* (CBS 126186), *Corynespora cassiicola* (CBS 161.60), *Cladosporium halotolerans* (CBS 119416), *Cladosporium endophytica* (MFLUCC 17-0599), *C. pseudochalastosporoidesi* (CBS 140490), *Corynespora cassiicola* (CBS 161.60), *Cercospora beticola* (CBS 116456) và *Myrothecium verrucaria* (CBS 253.47) [54]. Cây phát sinh loài được xây dựng bằng phương pháp khả năng tối đa. Các mức độ tin cậy của bootstrap (%) được đánh giá và xếp hạng như sau: độ tin cậy cao (> 85%), độ tin cậy trung bình (65-85%) và độ tin cậy thấp (<65%) theo nghiên cứu của Nguyễn Đức Anh & Nguyễn Giang Sơn (2016).

2.2.4. Phương pháp phát hiện nhanh các chủng có hoạt tính sinh học bằng phương pháp TLC

50 ml mẫu nấm nội sinh được ly tâm phân tách thành 2 phần gồm dịch nuôi cấy và sinh khối. Phần sinh khối được bổ sung dung dịch acid hóa pH 2,0 với tỷ lệ 1:2 (w/v). Phần môi trường nuôi cấy được điều chỉnh về pH 2,0 bằng dung dịch HCl 0,5N. Sau đó, các dung dịch được khuấy đều ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ, lọc để tách riêng dịch chiết bị acid hóa (có chứa alkaloid) và chất rắn. Phần chất rắn được rửa bằng nước cất 2 lần theo tỷ lệ 1:5 (w/v), lọc dịch và gộp hai phần dung dịch đã thu được. Dung dịch được điều chỉnh về pH 10-13 bằng NaOH 1M và bổ sung chloroform với tỷ lệ 1:1 (v/v), khuấy đều ở nhiệt độ phòng trong 60 phút, sau đó giữ ở nhiệt độ phòng trong 12 giờ. Phần dung môi hữu cơ có chứa alkaloid được thu lại bằng phễu chiết, cô quay chân không ở 40°C, tốc độ 100 vòng/phút đến khi khối lượng không đổi và thu alkaloid ở dạng cao. Cao chiết alkaloid được hòa trong 1 ml methanol để bảo quản và sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo (TLC và HPLC).

Sắc ký bản mỏng TLC được thực hiện trên bản silica gel-G (độ dày 0,5 mm) sử dụng hệ dung môi chloroform : methanol (12:1). Chất chuẩn vinblastin và vincristin được sử dụng làm đối chứng. Các bản mỏng được soi

dưới tia UV bước sóng 254 nm, sau đó, hiện hình bằng thuốc thử dragendorf để phát hiện các vệt vinblastin và vincristin trong cao chiết theo nghiên cứu của Kumar và cộng sự (2013) [55]. Trong đó thuốc thử dragendorf là tối ưu cho phát hiện vincristin và vinblastin sau các thử nghiệm với các thuốc thử - Mayer, Wagner, Dragendorf

2.2.5. Phân tích thống kê

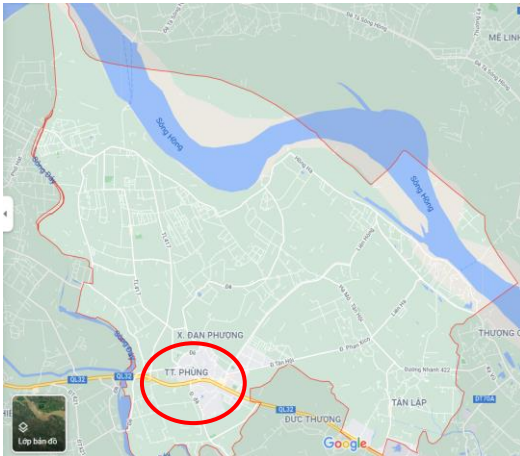
Dữ liệu phân tích từ nghiên cứu này được thu thập từ ít nhất 3 lần lặp lại. Phân tích thống kê được thực hiện bằng phương pháp phân tích phương sai (ANOVA; RRID: SCR_002427) một chiều với *post hoc* Kiểm tra Tukey (p -value > 0,05).

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

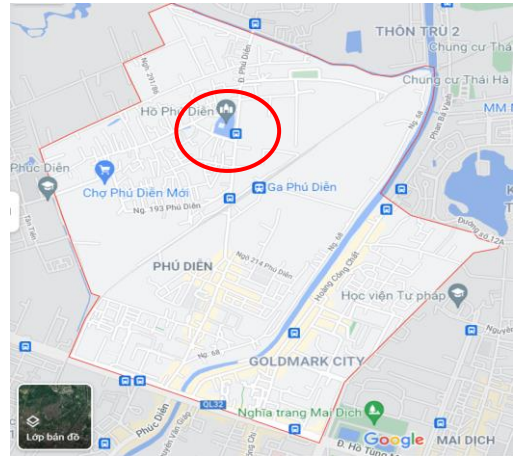
3.1. KẾT QUẢ THU THẬP VÀ ĐỊNH DANH CÁC MẪU CÂY DƯỢC LIỆU

3.1.1. Kết quả thu thập mẫu cây dược liệu

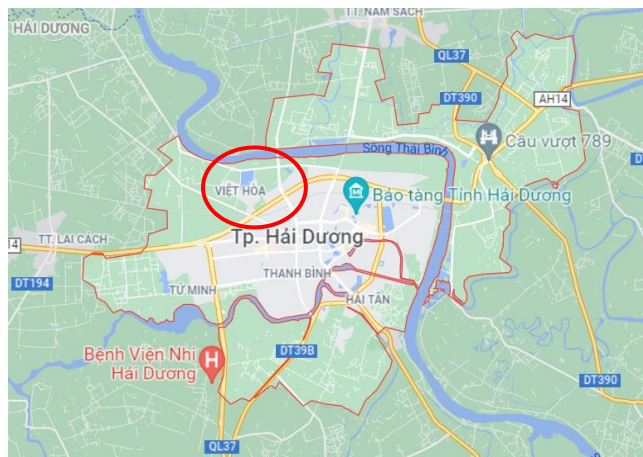
Nhóm nghiên cứu đã tiến hành thu thập được 02 mẫu cây Dừa cạn và 01 mẫu cây Bạch hoa xà thiệt thảo lần lượt được thu tại khu vực Thị trấn Phùng - Đan Phượng (Hà Nội), khu vực Hồ Phú Diễn - Phú Diễn (Hà Nội) và khu vực ven Đê sông Thái Bình gần bến đò Đồng Niên – Việt Hòa (Hải Dương) (Hình 3.1 và Bảng 3.1).



Đan Phượng – Hà Nội



Phú Diễn – Hà Nội



Việt Hòa - Hải Dương

Hình 3.1. Vị trí địa lý các địa phương đã tiến hành thu thập mẫu dược liệu.
“Nguồn Google Maps, ngày 30/08/2021”

Bảng 3.1. Danh sách mẫu cây dược liệu thu thập được

STT	Kí hiệu	Tên mẫu	Địa điểm thu thập
1	1	Dừa cạn 01	Đan Phượng - Hà Nội
2	2	Dừa cạn 02	Phú Diễn - Hà Nội
3	3	Bạch hoa xà thiệt thảo	Việt Hòa - Hải Dương

Các cây được thu thập đều là những cây khỏe mạnh (quan sát bằng mắt thường) không sâu bệnh, mọc tự nhiên hoặc thời gian trồng tại địa điểm lấy mẫu ít nhất là 1 năm (Hình 3.2). Sau khi thu thập, các mẫu được vận chuyển cẩn thận đến phòng Hệ gen học Chức năng - Viện Nghiên cứu hệ gen. Vật liệu thực vật thu thập được đã được xác thực tại phòng thí nghiệm.

Như vậy, nhóm nghiên cứu đã thu thập được các mẫu cây ở mỗi địa điểm nghiên cứu phù hợp để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo. Mẫu được bảo quản cẩn thận, tránh di chuyển mẫu nhiều và để mẫu ở nhiệt độ phòng trong thời gian dài ảnh hưởng đến chất lượng lá làm cho quá trình tiến hành thí nghiệm bị ảnh hưởng.



Mẫu cây dừa cạn 1, 2

Mẫu cây Bạch hoa xà thiệt thảo 3

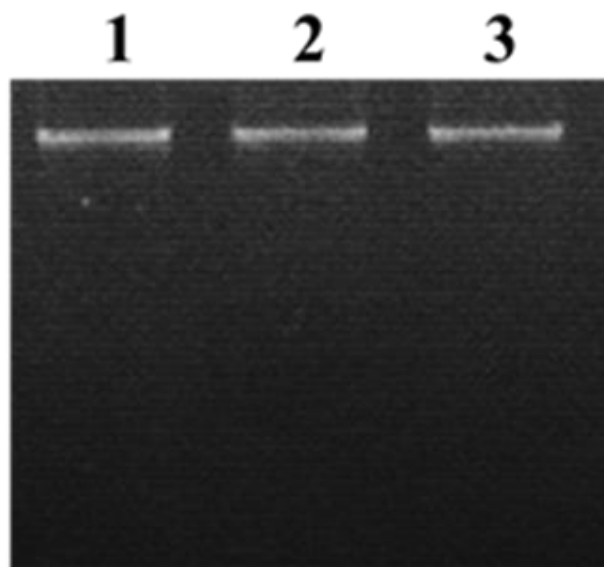
Hình 3.2. Hình ảnh mẫu cây dược liệu thu thập được

3.1.2. Kết quả định danh các cây dược liệu thu thập

Kết quả tách chiết DNA tổng số

Các mẫu lá cây dược liệu là các mẫu lá thu ngoài tự nhiên, có chứa nhiều hợp chất thứ cấp, nhóm nghiên cứu tiến hành tách chiết theo phương pháp CTAB. Phương pháp tách chiết DNA sử dụng CTAB là phương pháp khá phổ biến để tách chiết DNA từ các mẫu có nguồn gốc thực vật.

Chất lượng DNA tổng số được đánh giá dựa vào nồng độ DNA thu được, do vậy sau khi tách chiết DNA, chúng tôi kiểm tra chất lượng DNA thu được bằng phương pháp điện di trên gel agarose 0,8 – 1,0%.



Hình 3.3. Điện di đồ sản phẩm DNA tổng số các mẫu dược liệu nghiên cứu

1. Mẫu Dừa cạn 1 2. Mẫu Dừa cạn 2

3. Mẫu Bạch hoa xà thiệt thảo

Kết quả sau khi điện di trên gel agarose 0,8% và nhuộm bằng Ethidium bromide (Hình 3.3) cho thấy DNA thu được sau khi tách có chất lượng tốt, DNA không bị đứt gãy, các băng vạch đều sáng rõ. Để đảm bảo cho các nghiên cứu tiếp theo, DNA được đo nồng độ và xác định độ sạch bằng máy đo NanoDrop (Thermo Scientific).

Kết quả đo nồng độ DNA tổng số các mẫu dừa cạn bằng máy Nanodrop Lite

Cùng với kiểm tra thông qua điện di trên gel agarose, chúng tôi tiến hành đo hàm lượng và độ tinh sạch các mẫu DNA thu được sử dụng máy đọc nanodrop.

Bảng 3.2. Nồng độ và độ tinh sạch các mẫu được liệu nghiên cứu

STT	Tên mẫu	Địa điểm thu thập	Kí hiệu	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	Nồng độ (ng/μl)
1	Dừa cạn 1	Đan Phượng - Hà Nội	Dừa cạn 01	2.03	1015.3
2	Dừa cạn 2	Phú Diễn - Hà Nội	Dừa cạn 02	2.09	900.0
3	Bạch hoa xà thiệt thảo	Việt Hòa - Hải Dương	Bạch hoa xà thiệt thảo	1.92	980.6

Kết quả ở bảng 3.2 cho thấy rằng DNA được tách chiết với độ tinh sạch cao nằm trong khoảng từ 1.80 đến 2.20. Nồng độ DNA được tách chiết cao đảm bảo độ tin cậy, do đó DNA này sẽ được pha loãng đến nồng độ cuối cùng là 50-100 ng/μl tiếp tục cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.1.2.1. Kết quả xác định và phân tích trình tự gen của cây Dừa cạn

Kết quả giải trình tự gen ITS

Các đoạn DNA sau khi được nhân gen bằng phản ứng PCR được tinh sạch và đọc trình tự tại phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen. Trình tự được xác định trên máy đọc trình tự tự động theo nguyên lý của Sanger. Sau khi tiến hành phân tích trình tự bằng phần mềm Bioedit được trình tự như sau:

GTTTCTTTTCCTCCGCTTATTGATATGCTTAAACTCAGCGGGT
 AGTCCCGCCTGACCTGGGGTCGCAGTCGTGGCAAGCGCTCCTGCTC
 TTTCGAGGGGGAAGGGCTAGCAACAGGGGTCGTTCCGGACACCTAG
 ACCGCGGTTCTCGTCACGACTCGCATTTCGAGTTGAGGATTTCAACC
 ACCACTTGTCGTGACGTCCGCAGCAAGGGACCAAGATTTAGGCCA

ACCGCGAGTAATGCACGGGAGGCCAATATACGTCCTCCCTCAAGC
 GCCGAGTCATCCACAGATGGACGAGGCGAGGGGAGGGCGACGGG
 ATGCGTGACGCCAGGCAGACGTGCCCTCGGCCTAATGGCTTGGG
 GCGCAACTTGCGTTCAAAAACCTCGATGGTTCACGGGATTCTGCAAT
 TCACACCAAGTATCGCAGTTTGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAG
 CCTAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTTTGGTTTACAAAGGTGCCT
 TAGCTCCCAAGGACAGCACCGCGAACGGGCCGACCTAGGGAAGGC
 AATCCCCTTGAGTAGTCCTTGGCGCTTTCGCGCCGGGGTTTGT
 GTTAGGCACGACCGGTTGCCCAAGGGCACTCGGCAGGCCGAGGGG
 GCAACGAGCAGGTAGTCCCTAGAGACCCCTTGCTCGAGGCCCGAG
 TAAAGAACAAGTTCGCCGGTTTGCTTTACAGGATTTCGACAATGATC
 CTCCGCAGGTTACCTACGGAAACCTTGTTACGACTTCTCCTTCT
 CTAAATGATAAGGTTTCAGTGGACTTCTCGCGACGTGCGGGGCAGC
 GAACCGCTCACGTCGCCGC

Sau khi giải trình tự, việc định danh loài đã được tiến hành bằng cách blast trên ngân hàng Genbank (Hình 3.4).

Sequences producing significant alignments		Download	Select columns	Show	100			
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Ixora chinensis voucher 1883 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1_5...	Ixora chinensis	1384	1384	93%	0.0	99.48%	765	MH844616.1
<input checked="" type="checkbox"/> Catharanthus roseus 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1_5.8S ribosomal R...	Catharanthus ros...	1352	1352	90%	0.0	99.73%	742	HQ130657.2
<input checked="" type="checkbox"/> Ixora chinensis voucher 1882 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1_5...	Ixora chinensis	1351	1351	90%	0.0	99.86%	734	MH844615.1
<input checked="" type="checkbox"/> Catharanthus roseus voucher 1903 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spac...	Catharanthus ros...	1339	1339	91%	0.0	99.07%	764	MH566908.1
<input checked="" type="checkbox"/> Catharanthus roseus voucher 1904 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spac...	Catharanthus ros...	1338	1338	90%	0.0	99.19%	763	MH566909.1
<input checked="" type="checkbox"/> Catharanthus roseus strain PYCR1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spac...	Catharanthus ros...	1336	1336	89%	0.0	99.59%	738	MK880333.1
<input checked="" type="checkbox"/> Catharanthus roseus strain PYCR2 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spac...	Catharanthus ros...	1332	1332	90%	0.0	99.32%	740	MK880334.1

Lineage (fully): [cellular organisms](#); [Eukaryota](#); [Viridiplantae](#); [Streptophyta](#); [Streptophytina](#); [Embryophyta](#); [Tracheophyta](#); [Euphyllophyta](#); [Spermatophyta](#); [Magnoliopsida](#); [Mesangiospermae](#); [eudicotyledons](#); [Gunneridae](#); [Pentapetales](#); [asterids](#); [Lamiids](#); [Gentianales](#); [Apocynaceae](#); [Rauvolfioideae](#); [Vinceae](#); [Catharanthinae](#); [Catharanthus](#)

- [Catharanthus roseus](#) (Madagascar periwinkle) Click on organism name to get more information.
 - [Catharanthus roseus var. roseus](#)

Disclaimer: The NCBI taxonomy database is not an authoritative source for nomenclature or classification - please consult the relevant scientific literature for the most reliable information.

Reference: How to cite this resource - [Schöck CL, et al. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. Database \(Oxford\). 2020; baad062. PubMed: 32761142. PMC: PMC7408187.](#)

Hình 3.4. Kết quả so sánh với cặp môi ITS với các trình tự trên ngân hàng Genbank

Kết quả cho thấy loài cây Dừa cạn thu thập được thuộc loài *Catharanthus roseus* với độ tương đồng là 97.73% (Bảng 3.3).

Kết quả xác định và phân tích trình tự gen trnL

Các đoạn DNA sau khi được nhân gen bằng phản ứng PCR được tinh sạch và đọc trình tự tại phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen. Trình tự được xác định trên máy đọc trình tự tự động theo nguyên lý của Sanger. Sau khi tiến hành phân tích trình tự bằng phần mềm Bioedit được trình tự như sau:

TTCAGAGAAACCCCGGAATTAATAAAAGGGGCAATCCTGAG
 CCAAATCCAGTTTTCCACAAACACAAACAAAGGTTTCAGAAAACGA
 AAAAGGGATAGGTGCAGAGACTCAACGGAAGCTGTTCTAACAAAT
 GGACAAATGGAGTTGGCCGCGTTGGTAGAGAAACAAACCTTTCCA
 TCCAAAATTCAGAAAGGATGAAGGATAAACGTATATACATACGTA
 TTGAATACTATATCAAATGATTAATGCCGACCCGAATGAATCCGTA
 TTTTTTCTATAAAAATGTAAGAATTGGTTTGATTTCGATTCCACATTG
 AAGAAAGAATCGAATATTCATTGATCAAATGATTCACTCCATAGTC
 TGTAGATCTTTTCAAGAACTGATTAATCGGACGAGAATAAAGATA
 GAGTCCCGTTCTACATGTCAATGCTGGCAACAATGAAATTTATAGT
 AAGAG

Sau khi giải trình tự, việc định danh loài đã được tiến hành bằng cách blast trên ngân hàng Genbank (Hình 3.5).

Sequences producing significant alignments									
Download Select columns Show 100									
select all 100 sequences selected									
GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer									
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc Len	Accession	
<input checked="" type="checkbox"/> Catharanthus roseus isolate Ou18 tRNA-Leu (trnL) gene and trnL-trnF intergenic spacer, partial sequence, pl...	Catharanthus ro...	811	811	100%	0.0	100.00%	881	MT078037.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Catharanthus roseus cultivar Pacific Punch Halo chloroplast, complete genome	Catharanthus ro...	754	754	100%	0.0	97.95%	154950	NC_021423.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Catharanthus roseus tRNA-Leu (trnL) gene, intron, chloroplast	Catharanthus ro...	708	708	100%	0.0	96.36%	490	AF102392.2	
<input checked="" type="checkbox"/> Alstonia yunnanensis chloroplast, complete genome	Alstonia yunnan...	651	651	100%	0.0	94.09%	155591	NC_068670.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Willughbeia coriacea voucher AS138 tRNA-Leu (trnL) gene and trnL-trnF intergenic spacer, partial sequence, ...	Willughbeia cori...	647	647	100%	0.0	93.88%	808	KU853214.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Parahancornia fasciculata voucher B444022 tRNA-Leu(UAA) (trnL) gene, intron, chloroplast	Parahancornia.f...	645	645	100%	2e-180	93.86%	860	MK797483.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Parahancornia fasciculata voucher B419008 tRNA-Leu(UAA) (trnL) gene, intron, chloroplast	Parahancornia.f...	645	645	100%	2e-180	93.86%	868	MK797482.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Willughbeia edulis chloroplast	Willughbeia edulis	645	645	100%	2e-180	93.86%	129718	MG963269.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Laxopolumeria baehniiana chloroplast	Laxopolumeria ba...	645	645	100%	2e-180	93.86%	126926	MG963255.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Ochrosia nakajana chloroplast trnL gene, intron, partial sequence, isolate: OGA0437	Ochrosia nakajana	645	645	100%	2e-180	93.86%	441	AB817630.1	

Lineage (full): cellular organisms; Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Streptophytina; Embryophyta; Tracheophyta; Euphyllophyta; Spermatophyta; Magnoliopsida; Mesangiospermae; eudicotyledons; Gunneridae; Pentapetalae; asterids; Lamiids; Gentianales; Apocynaceae; Rauvolfiaceae; Vinceae; Catharanthinae; Catharanthus

- o [Catharanthus roseus](#) (Madagascar periwinkle) Click on organism name to get more information.
 - [Catharanthus roseus var. roseus](#)

Disclaimer: The NCBI taxonomy database is not an authoritative source for nomenclature or classification - please consult the relevant scientific literature for the most reliable information.

Reference: How to cite this resource - Schoch CL, et al. *NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. Database (Oxford)*. 2020; [baaa062](#). PubMed: [32761142](#) PMC: [PMC7408187](#).

Hình 3.5. Kết quả so sánh với cặp môi trnL với các trình tự trên ngân hàng Genbank

Kết quả cho thấy loài cây Dừa cạn thu thập được thuộc loài *Catharanthus roseus* với độ tương đồng là 100% (Bảng 3.3).

3.1.2.2. Kết quả xác định và phân tích trình tự gen của cây Bạch hoa xà thiệt thảo

Kết quả xác định và phân tích trình tự gen RbcL

Các đoạn DNA sau khi được nhân gen bằng phản ứng PCR được tinh sạch và đọc trình tự tại phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen. Trình tự được xác định trên máy đọc trình tự tự động theo nguyên lý của Sanger. Sau khi tiến hành phân tích trình tự bằng phần mềm Bioedit được trình tự như sau:

ATACTCCTGAATACGAAACCAAAGATACTGATATCTTGGCAG
 CATTCCGAGTAACTCCTCAACCCGGAGTTCCACCGGAAGAAGCAG
 GGGCCGCGGTAGCTGCCGAGTCTTCTACTGGTACATGGACAACCTGT
 ATGGACCGATGGACTTACCAGTCTTGACCGTTACAAAGGACGATG
 CTACCACATCGAGCCAGTTCCTGGAGAAGAAGATCAATTTATTGCT
 TATGTAGCTTACCCTTTAGATCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAA
 CATGTTTACTTCCATCGTAGGTAATGTATTTGGGTTCAAAGCCCTG
 CGCGCCCTACGTCTGGAAGATTTGCGAATTCCAATTGCTTATGTTA
 AACCTTCGAAGGGCCGCCTCACGGTATTCAGGTCGAGAGAGATA
 AATTGAACAAGTATGGTCGTCCCCTATTGGGATGTACTATTAACC
 TAAATTAGGTTTATCTGCTAAAAACTACGGTAGAGCATGTTATGAA
 TGTCTTCGTGGTGGACTTGATTTTACTAAAGATGATGAAAACGTGA
 ACTCTCAACCATTTATGCGTTGGAGAGATCGTTTCTTATTTTG

Sau khi giải trình tự, việc định danh loài đã được tiến hành bằng cách blast trên ngân hàng Genbank (Hình 3.6).

Sequences producing significant alignments

Download Select columns Show 100

select all 100 sequences selected

GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Oldenlandia corymbosa voucher TuTY1444 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subuni...	Oldenlandia cor...	1050	1050	100%	0.0	100.00%	1248	MH767717.1
<input checked="" type="checkbox"/> Oldenlandia corymbosa var. corymbosa genome assembly, organelle, plastid	Oldenlandia cor...	1050	1050	100%	0.0	100.00%	152414	OX459127.1
<input checked="" type="checkbox"/> Oldenlandia corymbosa var. corymbosa genome assembly, chromosome 7	Oldenlandia cor...	1050	1050	100%	0.0	100.00%	27831323	OX459124.1
<input checked="" type="checkbox"/> Oldenlandia corymbosa voucher H2106 chloroplast, complete genome	Oldenlandia cor...	1050	1050	100%	0.0	100.00%	152327	NC_057983.1
<input checked="" type="checkbox"/> Oldenlandia corymbosa ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit gene, partial cds;...	Oldenlandia cor...	1050	1050	100%	0.0	100.00%	609	MT981271.1
<input checked="" type="checkbox"/> Oldenlandia corymbosa voucher WRJ0050 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subuni...	Oldenlandia cor...	1050	1050	100%	0.0	100.00%	615	JF941789.1
<input checked="" type="checkbox"/> Oldenlandia corymbosa isolate 1427 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl)...	Oldenlandia cor...	1050	1050	100%	0.0	100.00%	611	JF699849.1
<input checked="" type="checkbox"/> Thecorchus wauensis chloroplast partial rbcl gene for ribulose-1,5-bisphosphate-carboxylase, specimen v...	Thecorchus wa...	1050	1050	100%	0.0	100.00%	1399	AM117282.1
<input checked="" type="checkbox"/> O.cf.corymbosa rbcl gene	Oldenlandia cor...	1033	1033	100%	0.0	99.47%	1408	X83655.1
<input checked="" type="checkbox"/> Oldenlandia diffusa voucher P6874 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl)...	Oldenlandia diff...	1011	1011	100%	0.0	98.77%	708	JF949979.2
<input checked="" type="checkbox"/> Hedycotis ovatifolia isolate 13 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene;...	Debia ovatifolia	1005	1005	100%	0.0	98.59%	611	JF699863.1
<input checked="" type="checkbox"/> Richardia scabra voucher Zhu S.S.316 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase large subunit (rbcl) gene, p...	Richardia scabra	1000	1000	100%	0.0	98.42%	717	MH050081.1

Lineage (64): cellular organisms; Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Streptophytina; Embryophyta; Tracheophyta; Euphyllophyta; Spermatophyta; Magnoliopsida; Mesangiospermae; eudicotyledons; Gunneridae; Pentapetales; asterids; Lamiales; Gentianales; Rubiaceae; Rubioideae; Spermaceae; Hedycotis-Oldenlandia complex; Oldenlandia

- Oldenlandia corymbosa Click on organism name to get more information.
 - Oldenlandia corymbosa var. corymbosa
 - Oldenlandia corymbosa var. tereticaulis

Disclaimer: The NCBI taxonomy database is not an authoritative source for nomenclature or classification - please consult the relevant scientific literature for the most reliable information.

Reference: How to cite this resource - Schoch CL, et al. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. Database (Oxford). 2020; [baaa062](#). PubMed: [32761142](#) PMC: [PMC7408187](#).

Hình 3.6. Kết quả so sánh với cặp môi Rbcl với các trình tự trên ngân hàng Genbank

Kết quả cho thấy loài cây Bạch hoa xà thiệt thảo thu thập được thuộc loài *Oldenlandia corymbosa* (Lưỡi rắn trắng) với độ tương đồng 100% (Bảng 3.3).

Kết quả xác định và phân tích trình tự gen *trnL*

Các đoạn DNA sau khi được nhân gen bằng phản ứng PCR được tinh sạch và đọc trình tự tại phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen. Trình tự được xác định trên máy đọc trình tự tự động theo nguyên lý của Sanger. Sau khi tiến hành phân tích trình tự bằng phần mềm Bioedit được trình tự như sau:

```
GAAACCCTGGAATTAATAAAAAGGGGCAATCCTGAGCCAAA
TCCTATTTTCCGAAAACAAAAACAAAGGTTTCAGAAAGGGAAAAA
GGGGATAGGTGCAGAGACTCAACGGAAGCTGTTCTAACAAATGGA
GTTGGATGCGTTAGTCGATAAGTCTTTCCAGGAAAATTCCTTCAG
TATTTTCAGTATTTAAGGATAAAGCGAAGGATAACCATATATATAC
ATATGTAGTGAATAGTATATTAATGAGTATTGACAGCCCAAACCTC
TTTTTTCTATGAAAAAAGAAAGTTAATAGATTCCATGTTTAAGAAC
```

GAATCGAATATTCATTGATCAAATGATTCACTCCATAGTCTGATAG
 ATCTTTTCACGAACTGATTAATCAGACGAGAATAAAGATAGAGTC
 CCATTTTACATGTCAATTCCGGCAACAATGAAATTTATAGTTAAGA
 GGAAAATCCGTGACTTTTAAAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCCT
 AT

Sau khi giải trình tự, việc định danh loài đã được tiến hành bằng cách blast trên ngân hàng Genbank (Hình 3.7).

Sequences producing significant alignments

Download Select columns Show 100

select all 100 sequences selected

GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Oldenlandia corymbosa var. corymbosa genome assembly, organelle, plastid	Oldenlandia cor...	887	887	100%	0.0	100.00%	152414	OX459127.1
<input checked="" type="checkbox"/> Oldenlandia corymbosa var. corymbosa genome assembly, chromosome. 7	Oldenlandia cor...	887	887	100%	0.0	100.00%	27831323	OX459124.1
<input checked="" type="checkbox"/> Oldenlandia corymbosa var. corymbosa voucher JBSC-50 tRNA-Leu (trnL) gene and trnL-trnF intergenic sp...	Oldenlandia cor...	887	887	100%	0.0	100.00%	842	JX111379.1
<input checked="" type="checkbox"/> Oldenlandia corymbosa voucher H2106 chloroplast, complete genome	Oldenlandia cor...	887	887	100%	0.0	100.00%	152327	NC_057983.1
<input checked="" type="checkbox"/> Oldenlandia corymbosa isolate DS12 tRNA-Leu (trnL) gene and trnL-trnF intergenic spacer, partial sequen...	Oldenlandia cor...	887	887	100%	0.0	100.00%	854	HQ148872.1
<input checked="" type="checkbox"/> Oldenlandia corymbosa isolate MA23 tRNA-Leu (trnL) gene and trnL-trnF intergenic spacer, partial sequen...	Oldenlandia cor...	887	887	100%	0.0	100.00%	855	HM752873.1
<input checked="" type="checkbox"/> Oldenlandia corymbosa isolate TB01 tRNA-Leu (trnL) gene and trnL-trnF intergenic spacer, partial sequen...	Oldenlandia cor...	887	887	100%	0.0	100.00%	855	HM752831.1
<input checked="" type="checkbox"/> Oldenlandia corymbosa isolate TA01 tRNA-Leu (trnL) gene and trnL-trnF intergenic spacer, partial sequen...	Oldenlandia cor...	887	887	100%	0.0	100.00%	856	HM752830.1
<input checked="" type="checkbox"/> Oldenlandia corymbosa isolate MA25 tRNA-Leu (trnL) gene and trnL-trnF intergenic spacer, partial sequen...	Oldenlandia cor...	883	883	100%	0.0	99.79%	855	HM752875.1
<input checked="" type="checkbox"/> Oldenlandia corymbosa isolate DS15 tRNA-Leu (trnL) gene and trnL-trnF intergenic spacer, partial sequen...	Oldenlandia cor...	880	880	100%	0.0	99.79%	853	HQ148875.1

Lineage (full): [cellular organisms](#); [Eukaryota](#); [Viridiplantae](#); [Streptophyta](#); [Streptophytina](#); [Embryophyta](#); [Tracheophyta](#); [Euphyllophyta](#); [Spermatophyta](#); [Magnoliopsida](#); [Mesangiospermae](#); [eudicots](#); [Gunneridae](#); [Pentapetalae](#); [asterids](#); [Lamiids](#); [Gentianales](#); [Rubiaceae](#); [Rubiaceae](#); [Rubiaceae](#); [Spermacoaceae](#); [Hedyotis-Oldenlandia complex](#); [Oldenlandia](#)

[Oldenlandia corymbosa](#) Click on organism name to get more information.

- [Oldenlandia corymbosa var. corymbosa](#)
- [Oldenlandia corymbosa var. tereticaulis](#)

Disclaimer: The NCBI taxonomy database is not an authoritative source for nomenclature or classification - please consult the relevant scientific literature for the most reliable information.

Reference: How to cite this resource - [Schoch CL, et al. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. Database \(Oxford\). 2020; baad062. PubMed: 32761142. PMC: PMC7408187.](#)

Hình 3.7. Kết quả so sánh với cặp môi trnL với các trình tự trên ngân hàng Genbank

Kết quả cho thấy loài cây Bạch hoa xà thiệt thảo thu thập được thuộc loài *Oldenlandia corymbosa* (Lưỡi răn trắng) với độ tương đồng 100% (Bảng 3.3).

Kết quả xác định và phân tích trình tự gen ITS

Các đoạn DNA sau khi được nhân gen bằng phản ứng PCR được tinh sạch và đọc trình tự tại phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen. Trình tự được xác định trên máy đọc trình tự tự động theo nguyên lý của Sanger. Sau khi tiến hành phân tích trình tự bằng phần mềm Bioedit được trình tự như sau:

TTGATATGCTTAAACTCAGCGGGTAGTCCCGCCTGACCTGGG
 GTCATAGTCGAGGGCCTCGAGAGGCTCTAGGGTCTTTGAGCACGC
 CCCGCGTCGGCAAGAGCCACGGCTTCGATCGGGATGAAGTTTTCA
 ACCACCACTAGTCGTGACGTCTCCGAACGGAGGACTCGAATTTAG
 GCCGGCCGCGCTGCCAGGAGACACGGGAGGCCAACTCCGTCACC
 CCGCGCTTCGCATTGCGAGGGGGGTGGCGACGATGCGTGACGCCC
 AGGCAGGCGTGCCCTCAGCCAAATGGCTTCGGGCGCAACTTGCGT
 TCAAAAACCTCGATGGTTCACGGGATTCTGCAATTCACACCAAGTAT
 CGCATTTTCGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCTAGATATCCGT
 TGCCGAGAGTCGTATTGGTTATACGATTCAGACACGTCACACCCGC
 CCAACGGAAACCGCCGGGGGATGCGGACGATCCTTTTGTGTAGTC
 CTTGGCGCTTTCCGCGCCGGAAGTTTTGTTGGGGGTGCGGGGCGACC
 GCCGGACGGGAGTCCGTCCGT

Sau khi giải trình tự, việc định danh loài đã được tiến hành bằng cách blast trên ngân hàng Genbank (Hình 3.8).

The screenshot displays the 'Sequences producing significant alignments' section of a BLAST search. It includes a table with columns for Description, Scientific Name, Max Score, Total Score, Query Cover, E value, Per. Ident, Acc. Len, and Accession. The results list various Oldenlandia corymbosa sequences with high similarity scores and low E values.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Oldenlandia corymbosa voucher TuTY1444 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal R...	Oldenlandia cor...	1014	1014	100%	0.0	99.29%	596	MH768313.1
Oldenlandia corymbosa isolate leaves small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcrib...	Oldenlandia cor...	1014	1014	100%	0.0	99.29%	663	MZ505397.1
Hedyotis corymbosa 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosom...	Oldenlandia cor...	1014	1014	100%	0.0	99.29%	828	JQ730816.1
Oldenlandia corymbosa voucher TuTY2059 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal R...	Oldenlandia cor...	1009	1009	100%	0.0	99.11%	614	MH768314.1
Oldenlandia corymbosa var. corymbosa genome assembly, chromosome_9	Oldenlandia cor...	1009	4013	100%	0.0	99.11%	17871757	OX459126.1
Oldenlandia corymbosa isolate ST-L 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer ...	Oldenlandia cor...	1009	1009	100%	0.0	99.11%	944	JF837603.1
Oldenlandia corymbosa ITS1, 5.8S rRNA gene and ITS2, specimen voucher Andersson 2260 (GB)	Oldenlandia cor...	1009	1009	100%	0.0	99.11%	781	AM939500.1
Oldenlandia diffusa isolate LT-L 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1_5...	Oldenlandia diff...	1007	1007	99%	0.0	99.11%	1174	JF837601.1
Oldenlandia corymbosa voucher Oldenlandia corymbosa ITS1 Forward internal transcribed spacer 1, partia...	Oldenlandia cor...	1005	1005	99%	0.0	99.11%	587	MT476886.1
Oldenlandia corymbosa voucher NSW:KL Gibbons 124 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: ...	Oldenlandia cor...	1003	1003	100%	0.0	98.93%	695	MN091684.1
Oldenlandia corymbosa isolate ST-7 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer ...	Oldenlandia cor...	1003	1003	100%	0.0	98.93%	925	JF837604.1
Oldenlandia corymbosa isolate DS13 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer ...	Oldenlandia cor...	998	998	98%	0.0	99.28%	669	HQ148840.1
Oldenlandia corymbosa isolate MA24 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer ...	Oldenlandia cor...	998	998	98%	0.0	99.28%	669	HQ148801.1
Oldenlandia corymbosa isolate ST-2 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA ge...	Oldenlandia cor...	998	998	100%	0.0	98.75%	659	JF837606.1

Lineage (full): cellular organisms; Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Streptophytina; Embryophyta; Tracheophyta; Euphyllophyta; Spermatophyta; Magnoliopsida; Mesangiospermae; eudicotyledons; Gunneridae; Pentapetales; asterids; Lamiales; Gentianales; Rubiaceae; Rubioideae; Spermaceae; Hedyotis-Oldenlandia complex; Oldenlandia

- Oldenlandia corymbosa Click on organism name to get more information.
 - Oldenlandia corymbosa var. corymbosa
 - Oldenlandia corymbosa var. tereticaulis

Disclaimer: The NCBI taxonomy database is not an authoritative source for nomenclature or classification - please consult the relevant scientific literature for the most reliable information.

Reference: How to cite this resource - *Schoch CL, et al. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. Database (Oxford). 2020; baal062. PubMed: 32761142 PMC: PMC7408187.*

Hình 3.8. Kết quả so sánh với cặp mỗi ITS với các trình tự trên ngân hàng Genbank

Kết quả cho thấy loài cây Bạch hoa xà thiệt thảo thu thập được thuộc loài *Oldenlandia corymbosa* (Lưỡi rắn trắng) với độ tương đồng 99.29% (Bảng 3.3).

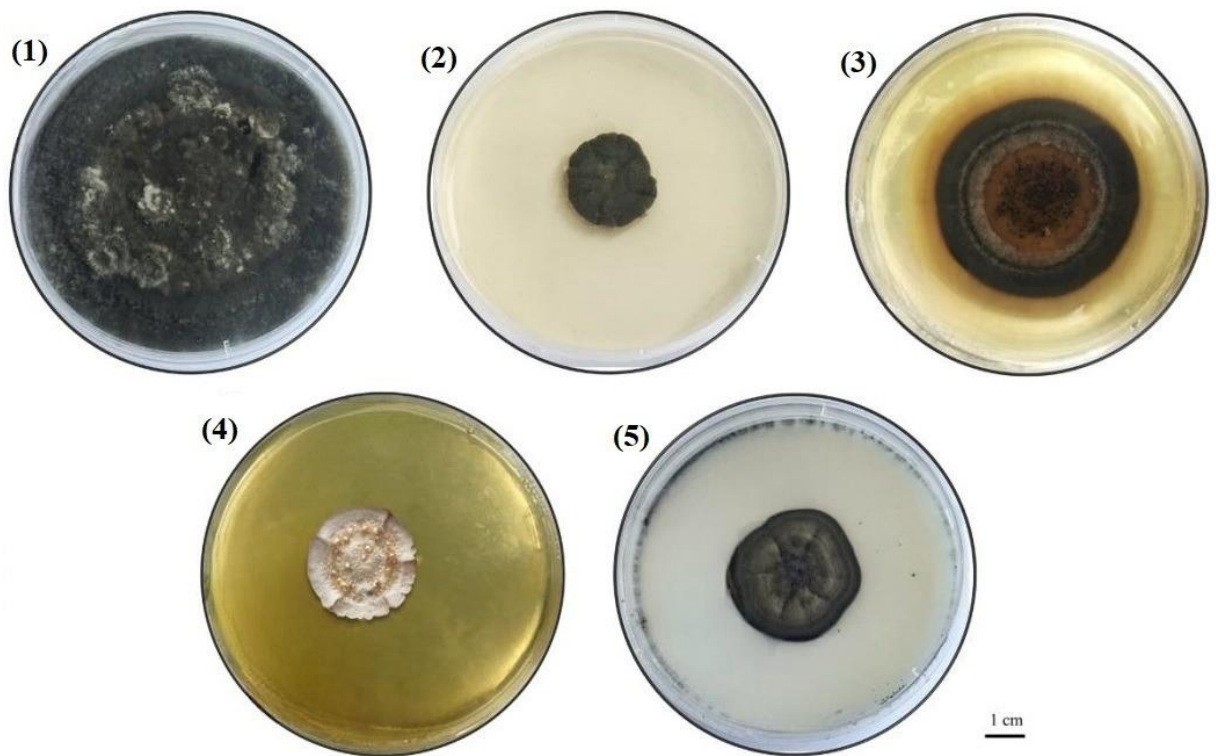
Bảng 3.3. Xác định loài cây dược liệu thu thập được

STT	Cây	Gen	Loài	Tương đồng (%)
1	Dừa cạn	ITS	<i>Catharanthus roseus</i>	99,73
		trnL	<i>Catharanthus roseus</i>	100
2	Bạch hoa xà thiệt thảo	RbcL	<i>Oldenlandia corymbosa</i>	100
		trnL	<i>Oldenlandia corymbosa</i>	100
		ITS	<i>Oldenlandia corymbosa</i>	99,29

3.1.3. Phân lập nấm nội sinh từ mẫu cây dược liệu

Tổng cộng nhóm nghiên cứu đã phân lập được 5 chủng nấm nội sinh với hình thái khác nhau được phân lập từ mẫu cây dược liệu đã thu thập được (Hình 3.9). Trong đó có 4 chủng nấm nội sinh đã phân lập được từ cây Dừa cạn *Catharanthus roseus* (4 khuẩn lạc) thu thập từ Đan Phượng (Hà Nội) và Phú Diễn (Hà Nội), có 1 chủng nấm nội sinh đã phân lập được từ mẫu cây Bạch hoa xà thiệt thảo *Oldenlandia corymbosa* (1 khuẩn lạc) thu thập từ Việt Hòa - Hải Dương.

Các chủng nấm phân lập được đặt tên như sau: DP1, PD2, HP-L1, PT-T12 và BR2 (Hình 3.9).



Hình 3.9. Hình thái của nấm nội sinh được phân lập từ cây Dừa cạn và cây Bạch hoa xà thiệt thảo.

Trong đó:

Các chủng nấm (1) DP1, (2) PD2, (3) HP-L1 và (4) PT-T12 được phân lập từ cây Dừa cạn thu thập từ Đan Phượng và Phú Diễn, Hà Nội.

Chủng nấm (5) BR2 được phân lập từ cây Bạch hoa xà thiệt thảo thu thập tại Hải Dương.

Đặc điểm hình thái của nấm nội sinh đã phân lập được

Đặc điểm hình thái của 5 chủng nấm nội sinh thu thập được như sau (Bảng 3.4).

Bảng 3.4. Đặc điểm hình thái của 5 loài nấm nội sinh

STT	Chủng nấm	Đường kính khuẩn lạc	Màu khuẩn lạc	Hình thái khuẩn lạc
1	DP1	10 cm	Màu xám đục đến màu đen	Bề mặt phẳng và nhô cao và mạng lưới sợi nấm giống như bông
2	PD2	2 - 3 cm	Xám ô liu	Khuẩn lạc có hình dạng không đều, mép không gợn sóng, nếp nhăn và bề mặt nhô cao và mạng lưới sợi nấm mịn như nhung
3	HP-L1	7-8 cm	Xanh đen và xám	Hình tròn lớn, bề mặt dạng miệng núi lửa, và mạng lưới sợi nấm giống như bông
4	PT-T12	3 - 4 cm	Màu trắng và vàng	Khuẩn lạc không đều với mép không gợn sóng, nếp nhăn và bề mặt nổi lên và mạng lưới sợi giống như nhung
5	BR2	3 - 5 cm	Xám ô liu và xanh đen	Hình dạng tròn với mép không gợn sóng, bề mặt nhăn và nhô cao và mạng lưới sợi nấm mịn như nhung

Chủng nấm DP1 có bề mặt phẳng và nhô cao, màu từ xám đục đến đen và mạng lưới sợi giống như bông (Hình 3.9-1). Chúng cũng cho thấy tốc độ tăng trưởng nhanh hơn các nhóm khác; bề mặt của đĩa môi trường (đường kính khoảng 10 cm) được bao phủ hoàn toàn trong 6-7 ngày sau khi cấy.

Chủng nấm PD2 có khuẩn lạc hình dạng không đều, nhỏ (2 - 3 cm), mép không gợn sóng, nếp nhăn và bề mặt nhô cao, màu xám ô liu và mạng lưới sợi nấm mịn giống nhung (Hình 3.9-2).

Chủng nấm HP-L1 có khuẩn lạc hình tròn lớn (đường kính 7 - 8 cm), bề mặt hình trứng có màu xanh đen và xám, và mạng lưới sợi nấm mịn giống như bông (Hình 3.9-3).

Chủng nấm PT-T12 có hình thái khác với các chủng khác. Các đặc điểm hình thái của nấm nội sinh PT-T12 bao gồm màu trắng và vàng, khuẩn lạc không đều (đường kính 3-4 cm) với mép không gợn sóng, bề mặt nhăn và nổi lên và mạng lưới sợi nấm mịn giống như nhung (Hình 3.9-4).

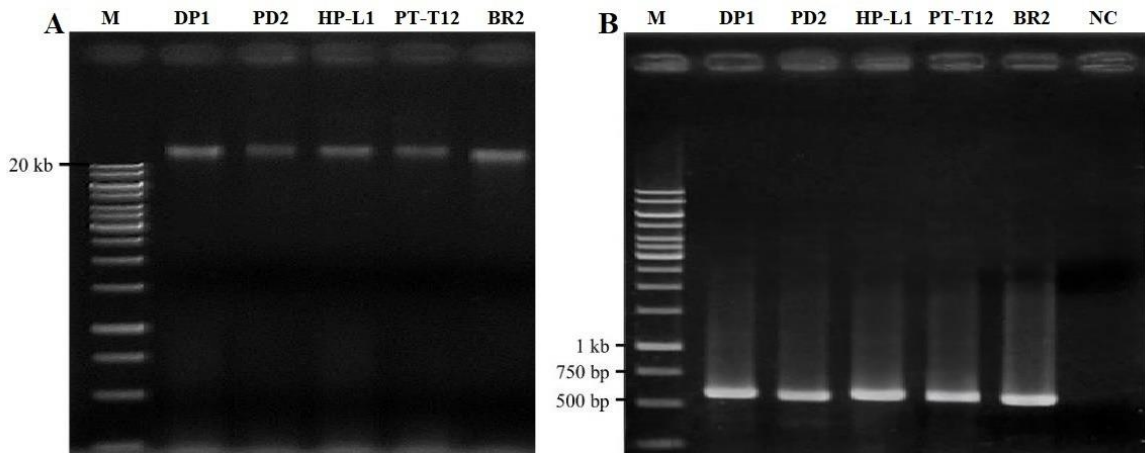
Chủng nấm BR2 có hình thái giống với các khuẩn lạc chủng PD2, khuẩn lạc hình tròn (đường kính 3-5 cm) với mép không gợn sóng, bề mặt nhăn và nhô cao, màu xám ô liu và màu xanh đen, và mạng lưới sợi nấm mịn giống như nhung (Hình 3.9-5).

Sau khi quan sát hình thái, các chủng nấm được xác định loài bằng cách giải trình tự ITS.

3.2. CÂY PHÁT SINH CHŨNG LOẠI VI SINH VẬT

3.2.1. Tách DNA tổng số

Sau khi phân lập nấm nội sinh, 5 chủng được phân loại phân tử dựa trên phân tích trình tự vùng ITS. Trước khi khuếch đại các vùng ITS, chất lượng của DNA tổng số chiết xuất được đánh giá bằng điện di trên gel. DNA tổng số của 5 chủng nấm đều có vạch rõ ràng không đứt gãy, chứng tỏ DNA có chất lượng tốt đủ điều kiện cho thí nghiệm tiếp theo (Hình 3.10A).



Hình 3.10. DNA tổng số và sản phẩm PCR khuếch đại vùng ITS của các chủng nấm nội sinh trong cây Dừa cạn và cây Bạch hoa xà thiệt thảo.

Trong đó:

(A) Điện di đồ sản phẩm DNA tổng số từ DP1, PD2, HP-L1, PT-T12 và BR2.

(B) Sản phẩm PCR khuếch đại vùng ITS của DP1, PD2, HP-L1, PT-T12 và BR2

M: Marker - GeneRuler 1 kb DNA Ladder SM0311, Thermo Scientific.

NC: đối chứng âm.

DP1, PD2, HP-L1, PT-T12, BR2: chủng nấm nội sinh phân lập được.

Các mẫu DNA sau đó được sử dụng làm khuôn để khuếch đại vùng ITS với kích thước khoảng 550bp, kết quả được chỉ ra ở Hình 3.10B rằng 5 chủng nấm đã được xác định trình tự và dữ liệu giải trình tự thu được sau đó được xử lý dựa trên các trình tự tham chiếu trên cơ sở dữ liệu GenBank để xác định loài.

3.2.2. Xác định các loài nấm bằng giải trình tự ITS

Kết quả giải trình tự vùng ITS của 5 chủng nấm nội sinh được kiểm tra lại để loại bỏ các nucleotide có chất lượng thấp ở hai đầu. Cuối cùng chúng tôi thu được trình tự vùng ITS của chủng DP1 dài 554 bp, chủng PD2 dài 537 bp, chủng HP-L1 dài 557bp, chủng PT-T12 dài 559bp và chủng BR2 dài 537bp.

Sau khi tiến hành phân tích trình tự vùng ITS bằng phần mềm Bio-edit, kết quả thu được các trình tự như sau:

Chủng DP1

TTCCGTAGGGGTGACCTGCGGAGGGATCATTACAAGTGACCC
 CGGTTTACCACCGGGATGTTTATAACCCTTTGTTGTCCGACTCTGTT
 GCCTCCGGGGCGACCCTGCCTTCGGGCGGGGGCTCCGGGTGGACA
 CTTCAAACCTTTGCGTAACTTTGCAGTCTGAGTAAACTTAATTAAT
 AAATTA AAACTTTTAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGA
 AGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAG
 TGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCG
 GGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCACTCAAGCCTCGCTT
 GGTATTGGGCAACGCGGTCCGCCGCGTGCCTCAAATCGACCGGCT
 GGGTCTTCTGTCCCCTAAGCGTTGTGGAAACTATTCGCTAAAGGGT
 GCTCGGGAGGCTACGCCGTA AAAACAACCCCATTTCTAAGGTTGAC
 CTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAAAAAG
 CGGGAGGAAA

Chủng PD2

GTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACAAGTTGACCCCGG
 CCCTCGGGCCGGGATGTTTACAACCCTTTGTTGTCCGACTCTGTTG
 CCTCCGGGGCGACCCTGCCTCCGGGCGGGGGCCCCGGGTGGACAT
 TTCAAACCTTTGCGTAACTTTGCAGTCTGAGTAAATTTAATTAATA
 AATTA AAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAA
 GAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT
 GAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGG
 GGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCACTCAAGCCTCGCTTG
 GTATTGGGCGACGCGGTCCGCCGCGCGCCTCAAATCGACCGGCTG
 GGTCTTTCGTCCCCTCAGCGTTGTGGAAACTATTCGCTAAAGGGTG
 CCGCGGGAGGCCACGCCGTA AAAACAACCCCATTTCTAAGGTTGAC
 CTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATC

Chủng HP-L1

TAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATC
 GTAGGGGCCTCGCCCCCTTCGAGATAGCACCCCTTTGTTTATGAGCA
 CCTCTCGTTTCCTCGGCAGGCTCGCCTGCCAACGGGGACCCACCAC
 AAACCCATTGTAGTACAAGAAGTACACGTCTGAACAAAACAAAAC
 AAATAATTTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCG
 ATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAAT
 TCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTAT
 TCCTTAGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCTA
 GCTTGGTGTGGGGCGTCTGTCCCGCCTCCGCGCGCCTGGACTCGCC
 TCAAAGCATTGGCGGCCGGTTCCAGCAGGCCACGAGCGCAGCA
 GAGCAAGCGCTGAAGTGGCTGCGGGTCGGCGCACCATGAGCCCCC
 CCACACCAGAATTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGA
 ACTTAAGCATATCA

Chủng PT-T12

GGGGGAACCGAGTTAAACTCCCAACCCTTTGTGAACCTTACC
 ATATTGTTGCTTCGGCGGGACCGCCCCGGCGCCTTCGGGCCCCGGAA
 CCAGGCGCCCCGCCGGAGGCCCCAAACTCTTATGTCTTTAGTGGTTT
 TCTCCTCTGAGTGACACATAAACAATAAATAAAAACCTTTCAACA
 ACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGC
 GATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTG
 AACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCGA
 GCGTCATTTCAACCCTCAGGCCCCAGTGCCTGGTGTGGGGATCG
 GCCCAGCCTTCCTGTAAGGCCGCCGGCCCCGAAATCTAGTGGCGG
 TCTCGCTGTAGTCCTCCTCTGCGTAGTAGCACAACCTCGCAGTTGG
 AACGCGGCGGTGGCCATGCCGTTAAACACCCCCTTCTGAAAGTT
 GACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAA
 TAAGCCGGAGAGAAAC

Chủng BR2

GTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACAAGTTGACCCCGG
 CCCTCGGGCCGGGATGTTCAACAACCCTTTGTTGTCCGACTCTGTTG
 CCTCCGGGGCGACCCTGCCTCCGGGCGGGGGCCCCGGGTGGACAT
 TTCAAACCTTTGCGTAACTTTGCAGTCTGAGTAAATTTAATTAATA
 AATTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAA
 GAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT
 GAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGG
 GGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCACTCAAGCCTCGCTTG
 GTATTGGGCGACGCGGTCCGCCGCGCGCCTCAAATCGACCGGCTG
 GGTCTTTCGTCCCCTCAGCGTTGTGGAACTATTCGCTAAAGGGTG
 CCGCGGGAGGCCACGCCGTAAAACAACCCCATTTCTAAGGTTGAC
 CTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATC

3.2.3. Cây phát sinh chủng loại

Sau khi được giải trình tự, các đoạn gen ITS này được blast trên ngân hàng Genbank để định danh loài. Kết quả thu được theo Bảng 3.5. Cụ thể như sau:

Sequences producing significant alignments									
Download ▾ Select columns ▾ Show 100 ▾ ?									
<input checked="" type="checkbox"/> select all 100 sequences selected GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer 									
	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Cladosporium perangustum isolate CMAA1835 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal trans...	Cladosporium pe...	329	329	98%	8e-86	99.45%	574	OM322826.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Cladosporium sp. isolate TJU JUN52 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, c...	Cladosporium sp.	329	329	98%	8e-86	99.45%	517	OM236722.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Cladosporium colombiae strain A38 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spac...	Cladosporium col...	329	329	98%	8e-86	99.45%	554	OK510267.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Cladosporium sp. isolate NTOU 4257 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spa...	Cladosporium sp.	329	329	98%	8e-86	99.45%	552	MZ422949.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Cladosporium cladosporioides isolate TJU APR28 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal ...	Cladosporium cla...	329	329	98%	8e-86	99.45%	529	OM237256.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Cladosporium cladosporioides isolate TJU SEP174 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal ...	Cladosporium cla...	329	329	98%	8e-86	99.45%	531	OM237016.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Cladosporium sp. isolate TJU SEP167 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene a...	Cladosporium sp.	329	329	98%	8e-86	99.45%	528	OM237009.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Cladosporium cladosporioides isolate TJU SEP147 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal ...	Cladosporium cla...	329	329	98%	8e-86	99.45%	533	OM236991.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Cladosporium cladosporioides isolate TJU SEP142 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal ...	Cladosporium cla...	329	329	98%	8e-86	99.45%	522	OM236986.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Ectophoma multirostrata isolate TJU SEP132 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA ...	Ectophoma multir...	329	329	98%	8e-86	99.45%	524	OM236976.1

Cladosporium colombiae

Taxonomy ID: 643907 (for references in articles please use NCBI:taxid:643907)

current name

Cladosporium colombiae K. Schub. & Crous, 2009
 culture from holotype of *Cladosporium colombiae*: [CBS:274.80B](#)
 includes: *Cladosporium* sp. JZG-2009b

NCBI BLAST name: ascomycete fungi

Rank: species

Genetic code: [Translation table 1 \(Standard\)](#)

Mitochondrial genetic code: [Translation table 4 \(Mold Mitochondrial; Protozoan Mitochondrial; Coelenterate Mitochondrial; Mycoplasma; Spiroplasma\)](#)

[Lineage \(full\)](#)

[cellular organisms](#); [Eukaryota](#); [Opisthokonta](#); [Fungi](#); [Dikarya](#); [Ascomycota](#); [saccharomyceta](#); [Pezizomycotina](#); [leotiomyceta](#); [dothideomyceta](#); [Dothideomycetes](#); [Dothideomycetidae](#); [Cladosporiales](#); [Cladosporiaceae](#); [Cladosporium](#)

Entrez records		
Database name	Direct links	Links from type
Nucleotide	66	7
Protein	2	-
Genome	1	-
Popset	12	-
PubMed Central	12	-
SRA Experiments	2	-
Identical Protein Groups	2	-
BioProject	2	-
BioSample	6	-
Assembly	3	-
Taxonomy	1	-

Comments and References:

Schubert et al. (2009)

Schubert K, Greslebin A, Groenewald JZ, Crous PW. 2009. New foliicolous species of *Cladosporium* from South America. *Persoonia*. 22: 111-122.

Hình 3.11. Kết quả so sánh với các trình tự trên ngân hàng Genbank (chủng DPI)

Kết quả so sánh với các trình tự tham khảo trên ngân hàng GenBank (BLASTN) cho thấy chủng DPI có độ tương đồng cao nhất là 99,45% với chủng *Cladosporium colombiae* CBS 274.80B (Hình 3.11 và Bảng 3.5).

Sequences producing significant alignments Download ▾ Select columns ▾ Show 100 ▾ ?

select all 100 sequences selected [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [MSA Viewer](#)

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Cladosporium sp. 1 FMAF-2011 strain agrFF918 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed...	Cladosporium sp...	350	350	97%	7e-92	99.48%	467	HQ228334.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cladosporium sp. MV-2018B isolate MLT-27 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcri...	Cladosporium sp...	348	348	95%	3e-91	100.00%	667	MT636978.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cladosporium halotolerans small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8...	Cladosporium ha...	348	348	95%	3e-91	100.00%	537	MT635287.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cladosporium halotolerans isolate LA-18 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed...	Cladosporium ha...	348	348	95%	3e-91	100.00%	549	MT626047.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cladosporium halotolerans isolate DE1 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene...	Cladosporium ha...	348	348	95%	3e-91	100.00%	508	MK140692.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cladosporium halotolerans isolate GXIMD_02502 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal...	Cladosporium ha...	348	348	95%	3e-91	100.00%	530	MT530324.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cladosporium halotolerans clone EF_526 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribe...	Cladosporium ha...	348	348	95%	3e-91	100.00%	563	MT529175.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cladosporium halotolerans isolate ENDO-PINE683-BOTTOMA internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8...	Cladosporium ha...	348	348	95%	3e-91	100.00%	547	MK762600.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cladosporium halotolerans isolate ENDO-PINE676-BOTTOMD internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5...	Cladosporium ha...	348	348	95%	3e-91	100.00%	541	MK762599.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cladosporium halotolerans isolate B2130A small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcrib...	Cladosporium ha...	348	348	95%	3e-91	100.00%	485	MT320762.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cladosporium sp. 1 MCF-2020 isolate UFMGCB14527 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribos...	Cladosporium sp...	348	348	95%	3e-91	100.00%	473	MT298153.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cladosporium halotolerans strain LSU0254 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcrib...	Cladosporium ha...	348	348	95%	3e-91	100.00%	516	MT000389.1

Cladosporium halotolerans

Taxonomy ID: 1052096 (for references in articles please use NCBI:taxid:1052096)

current name

Cladosporium halotolerans Zalar, de Hoog & Gunde-Cim., 2007 Zalar, de Hoog & Gunde-Cimerman 2007
culture from holotype of *Cladosporium halotolerans* Zalar, de Hoog & Gunde-Cim., 2007: [CBS:119416](#), EXF:572, EX:F:572
includes: [Cladosporium sp. EXF228](#)

NCBI BLAST name: ascomycete fungi

Rank: species

Genetic code: [Translation table 1 \(Standard\)](#)

Mitochondrial genetic code: [Translation table 4 \(Mold Mitochondrial; Protozoan Mitochondrial; Coelenterate Mitochondrial; Mycoplasma; Spiroplasma\)](#)

Lineage (full)

[cellular organisms](#); [Eukaryota](#); [Opisthokonta](#); [Fungi](#); [Dikarya](#); [Ascomycota](#); [saccharomyceta](#); [Pezizomycotina](#); [leotiomyceta](#); [dothideomyceta](#); [Dothideomycetes](#); [Dothideomycetidae](#); [Cladosporiales](#); [Cladosporiaceae](#); [Cladosporium](#)

Entrez records		
Database name	Direct links	Links from type
Nucleotide	969	11
Protein	432	-
Popset	77	-
PubMed Central	92	-
Identical Protein Groups	88	-
BioProject	1	-
BioSample	1	-
PubChem BioAssay	2	-
Taxonomy	1	-

Comments and References:

[Zalar et al. \(2007\)](#)

Zalar P, de Hoog GS, Schroers H-J, Crous PW, Groenewald JZ, Gunde-Cimerman N. 2007. Phylogeny and ecology of the ubiquitous saprobe *Cladosporium sphaerospermum*, with descriptions of seven new species from hypersaline environments. *Stud Mycol.* 58: 157-183.

Hình 3.12. Kết quả so sánh với các trình tự trên ngân hàng Genbank (chủng PD2)

Kết quả so sánh với các trình tự tham khảo trên ngân hàng GenBank (BLASTN) cho thấy chủng PD2 tương đồng với chủng *Cladosporium halotolerans* CBS 119416 với độ tương đồng 100% (Hình 3.12 và Bảng 3.5).

Sequences producing significant alignments Download ▾ Select columns ▾ Show 100 ▾ ?

select all 100 sequences selected [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [MSA Viewer](#)

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Corynespora cassiicola isolate CICR-NCS small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed...	Corynespora cas...	865	865	100%	0.0	100.00%	561	MN945374.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Corynespora cassiicola isolate W321 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed sp...	Corynespora cas...	865	865	100%	0.0	100.00%	514	MK247303.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Corynespora cassiicola culture CBS:127095 strain CBS 127095 small subunit ribosomal RNA gene, partial seque...	Corynespora cas...	865	865	100%	0.0	100.00%	667	MH864416.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Corynespora cassiicola culture CBS:161.60 strain CBS 161.60 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequen...	Corynespora cas...	865	865	100%	0.0	100.00%	557	MH857942.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Corynespora cassiicola isolate SD18-8 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed s...	Corynespora cas...	865	865	100%	0.0	100.00%	567	MK294545.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Corynespora cassiicola isolate SD18-5 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed s...	Corynespora cas...	865	865	100%	0.0	100.00%	569	MK294544.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Corynespora cassiicola isolate 04 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed space...	Corynespora cas...	865	865	100%	0.0	100.00%	557	MK333285.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Corynespora cassiicola isolate 03 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed space...	Corynespora cas...	865	865	100%	0.0	100.00%	557	MK333284.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Corynespora cassiicola isolate 01 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed space...	Corynespora cas...	865	865	100%	0.0	100.00%	557	MK333283.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Corynespora cassiicola isolate S121 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spa...	Corynespora cas...	865	865	100%	0.0	100.00%	512	MK304268.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Corynespora cassiicola isolate Quangbinh 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer...	Corynespora cas...	865	865	100%	0.0	100.00%	520	MF974870.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Corynespora cassiicola isolate Dongnai3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer...	Corynespora cas...	865	865	100%	0.0	100.00%	520	MF974869.1

Corynespora cassiicola

Taxonomy ID: 59586 (for references in articles please use NCBI:taxid:59586)

current name

Corynespora cassiicola (Berk. & M.A. Curtis) C.T. Wei, 1950

[basionym: *Helminthosporium cassiicola* Berk. & M.A. Curtis, 1869

NCBI BLAST name: **ascomycete fungi**

Rank: species

Genetic code: [Translation table 1 \(Standard\)](#)

Mitochondrial genetic code: [Translation table 4 \(Mold Mitochondrial; Protozoan Mitochondrial; Coelenterate Mitochondrial; Mycoplasma; Spiroplasma\)](#)

Lineage (Full)

[cellular organisms](#); [Eukaryota](#); [Opisthokonta](#); [Fungi](#); [Dikarya](#); [Ascomycota](#); [saccharomycetes](#); [Pezizomycotina](#); [leotiomycetes](#); [dothideomycetes](#); [Dothideomycetes](#); [Pleosporomycetidae](#); [Pleosporales](#); [Corynesporaceae](#); [Corynespora](#)

Entrez records		
Database name	Subtree links	Direct links
Nucleotide	6,447	6,200
Protein	19,860	2,702
Structure	1	1
Genome	1	1
Popset	164	164
PubMed Central	307	307
Gene	44	44
SRA Experiments	96	92
Identical Protein Groups	17,440	216
BioProject	18	13
BioSample	140	137
Assembly	57	55
PubChem BioAssay	7	7
Taxonomy	4	1

Hình 3.13. Kết quả so sánh với các trình tự trên ngân hàng GenBank (chủng HP-L1)

Kết quả so sánh với các trình tự tham khảo trên ngân hàng GenBank (BLASTN) cho thấy chủng HP-L1 tương đồng 100% với chủng *Corynespora cassiicola* (Hình 3.13 và Bảng 3.5).

Sequences producing significant alignments Download ▾ Select columns ▾ Show 100 ▾ ?

select all 100 sequences selected [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [MSA Viewer](#)

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Albifimbria terrestris isolate PAUA112 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene a...	Albifimbria terres...	963	963	100%	0.0	100.00%	559	MT549897.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Albifimbria sp. strain Cef-25 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1...	Albifimbria sp.	963	963	100%	0.0	100.00%	605	MK775969.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Albifimbria terrestris CBS 126186 ITS region, from TYPE material	Albifimbria terres...	963	963	100%	0.0	100.00%	648	NR_153549
<input checked="" type="checkbox"/>	Albifimbria lateralis CBS 117712 ITS region, from TYPE material	Albifimbria lateralis	963	963	100%	0.0	100.00%	648	NR_153548
<input checked="" type="checkbox"/>	Albifimbria terrestris isolate 4 SA internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and i...	Albifimbria terres...	963	963	100%	0.0	100.00%	571	MG679520.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Uncultured fungus clone ZSYN201307-46 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcrib...	uncultured fungus	963	963	100%	0.0	100.00%	618	KX515861.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Albifimbria terrestris strain CBS 127838 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer...	Albifimbria terres...	963	963	100%	0.0	100.00%	701	KU845884.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Albifimbria terrestris strain CBS 126186 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer...	Albifimbria terres...	963	963	100%	0.0	100.00%	701	KU845883.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Albifimbria terrestris strain CBS 109378 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer...	Albifimbria terres...	963	963	100%	0.0	100.00%	904	KU845882.1

Albifimbria terrestris

Taxonomy ID: 1859698 (for references in articles please use NCBI:taxid:1859698)

current name

Albifimbria terrestris L. Lombard & Crous, 2016
culture from holotype of *Albifimbria terrestris*: [CBS:126186](#)

NCBI BLAST name: **ascomycete fungi**

Rank: **species**

Genetic code: [Translation table 1 \(Standard\)](#)

Mitochondrial genetic code: [Translation table 4 \(Mold Mitochondrial\)](#); [Protozoan Mitochondrial](#); [Coelenterate Mitochondrial](#); [Mycoplasma](#); [Spiroplasma](#)

[Lineage \(full\)](#)

[cellular organisms](#); [Eukaryota](#); [Opisthokonta](#); [Fungi](#); [Dikarya](#); [Ascomycota](#); [saccharomyceta](#); [Pezizomycotina](#); [leotiomyceta](#); [sordariomyceta](#); [Sordariomycetes](#); [Hypocreomycetidae](#); [Hypocreales](#); [Stachybotryaceae](#); [Albifimbria](#)

Entrez records		
Database name	Direct links	Links from type
Nucleotide	43	10
Protein	15	-
Popset	12	-
PubMed Central	2	-
Identical Protein Groups	7	-
Taxonomy	1	-

Hình 3.14. Kết quả so sánh với các trình tự trên ngân hàng Gen-bank (chủng PT-T12)

Kết quả so sánh với các trình tự tham khảo trên ngân hàng GenBank (BLASTN) cho thấy chủng PT-T12 có độ tương đồng 100% với chủng *Albifimbria terrestris* CBS 126186 (Hình 3.14 và Bảng 3.5).

Sequences producing significant alignments										Download	Select columns	Show	100	?
<input checked="" type="checkbox"/> select all 100 sequences selected										GenBank	Graphics	Distance tree of results	MSA Viewer	
	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession					
<input checked="" type="checkbox"/>	Cladosporium sp. 1 FMAF-2011 strain agrFF918 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed s...	Cladosporium sp...	344	344	97%	3e-90	98.96%	467	HQ228334.1					
<input checked="" type="checkbox"/>	Cladosporium sp. strain 17BPLE002 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and...	Cladosporium sp...	342	342	95%	1e-89	99.47%	514	MT645909.1					
<input checked="" type="checkbox"/>	Cladosporium sp. MV-2018B isolate MLT-27 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcrib...	Cladosporium sp...	342	342	95%	1e-89	99.47%	667	MT636978.1					
<input checked="" type="checkbox"/>	Cladosporium halotolerans small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8...	Cladosporium hal...	342	342	95%	1e-89	99.47%	537	MT635287.1					
<input checked="" type="checkbox"/>	Cladosporium halotolerans isolate LA-18 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed...	Cladosporium hal...	342	342	95%	1e-89	99.47%	549	MT626047.1					
<input checked="" type="checkbox"/>	Cladosporium halotolerans isolate DE1 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene a...	Cladosporium hal...	342	342	95%	1e-89	99.47%	508	MK140692.1					
<input checked="" type="checkbox"/>	Cladosporium halotolerans isolate GXIMD 02502 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal R...	Cladosporium hal...	342	342	95%	1e-89	99.47%	530	MT530324.1					
<input checked="" type="checkbox"/>	Cladosporium halotolerans clone EF_526 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed...	Cladosporium hal...	342	342	95%	1e-89	99.47%	563	MT529175.1					
<input checked="" type="checkbox"/>	Cladosporium halotolerans isolate ENDO-PINE683-BOTTOMA internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8...	Cladosporium hal...	342	342	95%	1e-89	99.47%	547	MK762600.1					
<input checked="" type="checkbox"/>	Cladosporium halotolerans isolate ENDO-PINE676-BOTTOMD internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8...	Cladosporium hal...	342	342	95%	1e-89	99.47%	541	MK762599.1					
<input checked="" type="checkbox"/>	Cladosporium halotolerans isolate B2130A small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribe...	Cladosporium hal...	342	342	95%	1e-89	99.47%	485	MT320762.1					
<input checked="" type="checkbox"/>	Cladosporium sp. 1 MCF-2020 isolate UFMGCB14527 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S riboso...	Cladosporium sp...	342	342	95%	1e-89	99.47%	473	MT298153.1					
<input checked="" type="checkbox"/>	Cladosporium halotolerans strain LSU0254 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribe...	Cladosporium hal...	342	342	95%	1e-89	99.47%	516	MT000389.1					

Cladosporium halotolerans

Taxonomy ID: 1052096 (for references in articles please use NCBI:txid1052096)

current name

Cladosporium halotolerans Zalar, de Hoog & Gunde-Cim., 2007 Zalar, de Hoog & Gunde-Cimerman 2007
culture from holotype of *Cladosporium halotolerans* Zalar, de Hoog & Gunde-Cim., 2007: [CBS:119416](#), EXF:572, EX:F:572
includes: *Cladosporium* sp. EXF228

NCBI BLAST name: ascomycete fungi

Rank: species

Genetic code: [Translation table 1 \(Standard\)](#)


Mitochondrial genetic code: [Translation table 4 \(Mold Mitochondrial\)](#); [Protozoan Mitochondrial](#); [Coelenterate Mitochondrial](#); [Mycoplasma](#); [Spiroplasma](#)

[Lineage \(full\)](#)

[cellular organisms](#); [Eukaryota](#); [Opisthokonta](#); [Fungi](#); [Dikarya](#); [Ascomycota](#); [saccharomyceta](#); [Pezizomycotina](#); [leotiomyceta](#); [dothideomyceta](#); [Dothideomycetes](#); [Dothideomycetidae](#); [Cladosporiales](#); [Cladosporiaceae](#); [Cladosporium](#)

Comments and References:

[Zalar et al. \(2007\)](#)

 Zalar P, de Hoog GS, Schroers H-J, Crous PW, Groenewald JZ, Gunde-Cimerman N. 2007. Phylogeny and ecology of the ubiquitous saprobe *Cladosporium sphaerospermum*, with descriptions of seven new species from hypersaline environments. *Stud Mycol.* 58: 157-183.

Entrez records		
Database name	Direct links	Links from type
Nucleotide	969	11
Protein	432	-
Popset	77	-
PubMed Central	92	-
Identical Protein Groups	88	-
BioProject	1	-
BioSample	1	-
PubChem BioAssay	2	-
Taxonomy	1	-

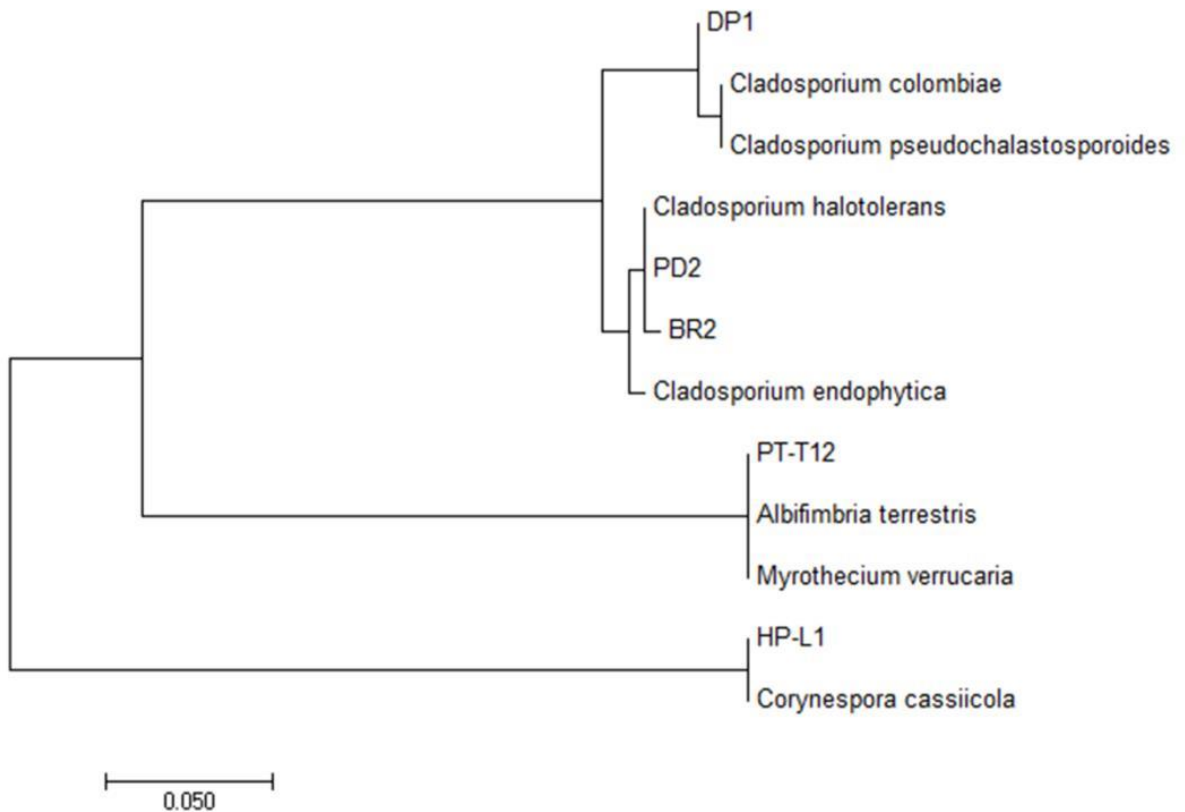
Hình 3.15. Kết quả so sánh với các trình tự trên ngân hàng Gen-bank (chủng BR2)

Kết quả so sánh với các trình tự tham khảo trên ngân hàng GenBank (BLASTN) cho thấy chủng BR2 tương đồng với chủng *Cladosporium halotolerans* CBS 119416 với độ tương đồng 99.47% (Hình 3.15 và Bảng 3.5).

Bảng 3.5: Xác định các loài nấm được phân lập từ cây Dừa cạn và Bạch hoa xà thiệt thảo

STT	Cây	Mô	Chủng	Sequence length (bp)	Loài và Genbank ID	Tương đồng (%)
1	Dừa cạn	Lá	DP1	554	<i>Cladosporium colombiae</i> (CBS 274.80B)	99.45
2	Dừa cạn	Rễ	PD2	537	<i>Cladosporium halotolerans</i> (CBS 119416)	100
3	Dừa cạn	Lá	HP-L1	557	<i>Corynespora cassicola</i>	100
4	Dừa cạn	Thân	PT-T12	559	<i>Albifimbria terrestris</i> (CBS 126186)	100
5	Bạch hoa xà thiệt thảo	Rễ	BR2	537	<i>Cladosporium halotolerans</i> (CBS 119416)	99.47

Dựa trên dữ liệu thu được từ phân tích BLASTN, cây phát sinh loài đã được xây dựng bằng cách sử dụng phương pháp phân tích maximum likelihood. Chỉ số ở gốc các nhánh với giá trị bootstrap lấy mẫu lặp lại 1000 lần (%). Mức độ tin cậy được đánh giá theo giá trị maximum likelihood bootstrap như sau: mức độ tin cậy cao: >85%; mức độ tin cậy trung bình: 65-85%; mức độ tin cậy thấp: <65% (Nguyễn Đức Anh & Nguyễn Giang Sơn, 2016). Phù hợp với kết quả giải trình tự ITS, cây phát sinh loài cho thấy rõ ràng 5 chủng nấm phân lập và 7 chủng tham chiếu được chia thành 4 nhánh (Hình 3.16).



Hình 3.16. Cây phát sinh loài của các chủng nấm nội sinh phân lập được

Các chủng PD2 và BR2 hình thành một nhánh với hai chủng tham chiếu *C. halotolerans* và *C. endophytica*. Hai chủng có liên quan chặt chẽ hơn với *C. halotolerans* với giá trị tương đồng tương ứng là 100% và 99,4%. Mối quan hệ này cũng được phản ánh bởi sự giống nhau về mặt hình thái học được quan sát từ hai chủng với *C. halotolerans*. Ngoài ra, sự sinh trưởng và hình thái tản nấm của hai chủng PD2 và BR2 giống với tản nấm của loài *C. halotolerans* trong nghiên cứu Yang & cộng sự (2016). Trong nghiên cứu này, tản nấm của loài *C. halotolerans* cũng sinh trưởng chậm và có màu xám ô liu sau 12 ngày nuôi cấy.

Chủng DP1 hình thành một nhánh riêng biệt với *C. colombiae* và *C. pseudochalastosporoides*. Dựa trên quan sát hình thái học trong báo cáo của Schubert và cộng sự năm 2009, chủng DP1 được xác định là *C. colombiae*. Khuẩn lạc phát triển trên môi trường thạch PDA có màu xám ô liu, màu trắng hoặc xám đục về phía rìa khuẩn lạc, đi ngược vào trung tâm

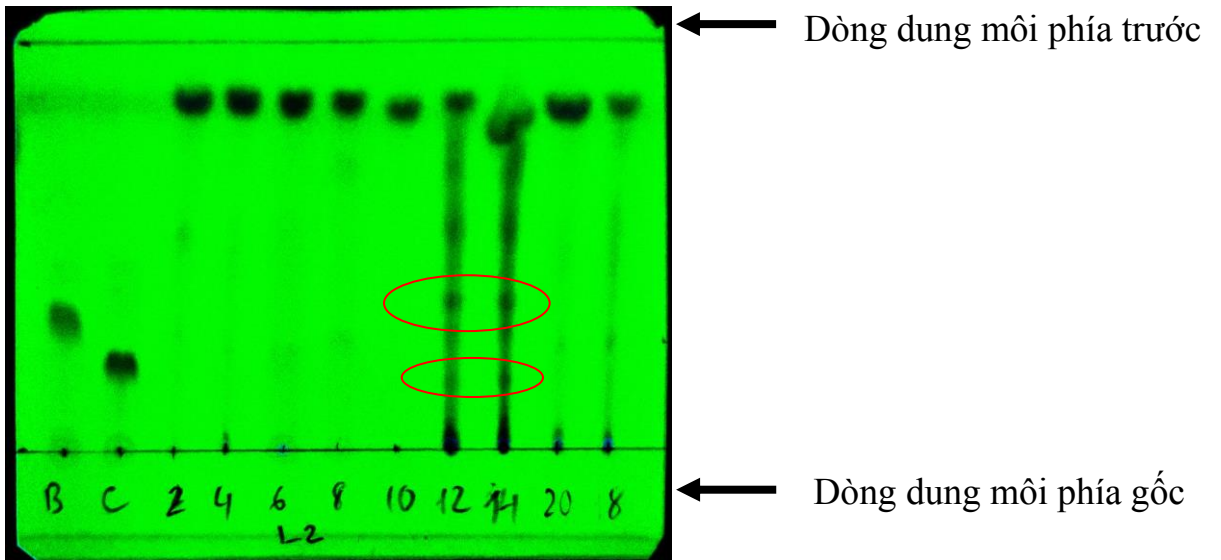
khuẩn lạc có màu xám sắt, mịn như lông tơ, nhưng đến lông nỉ, phần rìa không có màu đến màu trắng, có thể có lông tơ mịn, chất tiết ra rất ít và nhỏ nhưng dễ thấy, hình thành nhiều bào tử [56].

Tương tự, quan sát hình thái đã được thực hiện với chủng nội sinh PT-T12, chủng này được xác định là *Albifimbria terrestris*. Phù hợp với phân tích trình tự ITS, chủng HP-L1 hình thành một nhánh riêng biệt với *Corynespora cassiicola*.

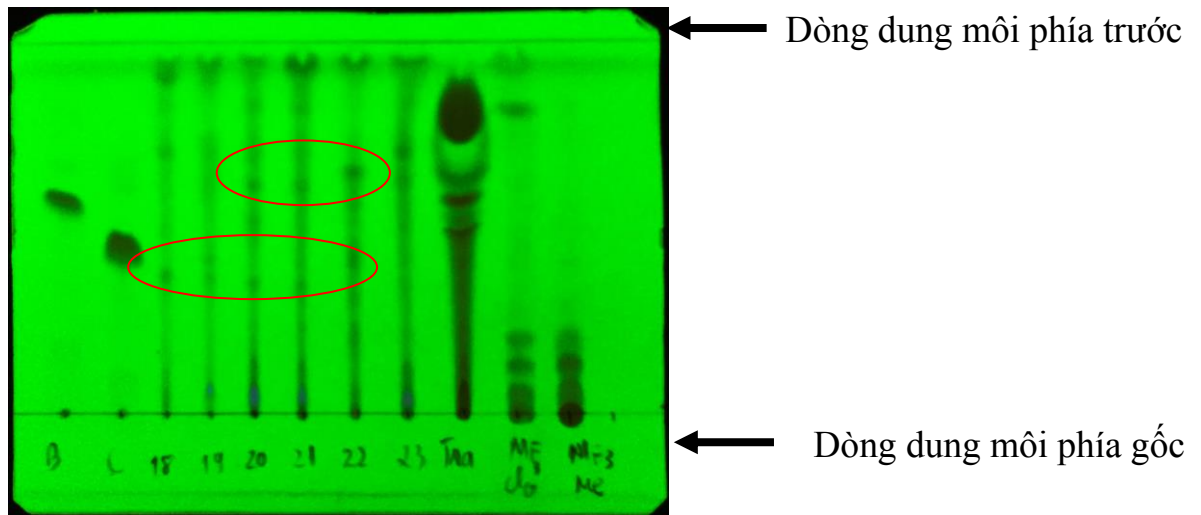
3.2.4. Xác định sơ bộ các chủng nấm phân lập được có khả năng sinh hoạt chất chống ung thư

Các sắc ký bản mỏng TLC được thực hiện trên bản silicagel-G (độ dày 0,5 mm) sử dụng hệ dung môi chloroform: methanol (12:1 v/v). Đối chứng là chất chuẩn vinblastin và vincristin. Các bản mỏng được soi dưới tia UV bước sóng 254 nm, sau đó, hiện hình bằng thuốc thử dragendorff có phát hiện các vết vinblastin và vincristin trong dịch chiết.

Kết quả sắc ký bản mỏng TCL có phát hiện các vết vinblastin và vincristin trong dịch chiết từ các chủng nấm nội sinh đã phân lập được (Hình 3.17). Điều này chứng tỏ rằng các chủng nấm nội sinh đã phân lập được có khả năng sinh tổng hợp các hợp chất có hoạt tính dược lý chống ung thư.



(A) Mẫu dịch chiết từ chủng PD2 (12) và chủng BR2 (14)



(B) Mẫu dịch chiết từ chủng HP - L1 (18), chủng PT - T12 (19), chủng DP1 (20), chủng PD2 (21) và chủng BR2 (22)

Hình 3.17. Sắc ký bản mỏng TLC các alkaloid dịch chiết từ các chủng nấm nội sinh đã phân lập được.

B: Đối chứng Vinblastin C: Đối chứng Vincristin

MF clo: Đối chứng chloroform MF3 Me: Đối chứng methanol

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

- Đã thu thập và định danh được các mẫu cây Dừa cạn và Bạch hoa xà thiệt thảo từ Đan Phượng, Phú Diễn – Hà Nội và Việt Hòa - Hải Dương
- Đã phân lập được 5 chủng nấm nội sinh từ mẫu cây Dừa cạn và cây Bạch hoa xà thiệt thảo thu thập được. Đã xây dựng được cây phát sinh chủng loại của các chủng nấm nội sinh phân lập và được xác định có quan hệ họ hàng gần với 4 loài nấm, bao gồm *Albifimbria terrestris*, *Cladosporium colombiae*, *Cladosporium halotolerans*, và *Corynespora cassiicola*.
- Đã xác định được sơ bộ các chủng nấm nội sinh đã phân lập được có khả năng sinh tổng hợp các hợp chất vinblastin và vincristin có hoạt tính dược lý chống ung thư.

KIẾN NGHỊ

- Tiếp tục nghiên cứu khả năng sản sinh ra các hoạt chất có tính sinh học cao của các chủng nấm nội sinh đã được phân lập.
- Nghiên cứu tối ưu hóa các điều kiện phát triển của các chủng nấm nội sinh này và ứng dụng để tăng cường sản xuất các hợp chất có hoạt tính.
- Nghiên cứu và tách chiết các hợp chất được sinh ra bởi các chủng nấm nội sinh đã nghiên cứu và thử các hoạt tính sinh học của các hợp chất đó như hoạt tính sinh học kháng nấm, kháng khuẩn, chống ung thư...

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ

01. Trần Thị Hương Giang, Nguyễn Đức Quân, Dương Ánh Linh, Nguyễn Ngọc Lan, **Lê Quang Huy**, Nguyễn Thị Kim Liên và Nguyễn Huy Hoàng, Phân lập và xác định các chủng nấm nội sinh từ cây dứa cạn (*Catharanthus roseus*) và cây bán chi liên (*Scutallaria barbata*), *Tạp chí Sinh học 2021*, 43 (2): 1-10

ACADEMIA JOURNAL OF BIOLOGY 2021, 43(2): 1–10

DOI: 10.15625/2615-9023/15920

**ISOLATION AND IDENTIFICATION OF ENDOPHYTIC FUNGI FROM
Catharanthus roseus AND *Scutallaria barbata***

**Tran Thi Huong Giang¹, Nguyen Duc Quan¹, Duong Anh Linh¹, Nguyen Ngoc Lan¹,
Le Quang Huy¹, Nguyen Thi Kim Lien¹, Nguyen Huy Hoang^{1,2,*}**

¹Institute of Genome Research, VAST, Vietnam

²Graduate University of Science and Technology, VAST, Vietnam

Received 8 March 2021, accepted 8 June 2021

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Stierle A., Strobel G. A. & Stierle D., 1993, Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of pacific yew, *Science*, 260, 214–216.
- [2] Tan R., Zou W. X., 2001, Endophytes: a rich source of functional metabolites, *Nat Prod Rep*, 18(4), 448-459.
- [3] Jia M., Chen L., Xin H. L., 2016. A friendly relationship between endophytic fungi and medicinal plants: A systematic review. *Front. Microbiol.* 7: 906-921
- [4] Manici L. M., Kelderer M., Caputo F., Mazzola M., 2015. Auxin-mediated relationships between apple plants and root inhabiting fungi: Impact on root pathogens and potentialities of growth-promoting populations. *Plant Pathol.* 64: 843-851.
- [5] Trạm Y tế xã Đông Thạnh, Cây Dừa cạn và những tác dụng trong Đông y, <<http://tytxadongthanh.medinet.gov.vn/chuyen-muc/cay-dua-can-va-nhung-tac-dung-trong-dong-y-c13013-20165.aspx>>, xem ngày 27/03/2021.
- [6] Ngọc Anh, Bạch hoa xà thiệt thảo: Công dụng và cách dùng, <<https://hellobacsi.com/duoc-lieu/thao-duoc/bach-hoa-xa-thiet-thao-cong-dung-va-cach-dung>>, xem ngày 27/04/2022.
- [7] Quách Tuấn Vinh, Bài thuốc từ cây bạch hoa xà thiệt thảo, https://soyte.hanoi.gov.vn/chuong-trinh-y-te/-/asset_publisher/4IVkx5Jltnbg/content/bai-thuoc-tu-cay-bach-hoa-xa-thiet-th-3, xem ngày 11/12/2022.
- [8]. Nguyễn Lâm Dũng, Nguyễn Đình Quyến, Phạm Văn Ty, 2002, *Vi sinh vật học. Nhà xuất bản giáo dục.*
- [9] Nguyễn Lâm Dũng, 1984, Vi sinh vật đất và sự chuyển hoá các hợp chất cacbon, nitơ. *Nhà xuất bản khoa học kỹ thuật.*
- [10] Nguyễn Văn Sức, 2000, Vai trò của vi sinh vật đất trong hệ thống nông nghiệp bền vững. Tài nguyên vi sinh vật đất và sự phát triển bền vững của hệ sinh thái đất. *Nhà xuất bản nông nghiệp.*

- [11] Martinneztoledo M.V, Rodelas B, Salmeron V, Pozo C, Gonzalezlopez J., 1996, Production of pantothenic acid and thimine by *Azotobacter vinelandii* in a chemically defined medium and a dialyses soil medium. *Bio* 2013, 22 (2), 131-135.
- [12] PGS.TS. Trần Thị Thu Hà - Trường Đại học Nông lâm Huế, <<http://wasi.org.vn/vai-tro-va-tam-quan-trong-cua-vi-sinh-vat-noi-sinh-doi-voi-cay-trong-moi-truong-va-doi-song-con-nguoi/>>, xem ngày 29/08/2021.
- [13] Zinniel, D. K., P. Lambrecht, N. B. Harris, Z. Feng, D. Kuezmarski, P. Highley, C. Ishimaru, A. Arunakumari, G. R. Barletta and A. K. Vidaver, 2002, Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2198-2208
- [14] Taechowisan T., Lumyong S., 2003, Activity of endophyte actinomycetes from roots of *Zingiber officinale* and *Alpinia galang* against phytopathogenic fungi, *Annals of Microbiology*, 53 (3), 291 – 298.
- [15] Carroll G.C., Tudzynski P, 1997, Fungal phytohormones in pathogenic and mutualistic associations, *The Mycota V: plant relationships part A. Berlin: SpringerVerlag*, 167–184.
- [16] O’Sullivan D. J., O’Gara F., 1992, Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens, *Microbiol Rev*, 56, 662–676.
- [17] Richardson A. E., Barea J. M., McNeill A.M., Prigent-Combaret C., 2009, Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms, *Plant Soil*, 321, 305–339.
- [18] Ryan R.P., Germaine K., Franks A., Ryan D.J., Dowling D.N., 2008, Bacterial endophytes: recent developments and applications, *FEMS Microbiol Lett*, 278, 1–9.
- [19] Carroll G., 1988, Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont, *Ecol*, 69, 2-9.
- [20] Shukla S. T., Habbu P. V., Kulkarni V. H., Jagadish K. S., Pandey A. R., Sutariya V. N., 2014, Endophytic microbes: a novel source for

biologically/pharmacologically active secondary metabolites, *Asian J Pharmacol Toxicol*, 2(3), 1-16.

[21] Amrita School of Biotechnology, Amrita Vishwa Vidyapeetham, Amritapuri, Kollam 690525, Kerala, India, 2015, Pharmacological profile of mangrove endophytes – a review, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences Vol 7*, (1), 6-15.

[22] Jan A., Bhat K. M., Mir M. A., Bhat M. A., Wani I. A., Rather J. A., 2013. Surface sterilization method for reducing microbial contamination of field grown strawberry explants intended for *in vitro* culture. *Afr. J. Biotechnol.* 12(39): 5749-5753.

[23] Cui Y., Yi D., Bai X., Sun B., Zhao Y., Zhang Y., 2012, Ginkgolide B produced endophytic fungus (*Fusarium oxysporum*) isolated from Ginkgo biloba, *Fitoterapia*, 83, 913–920.

[24] Peng J., Lin T., Wang W., Xin Z., Zhu T., Gu Q., Li D., 2013. Antiviral alkaloids produced by the mangrove-derived fungus *Cladosporium* sp. PJX-41. *J. Nat. Products* 76(6): 1133-1140.

[25] Strobel G. and Daisy B., 2003, Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products, *Microbiol Mol Biol Rev*, 67(4), 491– 502.

[26] Castillo U.F., Strobel G.A., Ford E.J., Hess W.M., Porter H., Jensen J.B., Albert H., Robison R., Condrón M.A.M., Teplow D.B., Stevens D., Yaver D., 2002, Munumbicins, wide spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* (NRRL 30562) endophytic on *Kennedia nigricans*, *Microbiology* 148, 2675–2685.

[27] Bùi Thị Hà, Hồ Mạnh Tường, Hoàng Phú Hiệp, Lê Văn Sơn, Nguyễn Thị Tâm, Chu Hoàng Mậu, Tách dòng phân tử và thiết kế vector chuyển gen dat phân lập từ cây dứa cựa (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don), *Tạp chí sinh học* 2015, 37 (2): 236-243

[28] Le Roux M, Guéritte F. From *Catharanthus roseus* Alkaloids to the Discovery of Vinorelbine (Navelbine®). *Navelbine® and Taxotère®. Published online* 2017:87-149.

- [29] Strobel G. A., Stierle A., Stierle D. & Hess W. M., 1993, *Taxomyces andreanaea* proposed new taxon for a bulbiferous hyphomycete associated with Pacific yew, *Mycotaxon*, 47, 71–80.
- [30] Raviraja N.S., 2005, Fungal endophytes in five medicinal plant species from Kudremukh Range, Western Ghats of India, *J Basic Microbiol*, 45(3), 230-235.
- [31] Kusari S., Zühlke S., Spiteller M., 2009, An endophytic fungus from *Camptotheca acuminata* that produces camptothecin and analogues, *J Nat Prod*, 72(1), 2-7.
- [32] Li W., Zhou J., Lin Z., Hu Z., 2007, Study on fermentation condition for production of huperzine A from endophytic fungus 2F09P03B of *Huperzia serrata*, *Chinese Medicinal Biotechnology*, 2, 254-259.
- [33] Aswathy A. J., Jasim B., Jyothis M., Radhakrishnan E.K., 2012, Identification of two strains of *Paenibacillus* sp. as indole 3 acetic acidproducing rhizome-associated endophytic bacteria from *Curcuma longa*, *School of Biosciences, Mahatma Gandhi University, Priyadarshini Hills, Kottayam, Kerala, India*, 686 – 560.
- [34] Hammerschmidt L., Abdessamad Debbab, Tu Duong Ngoc, Victor Wray, Catalina Perèz Hemphil, WenHan Lin, Heike Broetz-Oesterhelt, Matthias U. Kassack, Peter Proksch, Amal H. Aly, 2014, Polyketides from the mangrovederived endophytic fungus *Acremonium strictum*, *Tetrahedron Letters*, 55, (24), 3463 - 3468.
- [35] Palem P. P. C., Kuriakose G. C., Jayabaskaran C., 2015. An endophytic fungus, *Talaromyces radicus*, isolated from *Catharanthus roseus*, produces Vincristine and Vinblastine, which induce apoptotic cell death. *PLoS ONE* 10(12): 1-22.
- [36] Sean F. B. and Clardy J., 2000, CR377, a new pentaketide antifungal agent isolated from an endophytic fungus, *J. Nat. Prod.*, 63 (10), 1447–1448.
- [37] Strobel G., 2006, *Muscodor albus* and its biological promise, *J Ind Microbiol Biotechnol*, 33(7), 514-522.

- [38] John G.O., Gregory L.H., Otto D.H., Michael A.G., & et al, 1997, Nodulisporic Acid A, a Novel and Potent Insecticide from a *Nodulisporium* Sp. Isolation, Structure Determination, and Chemical Transformations, *J. Am. Chem. Soc*, 119, 8809-8816.
- [39] Ravindran, C., T. Naveenan, G. R. Varatharajan, R. Rajasabapathy, R. M. Meena, 2012, *Botanica Marina*, Vol. 55: 269-279.
- [40] Arnold A. E., Maynard Z., Gilbert G. S., Coley P. D., Kursar T. A., 2000. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? *Ecol. Lett.* 3(4): 267-274.
- [41] Ramani S., Jayabaskaran C., 2008. Enhanced catharanthine and vindoline production in suspension cultures of *Catharanthus roseus* by Ultraviolet-B light. *J. Mol. Signal* 3: 1-6
- [42] Tan R. X., Zou W. X., 2001. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat. Prod. Rep.* 18: 448-459.
- [43]. Lê Mai Hương và cộng sự, 2005, Phân lập và sàng lọc hoạt tính kháng nấm, kháng khuẩn các chủng nấm nội sinh thực vật phân lập từ một số vườn thuốc phía Bắc Việt Nam, *Tạp chí dược học* (352), trang 20-23.
- [44]. Trần Thị Như Hằng và cộng sự, 2009, Xác định cấu trúc và thử hoạt tính sinh học của ergosterol peroxid phân lập từ chủng nấm *Trichoderma konilangbra* nội sinh trên cây Khổ sâm (*Croton tonkinensis* Gapnep), *Tạp chí dược học* (400), trang 60-65.
- [45] Phạm Quang Thu, Nguyễn Hoàng Nghĩa, Trần Xuân Hưng, Nguyễn Văn Nam, 2012, Nghiên cứu vi sinh vật nội sinh và các hợp chất hóa học có hoạt tính kháng nấm gây bệnh ở các dòng Keo tai tượng khảo nghiệm tại Thừa Thiên Huế, *Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp*, số 2, 2243-2252.
- [46]. Nguyễn Đình Nga và cộng sự, 2010, Sàng lọc vi nấm nội sinh thực vật kháng *Candida albicans*, *Tạp chí Y – Dược học quân sự*. 4, 17-24.
- [47] Đàm Sao Mai, Võ Trung Âu, 2014, Nghiên cứu phân lập và xác lập môi trường nuôi cấy phân lập vi nấm cộng sinh phân lập từ cây thông đỏ tại vùng Lạc Dương tỉnh Lâm Đồng, *Tạp chí Sinh học*, 36(1se), 84-89.
- [48] Thị Ngọc Mỹ Võ, Văn Thanh Nguyễn, Đình Nga Nguyễn, Phân lập và sàng lọc các chủng vi sinh vật nội sinh có hoạt tính chống oxy hóa từ một số

cây họ *Zingiberaceae* và *Rutaceae*, TNM Võ, VT Nguyễn, ĐN Nguyễn - 2016

[49] Trương Minh Phụng, Lê Thị Thúy Hằng, Phạm Thị Hảo, Nguyễn Thị Huỳnh My, Nguyễn Hoàng Chương, Nghiên cứu hoạt tính kháng khuẩn của các chủng xạ khuẩn nội sinh trong cây Trinh nữ hoàng cung (*Crinum latifolium*), Tạp chí phát triển KH&CN, Tập 20, Số T5- 2017

[50] Ahmad M., Nangyal H., Imran M., 2016, Optimization of protocol for surface sterilization and callus induction for three rice varieties. *J. Agric. Environ. Sci.*, 16 (2): 357-361.

[51] Nongalleima K., Dikash Singh T., Amitabha D., Deb L., Sunitibala Devi H., 2013. Optimization of surface sterilization protocol, induction of axillary shoots regeneration in *Zingiber zerumbet* (L.) Sm. as affected by season. *Biol. Rhythm Res.*: 45(2): 317-324.

[52] Robert O. B., Terry A. T., 1978. Field and laboratory guide to tree pathology. Academic Press, Cambridge, London: 9-13.

[53] Saghai-Maroo M. A., Soliman K. M., Jorgensen R. A., Allard R. W., 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 81: 8014-8018.

[54] Olmstead R. G., Michaels H. J., Scott K. M. Palmer J. D., 1992. Monophyly of the asteridae and identification of their major lineages inferred from DNA sequences of *rbcl*. *Ann. Missouri Bot. Garden* 79 : 249-265.

[55] S. Kumar, K. Jyotirmayee, M. Sarangi, Thin layer chromatography: A tool of biotechnology for isolation of bioactive compounds from medicinal plants, *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 18 (1):126-132

[56] Schubert K., Greslebin A., Groenewald J. Z., Crous P. W., 2009. New foliicolous species of *Cladosporium* from South America. *Persoonia* 22: 111-122.

**ISOLATION AND IDENTIFICATION OF ENDOPHYTIC FUNGI FROM
Catharanthus roseus AND *Scutallaria barbata***

**Tran Thi Huong Giang¹, Nguyen Duc Quan¹, Duong Anh Linh¹, Nguyen Ngoc Lan¹,
Le Quang Huy¹, Nguyen Thi Kim Lien¹, Nguyen Huy Hoang^{1,2,*}**

¹Institute of Genome Research, VAST, Vietnam

²Graduate University of Science and Technology, VAST, Vietnam

Received 8 March 2021, accepted 8 June 2021

ABSTRACT

Endophytic fungi, microfungi that internally infect living plant tissues, are reported to have the ability to synthesize many enzymes, plant growth hormones and pharmaceutically active compounds similar to those in their hosted plants. This has opened a potential path of using endophytic fungi as a bioreactor for mass production of bioactive compounds at a lower cost. Therefore, it is necessary to establish a robust procedure for the isolation and identification of potential fungal strains that are capable of producing desired biological compounds. In this study, we reported an effective procedure for surface sterilization of 3 types of tissue samples (root, shoot and leaf) of 2 herbaceous plants (*Catharanthus roseus* and *Scutallaria barbata*) using commercial bleach (5% NaOCl), isolation of endophytic fungi from the sterilized samples and identification of isolated fungal strains by ITS sequencing analysis. A total of 48 endophytic fungi were successfully isolated from plant samples collected from Dan Phuong (Ha Noi), Phu Dien (Ha Noi) and Hai Duong city (Hai Duong). Based on results of morphological observation and ITS sequencing analysis, 48 endophytic fungi were classified to one of the four species, including *Cladosporium colombiae*, *Cladosporium halotolerans*, *Corynespora cassicola* and *Albifimbria terrestris*. The potential of the isolated endophytic fungal species for the mass production of pharmacologically active compounds will be investigated in future studies.

Keywords: *Albifimbria* sp., *Catharanthus roseus*, *Cladosporium* sp., *Corynespora* sp., *Scutallaria barbata*, endophytic fungi, ITS sequencing, surface sterilization.

Citation: Tran Thi Huong Giang, Nguyen Duc Quan, Duong Anh Linh, Nguyen Ngoc Lan, Le Quang Huy, Nguyen Thi Kim Lien, Nguyen Huy Hoang, 2021. Isolation and identification of endophytic fungi from *Catharanthus roseus* and *Scutallaria barbata*. *Academia Journal of Biology*, 43(2): 1–10. <https://doi.org/10.15625/15920>

*Corresponding author email: nhhoang@igr.ac.vn

©2021 Vietnam Academy of Science and Technology (VAST)

INTRODUCTION

Catharanthus roseus, commonly known as Madagascar periwinkle, is a perennial herbaceous plant in the Apocynaceae family (Ramani & Jayabaskaran, 2008). *Scutallaria barbata* is a shrub herbal plant belonging to the mint family, Lamiaceae (Zhang et al., 2017). For many years, *C. roseus* and *S. barbata* are considered as a natural source of several bioactive compounds with anti-inflammatory and anti-cancer activities (Palem et al., 2015; Tan & Zhou 2001; Yin et al., 2004; Zhang et al., 2017). In *C. roseus*, vincristine and vinblastine are the 2 major vinca alkaloids that are most widely used in the chemotherapeutic treatment of different stages of breast cancer, leukemia and Hodgkin's disease (Palem et al., 2015). Similarly, *S. barbata* extract was reported to have inhibitory effects on the proliferation of human lung cancer cell line A549 (Yin et al., 2004) and ovarian cell line A2780 (Zhang et al., 2017). Reports on the medicinal efficacy of these plants have led to a high demand for their bioactive compounds in the global markets. However, the use of plant as a source for the production of anti-inflammatory and anti-cancer compounds is impeded by several factors, including low yield, time consuming, and high production cost (Palem et al., 2015).

Endophytic fungus is a symbiont that could live between healthy plant cells without causing any negative effects to their host plants (Jia et al., 2016). These endophytes are reported to have the ability to produce a wide range of enzymes and phytohormones as well as plant secondary metabolites that have anti-inflammatory, anti-bacterial and anti-cancer activities (Palem et al., 2015; Tan & Zhou 2001; Yin et al., 2004; Zhang et al., 2017). More specifically, studies have shown that *Fusarium* endophytes isolated from root of apple plant can produce phytohormone, indole-3-acetic acid (IAA) and gibberellins (GA) (Manici et al., 2015), *Cladosporium* endophytes isolated from *Xylocarpus granatum* can synthesize several indole alkaloids (Peng et al., 2013), *Streptomyces cavourensis* from *Cinnamomum*

cassia has antibacterial activity against many species from *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterobacter aerogenes* and *Proteus vulgaris* (Vu Thi Hanh Nguyen et al., 2017), and *Huperzia serrata* derived *Trichoderma* and *Fusarium* endophytes are capable of inhibiting *Escheria coli*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* (Le Thi Minh Thanh et al., 2019). These findings have opened a potential path of using endophytic fungi as a bioreactor for mass production of plant metabolites with pharmacological effects at reduced cost. Therefore, it is necessary to establish a robust procedure for the isolation and identification of potential fungal strains that are capable of producing desired biological compounds.

In this study, we aim to optimize procedures for: (1) surface sterilization of 3 types of tissue samples, root, shoot and leaf of *Catharanthus roseus* and *Scutallaria barbata* by testing 2 sterilizing agents, commercial bleach and HgCl₂, (2) isolation of endophytic fungi from the sterilized samples, and (3) identification of isolated fungal strains by ITS sequencing analysis. Our results showed that a total of 48 endophytic fungal strains were successfully isolated from plant samples collected from Dan Phuong (Ha Noi), Phu Dien (Ha Noi) and Hai Duong city (Hai Duong); they have been identified as endophytic strains of either *Cladosporium halotolerans*, *Cladosporium colombiae*, *Corynespora cassicola* or *Albifimbria terrestris*. The potential of the isolated endophytes as a bioreactor for synthesizing plant secondary metabolites will be investigated in future studies.

MATERIAL AND METHODS

Plant material

Catharanthus roseus (L.) G. Don of at least one-year old collected from Phu Dien and Dan Phuong, Ha Noi, and *Scutellaria barbata* D. Don of at least one-year old collected from Hai Duong city (Hai Duong) were used in this research. Collected plants were grown in soil pots at the Functional

genome laboratory for later use. Plant species of collected samples were identified by ABI PRISM® 3100 Avan Gentic Analyzer (data not shown) using 3 sets of primers, namely RbcL (F: 5'-ATGTCACCACAAACAGAAAC, R: 5'-TCGCATGTACCTGCAGTAGC), tmL (F: 5'-CGAAATCGGTAGACGCTACG, R: 5'-GGGGATAGAGGGACTTGAAC), and ITS (F: 5'-ACGAATTCATGGTCCGGTGAAGTGTTCG, R: 5'-TAGAATTCCCCGGTTCGCTCGCCGTTAC) (Olmstead et al., 1992; Tarberlt et al., 1991; Sun et al., 1994). Fresh and healthy tissues from shoot, leaf and root were used for the isolation of endophytic fungi.

Surface sterilization of *C. roseus* and *S. Barbata*

Fresh plant material of *C. roseus* and *S. barbata* was surface sterilized to remove bacteria and exophytic fungi and to ensure the collection of endophytic fungi. Surface sterilization was performed based on the methodologies reported by Robert, Terry (1978) and Arnold et al., (2000) with some minor modifications for optimization.

Optimized method for surface sterilization based on the methodology of Robert & Terry (1978)

C. roseus and *S. barbata* plants were rinsed with water to remove dirt before shoots, leaves and roots were cut into small segments (approximately 3 cm in length) and separately sterilized. Fresh plant material was washed with sterilized distilled water twice for 1 min each time, ethanol 75% for 1 min, and rinsed with sterilized distilled water. Plant material was then treated with commercial bleach (Javel clean, Ha Noi; 5% NaClO, v/v) on a rotary shaker for 30 min at 150 rpm, washed with sterilized distilled water for 5 min and air dried on sterilized filter paper. Plant material was then transferred onto Luria Broth (LB) agar plates (Himedia, India) supplemented with cefotaxime (200 µg/L; Flamingo Farm, India), and incubated at 25 ± 2 °C for 5 days. Post 5-day cultivation, contamination - free plant material was used for isolation of endophytic fungi.

Optimized method for surface sterilization based on the methodology of Arnold et al. (2000)

Plant material was surface sterilized as described in previous section, however, mercury chloride (HgCl₂; 0.1%) solution was used as the sterilizing agent instead of commercial bleach. Plant material was washed with HgCl₂ solution on a rotary shaker for 7 min at 150 rpm. Once finished, the remaining steps were performed as described in 2.2.1.1 section.

Isolation and preservation of endophytic fungus from *C. roseus* and *S. Barbata*

Post surface sterilization, shoot, leaf and root tissue samples were grounded, transferred onto potato dextrose agar (PDA) plates (Himedia, India) supplemented with cefotaxime (200 µg/L), and incubated at 25 ± 2 °C. Fungal colonies that emerged from the cut surface of plant material were considered as endophytic fungi. They were then transferred onto fresh PDA plates and incubated at 25 °C for 10 days. A single colony of each isolated fungus was preserved in a PDA agar slant tube at 4 °C and in 25% glycerol at -80 °C.

Extraction of DNA from endophytic fungus

Fungal mycelia from a single endophytic fungus was inoculated into 100 mL PDA liquid medium and cultured at 25 ± 2 °C for 7 days. A hundred (100) mg of fungal mycelia was collected by centrifugation and total DNA was extracted by CTAB method with some minor modifications for optimization (Saghai-Marooof et al., 1984). The concentration and quality of the obtained DNA were checked using a Nanodrop®1000 spectrophotometer and gel electrophoresis. All DNA samples were preserved at -20 °C for subsequent experiments.

Identification of endophytic fungi by sequencing ITS regions

The internal transcribed spacer (ITS) was amplified from ribosomal DNA (rDNA) using the universal primer ITS1 (forward), 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' and ITS4

(reverse), 5'-TCCTCCGCTTATTGATAT GC-3' (White et al., 1990). PCR was carried on an Eppendorff Mastercycler Pro S (Merck, USA). Each reaction (25 μ L) was consist of 8.5 μ L of H₂O, 2 μ L of DNA (30 ng/ μ l), 2 μ L of primer (10 μ M), 12.5 μ L of 2X PCR master mix. The cycle program for product amplification was 1 cycle of 94 °C for 4 min, followed by 35 cycles of 94 °C (denaturation) for 30 s, 55 °C (annealing) for 30 s, and 72 °C (extension) for 1 min, and 1 cycle of 72 °C for 7 min. PCR products were checked by gel electrophoresis. The high quality PCR product was column purified and sequenced using a DNA analyzer ABI 3500 (PE Applied Biosystems). Species identification of isolated fungi was done by blasting the obtained ITS-amplified sequences against the GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) using BLASTN online tool (RRID: SCR_001598).

Construction of unrooted phylogenetic tree

Unrooted phylogenetic trees were generated by MEGA7 software (RRID: SCR_000667) using sequencing alignments of ITS sequences from isolated fungi and nucleotide sequences in *Albifimbria terrestris* (CBS 126186), *Corynespora cassiicola* (CBS 161.60), *Cladosporium halotolerans* (CBS 119416), *Cladosporium endophytica* (MFLUCC 17-0599), *C. pseudochalastosporoidesi* (CBS 140490), *Corynespora cassiicola* (CBS 161.60), *Cercospora beticola* (CBS 116456) and *Myrothecium verrucaria* (CBS 253.47). Phylogenetic tree was constructed by maximum likelihood method. The bootstrap confidence levels (%) were assessed and ranked as follows: high confidence level (> 85%), average confidence level (65–85%), and low confidence level (< 65%) (Nguyen Duc Anh & Nguyen Giang Son, 2016).

Statistical analysis

Analytical data from this study was obtained from at least 3 replicates. Statistical analysis was performed by one-way analysis of variance (ANOVA; RRID: SCR_002427) methods with the *post hoc* Tukey test (*p*-value > 0.05).

RESULTS AND DISCUSSION

Optimisation of surface sterilization of *C. roseus* and *S. Barbata*

One of the most critical factors for the successful establishment of an effective endophytic fungi isolation protocol of *C. roseus* and *S. barbata* is the ability to optimize a surface sterilization method. In an attempt to establish a robust surface sterilization protocol, the method of Robert, Terry (1978) and Arnold et al., (2000) were tested on 3 types of plant material, root, stem and leaf, with different periods (Fig. 1).

Results showed that surface sterilization using HgCl₂ 0.1% was more effective than commercial bleach contains 5% NaClO. Specifically, the rate of contamination of *C. roseus* and *S. barbata* plant tissues treated with HgCl₂ dropped significantly from more than 94% to lower than 16% when the treatment time increased from 5 min to 7 min (Figs. 1A, 1C) Plant samples from these 2 treatment periods appeared to be contaminated with different species of bacteria, yeast and fungi, and displayed a proportion of browning and necrotic cells. In contrast, in the 10 min treatment, root, shoot and leaf samples remained fresh and healthy appearance without contamination, which are considered suitable material for isolation of endophytic fungi. Results obtained in this study were consistent with research reported in surface sterilization of a wide range of plant species, including *Zingiber zerumbet* (Nongalleima et al., 2013), *Oryza sativa* (Ahmad et al., 2016) and *Fragaria ananassa* (Jan et al., 2013).

Next, surface sterilization by commercial bleach was evaluated on roots, shoots and leaves of *C. roseus* and *S. barbata* (Figs. 1B, 1D). As expected, commercial bleach required a longer period of time to achieve the same effects as in HgCl₂ treatment. The rate of contamination was high in all samples (more than 93.7%) under 15 min treatment, significantly reduced in leaf sample (*C. roseus*: 28.3% and *S. barbata*: 28.0%) under 30 min treatment, and free of contamination (0%) under 45 min treatment.

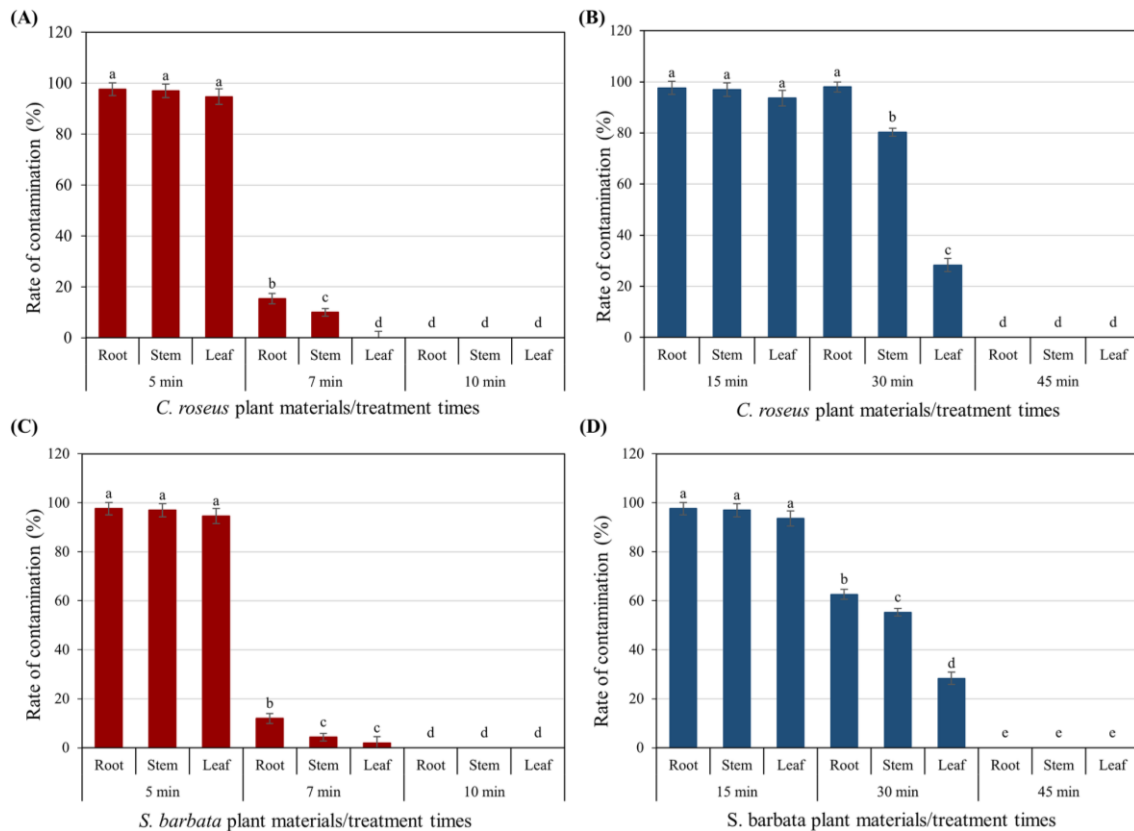


Figure 1. Rate of contamination of *C. roseus* and *S. barbata* plant materials treated by (A, C) HgCl₂ 0.1% and (B, D) commercial bleach (5% NaClO) based on the methodology of Arnold et al. (1978), and Robert & Terry (2000), respectively. (A, C) Treatment of plant material with HgCl₂ requires a shorter time, having 10 min the optimal time for treatment of all samples.

(B, D) Surface sterilization by commercial bleach requires 45 min to effectively decontaminate plant tissue samples

Taken together, the optimal treatment time for surface sterilization of *C. roseus* and *S. barbata* plant tissues using HgCl₂ and commercial bleach was 10 min and 45 min, respectively. However, mercury chloride is an extremely toxic chemical that requires a complicated safety procedure of handling and disposal, therefore, commercial bleach was chosen as a sterilizing agent in this study.

Isolation of endophytic fungi from *C. roseus* and *S. Barbata*

A total of 48 endophytic fungi was isolated from *C. roseus* (43 colonies) collected from Dan Phuong, Phu Dien (Ha Noi), and *S. barbata* (5 colonies) from Hai Duong city (Hai Duong) by the established

surface sterilization and isolation protocols (Fig. 2). Based on the morphological observation, 48 endophytic fungi were then divided into 5 groups, namely DP, PD, HP, PT and BR (Table 1).

Specifically, the fungal strains in the DP group (Group 1) displayed a puffy and elevated surface, opaque gray to black in color, and a cotton-like mycelium network (Fig. 2A). They also showed a faster growth rate than other groups; the surface of the medium plate (approximately 10 cm in diameter) was entirely covered 6–7 days after inoculation. In group 2, PD fungal strains appeared to have a small (2–3 cm in diameter) irregular shape colony, undulated margin, wrinkle and elevated

surface, olive gray in color, and velvet-like mycelium network (Fig. 2B). In group 3, HP endophytes displayed a large circular colony (7–8 cm in diameter), crateriform surface with greenish-black and grey in color, and a cotton-like mycelium network (Fig. 2C). The PT endophytic fungi in group 4 showed a

different appearance from other groups. The revealed morphological features of PT endophytic fungi included white and yellow in color, irregular colony (3–4 cm in diameter) with undulated margin, wrinkle and raised surface and velvet-like mycelium network (Fig. 2D).

Table 1. Morphological characteristic of 5 endophytic fungal strains

No.	Fungal strains	Colony diameter	Colony color	Colony morphology
1	DP1	10 cm	Opaque gray to black	Puffy and elevated surface and cotton-like mycelium network
2	PD2	2–3 cm	Olive gray	Irregular shape colony, undulated margin, wrinkle and elevated surface and velvet-like mycelium network
3	HP-L1	7–8 cm	Greenish-black and grey	Large circular, crateriform surface, and cotton-like mycelium network
4	PT-T12	3–4 cm	White and yellow	Irregular colony with undulated margin, wrinkle and raised surface and velvet-like mycelium network
5	BR2	3–5 cm	Olive gray and greenish-black	Circular shape with undulated margin, wrinkle and elevated surface and velvet-like mycelium network

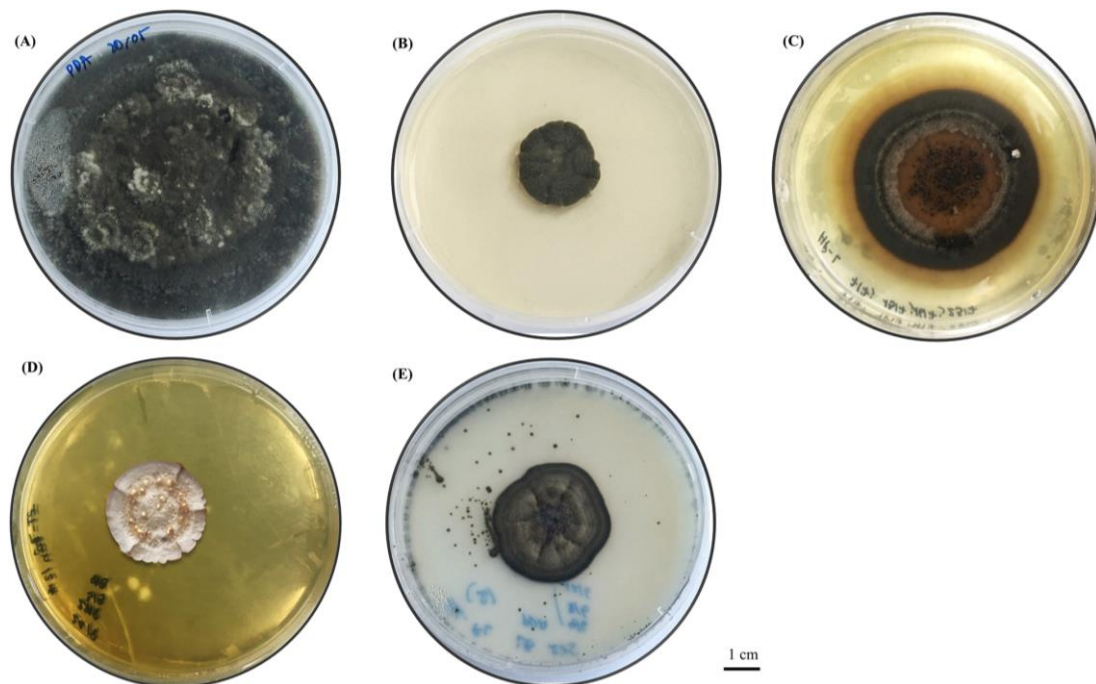


Figure 2. Morphological appearance of endophytic fungi isolated from *C. roseus* and *S. barbata* tissues. Fungal strains (A) DP1, (B) PD2, (C) HP-L1 and (D) PT-T12 strains were isolated from *C. roseus* collected from Dan Phuong and Phu Dien, Ha Noi. (E) BR2 strain was isolated from *S. barbata* at Hai Duong

In group 5, the BR fungal colonies showed a similar appearance to those in group 2, displaying a circular shape (3–5 cm in diameter) with undulated margin, wrinkle and an elevated surface, olive gray and greenish-black in color, and velvet-like mycelium network (Fig. 2E). Post morphological observation, a representative fungal strain from each group was selected for species identification by ITS sequencing. The selected strain from each group was named as followed: Group 1: DP1; Group 2: PD2; Group 3: HP-L1; Group 4: PT-T12, and; Group 5: BR2.

Identification of fungal species by ITS sequencing

Post isolation of endophytic fungi, the 5 representative strains were subjected to molecular identification based on ITS rDNA sequence analysis. Prior to the amplification of ITS regions, the quality of extracted total DNA was evaluated by gel electrophoresis. A single and distinct band at 550 bp was observed for each sample, a result that strongly suggests that intact and high quality DNA had been obtained from all fungal samples (Fig. 3A).

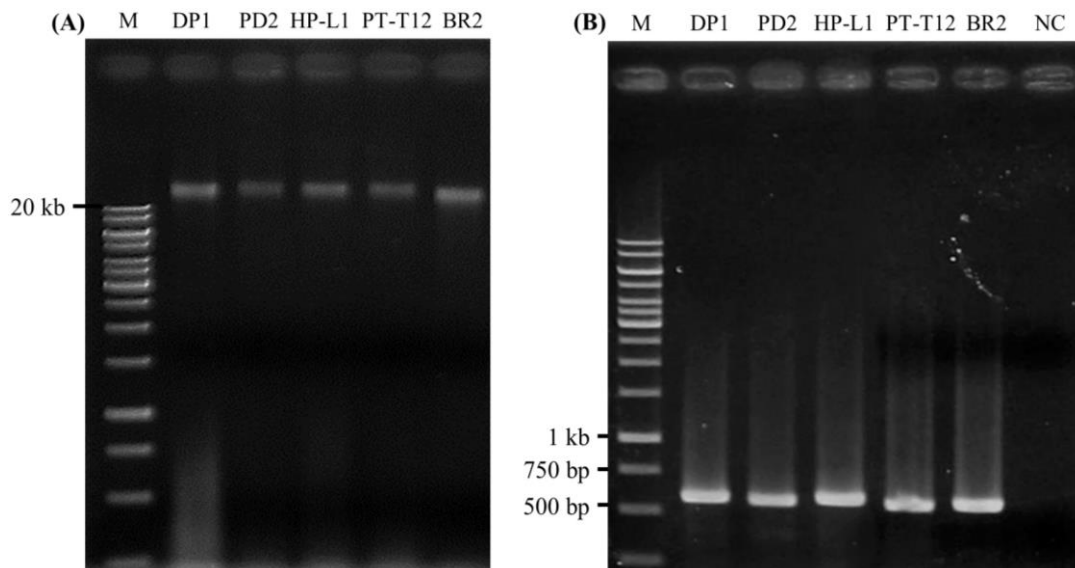


Figure 3. Molecular analysis of endophytic fungi isolated from *C. roseus* and *S. barbata*. (A) Evaluation of DNA quality extracted from DP1, PD2, HP-L1, PT-T12 and BR2. (B) PCR products amplified from DNA of DP1, PD2, HP-L1, PT-T12 and BR2 using universal ITS1 and ITS4 primers (550 bp). M: Marker - GeneRuler 1 kb DNA Ladder, ThermoScientific; NC: negative control; DP1, PD2, HP-L1, PT-T12, BR2: isolated endophytic fungi

Those DNA samples were then used as a template for amplification by ITS1 and ITS4 primers. The PCR amplicons of 5 fungal strains were sequenced and the obtained sequencing data were then blasted against reference sequences on the GenBank database for species identification (Fig. 3B). BLASTN results revealed that DP1 strain returned a high similarity of 99.2% with *Cladosporium colombiae*, PD2 and BR2 strains were

clustered to *Cladosporium halotolerans* with the similarity of 100 and 99.4%, respectively, HP-L1 strain was a *Corynespora cassiicola* species (100% similarity), and PT-T12 strain showed 100% similarity to *Albifimbria terrestris* (Table 2).

Based on data derived from BLASTN analysis, an unrooted phylogenetic tree was also constructed using the maximum likelihood method with a bootstrap value of

1000 replications. Consistent with the results of ITS sequencing, the unrooted phylogenetic tree clearly showed that 5 isolated fungal strains and 7 reference strains were grouped into 4 branches (Fig. 4). PD2 and BR2 strains formed a branch with 2 reference strains *C. halotolerans* and

C. endophytica. The 2 strains were more closely related to *C. halotolerans* with the similarity value of 100% and 99.4%, respectively. This relationship was also reflected by the similarity in morphology observed from the 2 strains with *C. halotolerans*.

Table 2. Identification of fungal species isolated from *C. roseus* and *S. barbata*

No.	Plants	Tissues	Strains	Sequence length (bp)	Species and GenBank ID	Similarity (%)
1	<i>C. roseus</i>	Leaf	DP1	522	<i>Cladosporium colombiae</i> (CBS 274.80B)	99.2
2	<i>C. roseus</i>	Root	PD2	518	<i>Cladosporium halotolerans</i> (CBS 119416)	100
3	<i>C. roseus</i>	Leaf	HP-L1	539	<i>Corynespora cassiicola</i> (CBS 161.60)	100
4	<i>C. roseus</i>	Shoot	PT-T12	511	<i>Albifimbria terrestris</i> (CBS 126186)	100
5	<i>S. barbata</i>	Root	BR2	521	<i>Cladosporium halotolerans</i> (CBS 119416)	99.4

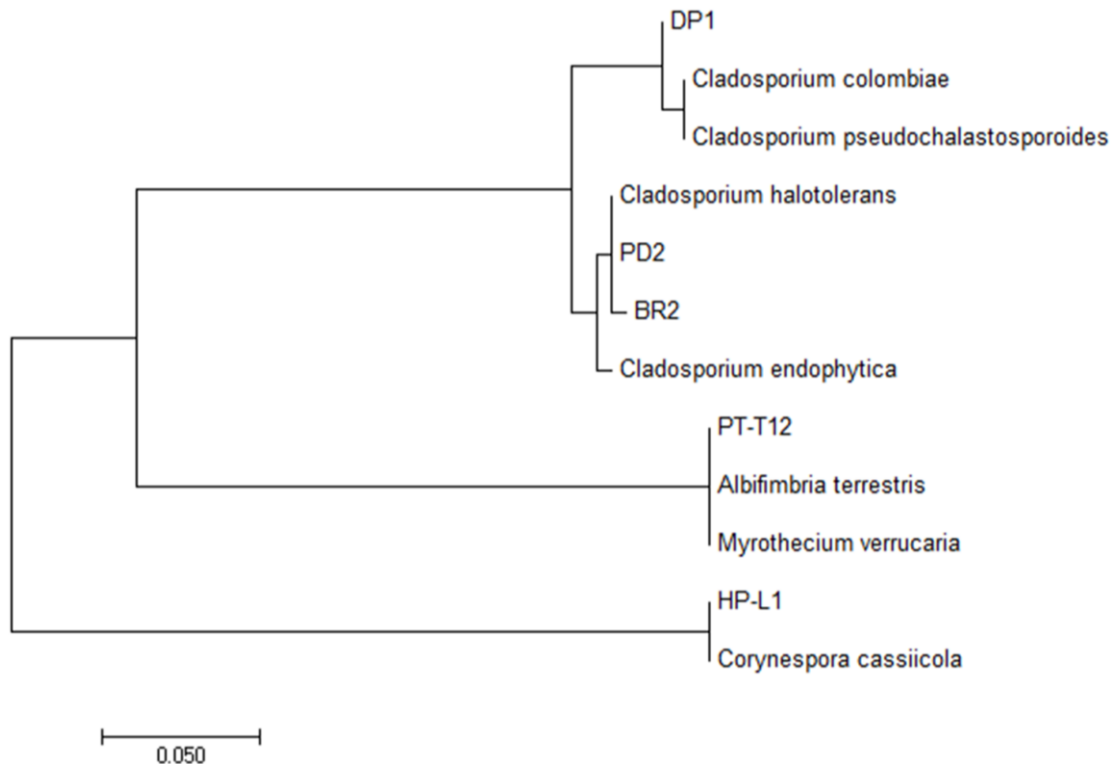


Figure 4. Unrooted phylogenetic analysis of *Cladosporium* sp., DP1, PD2 and BR2. The tree was constructed by the maximum likelihood method using the nucleotide sequence of *Cladosporium* sp. and the ITS sequence of 3 endophytic fungi. A bootstrap value (%) is displayed by a number on each node

DP1 strain formed a separate branch with *C. colombiae* and *C. pseudochalastosporoides*. Based on morphological observation reported by Schubert et al. (2009), DP1 strain was identified as *C. colombiae*. Similar morphological observation was conducted with the endophytic strain PT-T12, and this strain was identified as a *Albifimbria terrestris*. Consistent with ITS sequencing analysis, the HP-L1 strain formed a separated branch with *Corynespora cassiicola* (Fig. 4).

CONCLUSION

In conclusion, forty-eight endophytic fungal strains were successfully isolated from leaf and root tissues of wildy grown *C. roseus* and *S. barbata* using the established surface sterilization and isolation procedure. The fungal strains were identified to have a close relationship with 4 fungal species, including *A. terrestris*, *C. colombiae*, *C. halotolerans*, and *C. cassiicola*, based on morphological observation and ITS sequencing analyses. The results in this study have provided a platform for further study on the isolation and selection of endophytic fungi with potential for the production of pharmacologically active compounds.

Acknowledgements: This research has been done with the financial support from the project of “Research on exploiting endophytic fungi on *C. roseus* and other medicinal plants to produce vinblastine, vincristine or other pharmacologically active compounds” - Component code TĐCNSH.02/20-22 belongs to a key science and technology project hosted by Vietnam Academy of Science and Technology.

REFERENCES

- Ahmad M., Nangyal H., Imran M., 2016. Optimization of protocol for surface sterilization and callus induction for three rice varieties. *J. Agric. Environ. Sci.*, 16 (2): 357–361.
- Arnold A. E., Maynard Z., Gilbert G. S., Coley P. D., Kursar T. A., 2000. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? *Ecol. Lett.* 3(4): 267–274.
- Jan A., Bhat K. M., Mir M. A., Bhat M. A., Wani I. A., Rather J. A., 2013. Surface sterilization method for reducing microbial contamination of field grown strawberry explants intended for *in vitro* culture. *Afr. J. Biotechnol.*, 12(39): 5749–5753.
- Jia M., Chen L., Xin H. L., 2016. A friendly relationship between endophytic fungi and medicinal plants: A systematic review. *Front. Microbiol.* 7: 906–921.
- Le Thi Minh Thanh, Nguyen Thi Hong Anh, Dong Van Quyen and Ha Thi Quyen, 2019. Study on antibacterial activity of endophytic fungi of *Huperzia serrata* distributed in Lam Dong - Vietnam. *J. Prevent. Medicine*, ISSN 0868-2836, 29(10): 1–14.
- Manici L. M., Kelderer M., Caputo F., Mazzola M., 2015. Auxin-mediated relationships between apple plants and root inhabiting fungi: Impact on root pathogens and potentialities of growth-promoting populations. *Plant Pathol.* 64: 843–851.
- Nguyen Duc Anh, Nguyen Giang Son, 2016. Molecular data and preliminary phylogeny of several Paradoxosomatid millipede species in Vietnam (Diplopoda: Polydesmida: Paradoxosomatidae). *Vietnam J. Biotechnol.* 38(2): 146–153 (in Vietnamese with English summary).
- Nongalleima K., Dikash Singh T., Amitabha D., Deb L., Sunitibala Devi H., 2013. Optimization of surface sterilization protocol, induction of axillary shoots regeneration in *Zingiber zerumbet* (L.) Sm. as affected by season. *Biol. Rhythm Res.*: 45(2): 317–324.
- Olmstead R. G., Michaels H. J., Scott K. M. Palmer J. D., 1992. Monophyly of the asteridae and identification of their major lineages inferred from DNA sequences of *rbcl*. *Ann. Missouri Bot. Garden* 79: 249–265.

- Palem P. P. C., Kuriakose G. C., Jayabaskaran C., 2015. An endophytic fungus, *Talaromyces radicus*, isolated from *Catharanthus roseus*, produces Vincristine and Vinblastine, which induce apoptotic cell death. *PLoS ONE* 10(12): 1–22.
- Peng J., Lin T., Wang W., Xin Z., Zhu T., Gu Q., Li D., 2013. Antiviral alkaloids produced by the mangrove-derived fungus *Cladosporium* sp. PJX-41. *J. Nat. Products* 76(6): 1133–1140.
- Ramani S., Jayabaskaran C., 2008. Enhanced catharanthine and vindoline production in suspension cultures of *Catharanthus roseus* by Ultraviolet-B light. *J. Mol. Signal* 3: 1–6.
- Robert O. B., Terry A. T., 1978. Field and laboratory guide to tree pathology. Academic Press, Cambridge, London: 9–13.
- Saghai-Marouf M. A., Soliman K. M., Jorgensen R. A., Allard R. W., 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 81: 8014–8018.
- Schubert K., Greslebin A., Groenewald J. Z., Crous P. W., 2009. New foliicolous species of *Cladosporium* from South America. *Persoonia* 22: 111–122.
- Sun Y., Skinner D., Liang G., Hulbert S., 1994. Phylogenetic analysis of sorghum and related taxa using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. *Theor. Appl Genet.* 89: 26–32.
- Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G, Bouvet J., 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol. Biol.* 17: 1105–1109.
- Tan R. X., Zou W. X., 2001. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat. Prod. Rep.* 18: 448–459.
- Vu Thi Hanh Nguyen, Chu Ky Son and Phi Quyet Tien, 2017. Classification and characterization of endophytes YBQ75 isolated from cinnamon plant (*Cinnamomum cassia* PRESL). *J. Biotechnol.* 16(1): 149–155.
- White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *Aca. Press:* 315–322.
- Yin X., Zhou J., Jie C., Xing D., Zhang Y., 2004. Anticancer activity and mechanism of *Scutellaria barbata* extract on human lung cancer cell line A549. *Life Sci.*, 75(18): 2233–2244.
- Zhang L., Ren B., Zhang J., Liu L., Liu J., Jiang G., Li W., 2017. Anti-tumor effect of *Scutellaria barbata* D. Don extracts on ovarian cancer and its phytochemicals characterisation. *J. Ethnopharmacol.* 206: 184–192.

Số: 400/QĐ-HVKHCN

Hà Nội, ngày 25 tháng 04 năm 2023

QUYẾT ĐỊNH
Về việc thành lập Hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ

GIÁM ĐỐC
HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

Căn cứ Quyết định số 303/QĐ-VHL ngày 01/03/2023 của Chủ tịch Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam về việc ban hành Quy chế tổ chức và hoạt động của Học viện Khoa học và Công nghệ;

Căn cứ Thông tư số 15/2014/TT-BGDĐT ngày 15/5/2014 của Bộ trưởng Bộ Giáo dục và Đào tạo ban hành Quy chế đào tạo trình độ thạc sĩ;

Căn cứ Quyết định số 775/QĐ-HVKHCN ngày 21/11/2016 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ ban hành Quy chế đào tạo trình độ thạc sĩ;

Căn cứ Quyết định số 1502/QĐ-HVKHCN ngày 18/11/2019 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc công nhận học viên cao học trúng tuyển đợt 2 năm 2019;

Căn cứ Quyết định số 324/QĐ-HVKHCN ngày 19/03/2021 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc công nhận đề tài và cử người hướng dẫn luận văn thạc sĩ;

Căn cứ Quyết định số 1917/QĐ-HVKHCN ngày 17/11/2022 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc gia hạn thời gian học tập lần 3 cho học viên Lê Quang Huy;

Xét đề nghị của Trưởng khoa Khoa Công nghệ sinh học, Trưởng phòng Đào tạo.

QUYẾT ĐỊNH:

Điều 1. Thành lập Hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ cho học viên Lê Quang Huy với đề tài: “Nghiên cứu phát hiện vi nấm nội sinh từ một số cây dược liệu Việt Nam”.

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm Mã số: 8 42 01 14

Danh sách thành viên Hội đồng đánh giá luận văn kèm theo Quyết định này.

Điều 2. Hội đồng có trách nhiệm đánh giá luận văn thạc sĩ theo đúng quy chế hiện hành của Bộ Giáo dục và Đào tạo, Học viện Khoa học và Công nghệ. Quyết định này có hiệu lực trong thời hạn tối đa 60 ngày làm việc kể từ ngày ký.

Hội đồng tự giải thể sau khi hoàn thành nhiệm vụ.

Điều 3. Trưởng phòng Tổ chức - Hành chính và Truyền thông, Trưởng phòng Đào tạo, Trưởng phòng Kế toán, Trưởng Khoa Công nghệ sinh học, các thành viên có tên trong danh sách Hội đồng và học viên cao học có tên tại Điều 1 chịu trách nhiệm thi hành Quyết định này./.

Nơi nhận:

- Như Điều 3;
- Lưu hồ sơ học viên;
- Lưu: VT, ĐT, MT.14.



GIÁM ĐỐC

GS.TS. Vũ Đình Lâm

DANH SÁCH HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN VĂN THẠC SĨ

(Kèm theo Quyết định số 400/QĐ-HVKHCN ngày 25/04/2023
của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ)



Cho luận văn của học viên: Lê Quang Huy

Tên đề tài: Nghiên cứu phát hiện vi nấm nội sinh từ một số cây dược liệu Việt Nam.

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8 42 01 14

Người hướng dẫn: GS. TS. Nguyễn Huy Hoàng

- Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm KHCNVN

TT	Họ và tên, học hàm, học vị	Chuyên ngành	Cơ quan công tác	Trách nhiệm trong Hội đồng
1.	GS.TS. Nghiêm Ngọc Minh	Vi sinh vật học	Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm KHCNVN	Chủ tịch
2.	TS. Trần Minh Đức	Sinh học phân tử	Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KHCNVN	Phản biện 1
3.	PGS.TS. Trương Quốc Phong	Vi sinh Y học	Viện Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm, Đại học Bách Khoa Hà Nội	Phản biện 2
4.	TS. Lê Thị Nguyên Bình	Sinh học phân tử	Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm KHCNVN	Ủy viên - Thư ký
5.	TS. Khổng Ngân Giang	Sinh học	Viện Di truyền Nông nghiệp, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam	Ủy viên

(Hội đồng gồm 05 thành viên)./. *JW*

Hà Nội, ngày 09 tháng 05 năm 2023

BIÊN BẢN HỌP HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN VĂN THẠC SĨ

Thực hiện Quyết định số: 400/QĐ-HVKHCN ngày 25/04/2023 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc thành lập Hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ của học viên Lê Quang Huy

Tên đề tài: Nghiên cứu phát hiện vi nấm nội sinh từ một số cây dược liệu Việt Nam.

Ngành/Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8 42 01 14

Hôm nay, ngày 09/05/2023 Hội đồng đã họp tại phòng 1710, A28, Học viện Khoa học và Công nghệ vào lúc 09 giờ 00, Hội đồng gồm 05 thành viên:

- | | |
|------------------------------|-------------------|
| 1. GS.TS. Nghiêm Ngọc Minh | Chủ tịch hội đồng |
| 2. TS. Lê Thị Nguyên Bình | Thư ký hội đồng |
| 3. TS. Trần Minh Đức | Phản biện 1 |
| 4. PGS.TS. Trương Quốc Phong | Phản biện 2 |
| 5. TS. Khổng Ngân Giang | Ủy viên hội đồng |



Thành viên vắng mặt: (Phản biện hoặc ủy viên, đã có bản nhận xét đồng ý cho phép học viên được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ).

NỘI DUNG LÀM VIỆC

- Đại diện cơ sở đào tạo đọc quyết định thành lập Hội đồng đánh giá luận văn
- Chủ tịch Hội đồng, điều khiển phiên họp
- Thư ký HĐ, đọc lí lịch khoa học và bảng điểm của học viên
- Học viên trình bày luận văn trước Hội đồng
- Phản biện 1:

Luận văn được trình bày khoa học, chi tiết, hình thức đẹp. Nội dung nghiên cứu có ý nghĩa, đã được công bố trong một bài báo. Các hồ sơ một số tài liệu tham khảo một số, thảo luận kỹ lưỡng kết quả mục 3.2.4. Luận văn đáp ứng các yêu cầu của một luận văn Thạc sĩ.

6. Phản biện 2:

Đề tài: Công nghệ thực tế cao luôn cần trình bày khoa học, hình ảnh đẹp
Nên lâu rồi giờ vẫn chưa giải trình và mô tả theo phương pháp xác
định hoạt chất chống ung thư của các chất này

7. Học viên trả lời:

Học viên tiếp thu các ý kiến đóng góp và sẽ chỉnh
sửa lại luận văn theo ý kiến của các thầy cô và
các phản biện

8. Các thành viên HĐ và những người tham dự nêu câu hỏi

TS. Khương Ngọc Giang: Đề tài nghiên cứu về bào chế nhưng có ý nghĩa
thực học và thực tiễn nào. Bề ngang nghiên cứu khoa học vào một số
mức và nội dung

TS. Lê Thị Nguyệt Bích: Một phần về phương pháp xác định hoạt chất chống
thực và lâu rồi luôn phải kết quả của nội dung này

GS.TS. Nguyễn Ngọc Mai: Luôn cần đáp ứng yêu cầu của luận văn thạc sĩ
9. Học viên trả lời Các chỉnh sửa lại nội số lời trình bày, chỉnh sửa đề tài thực hiện

Học viên tiếp thu các ý kiến đóng góp và sẽ chỉnh sửa
lại luận văn theo ý kiến của hội đồng để hoàn
thiện luận văn

10. Hội đồng họp kín và cho điểm

- Hội đồng bầu ban kiểm phiếu gồm 3 thành viên:

Trưởng ban: TS. Khương Ngọc Giang

Ủy viên: TS. Trần Minh Đức

Ủy viên: TS. Lê Thị Nguyễn Bích

- Kết quả kiểm phiếu như sau:

Số phiếu phát ra: 5

Số phiếu thu về: 5

Tổng số điểm: 41,3

Điểm trung bình: 8,26

Điểm thưởng công trình công bố: 0,75

Tổng điểm đánh giá luận văn và thưởng công trình công bố: ... 9,01

- Kết luận của Hội đồng:

+ Luận văn Đạt yêu cầu..... (đạt/không đạt yêu cầu)

+ Tính không trùng lặp nội dung và tên đề tài với các công trình công bố:

Tên và nội dung của luận văn không trùng lặp với các công trình đã công bố.....

11. Chủ tịch Hội đồng, công bố kết quả, yêu cầu học viên chỉnh sửa luận văn với các nội dung sau:

Luận văn đạt yêu cầu của một luận văn thạc sĩ. Đề nghị học viên chỉnh sửa luận văn theo ý kiến của hội đồng để hoàn thiện luận văn.....

Buổi họp đã kết thúc vào 11 giờ 05 phút ngày 09/05/2023.

Hà Nội, ngày 09 tháng 05 năm 2023.

THƯ KÝ HỘI ĐỒNG

Lê Thị Nguyễn Bình

CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG

Nguyễn Ngọc Minh

XÁC NHẬN CỦA CƠ SỞ ĐÀO TẠO

KT. GIÁM ĐỐC
PHÓ GIÁM ĐỐC




Nguyễn Thị Trung



BẢN NHẬN XÉT PHẢN BIỆN LUẬN VĂN THẠC SĨ

Họ và tên người nhận xét: Trần Minh Đức. Học hàm, học vị: Tiến sĩ
Chức danh trong Hội đồng: Phản biện 1
Cơ quan công tác: Viện Công nghệ sinh học, Viện HLKHCNVN
Họ và tên học viên: Lê Quang Huy
Tên đề tài: Nghiên cứu phát hiện vi nấm nội sinh từ một số cây dược liệu Việt Nam
Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm. Mã số: 8 42 01 14

NỘI DUNG NHẬN XÉT

1. Tính cấp thiết, tính thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận văn:

Trong bối cảnh các bệnh ung thư đang ngày một phổ biến và nghiêm trọng thì việc tìm kiếm các hợp chất thứ cấp có tác dụng chống ung thư là vô cùng cần thiết. Các hoạt chất thứ cấp được tách từ cây dược liệu là nguồn nguyên liệu quý trong sản xuất thuốc chống ung thư ở nước ta cũng như các nước trên thế giới. Tuy nhiên, để có được hoạt chất thứ cấp ổn định thì cần khối lượng cây dược liệu lớn và thời gian trồng dài ngày. Vì vậy, vi nấm nội cộng sinh trong cây dược liệu nổi lên như là một giải pháp thay thế hoàn hảo cho các cây dược vì các vi nấm này dễ nuôi cấy, có khả năng sản sinh các hợp chất thứ cấp có chất lượng cao như cây dược liệu. Đề tài có tính thời sự cao khi tập trung nghiên cứu phát hiện các chủng vi nấm từ một số cây dược liệu ở nước ta. Việc phát hiện và định danh các chủng vi nấm mới trong cây dược liệu có ý nghĩa khoa học và thực tiễn lớn khi đây sẽ là nguồn nguyên liệu sản sinh hợp chất thứ cấp có giá trị.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình khoa học, luận văn đã công bố ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo:

Đề tài nghiên cứu không trùng lặp với các công trình đã được công bố trước đó. Tài liệu tham khảo có tính trung thực cao và tin cậy.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung nghiên cứu cũng như với chuyên ngành và mã số đào tạo:

Đề tài nghiên cứu phù hợp với nội dung nghiên cứu và chuyên ngành đào tạo.

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp nghiên cứu đã sử dụng để hoàn thành luận văn:

Phương pháp nghiên cứu của đề tài rõ ràng, đã được áp dụng rãi trong nước và quốc tế. Ngoài ra, đề tài còn sử dụng các phương pháp nghiên cứu hiện đại và tin cậy.

5. Kết quả nghiên cứu của luận văn:

- Đã thu thập và định danh được một số cây dược liệu tại miền Bắc như: Cây Dừa cạn ở Đan Phượng và Phú Diễn, Hà Nội; Cây Bạch hoa xà thiệt thảo tại Hải Dương.

- Đã phân lập và định danh được 5 chủng vi nấm nội sinh từ các cây dược liệu. Các chủng thu được có quan hệ họ hàng với gần với 4 loài nấm bao gồm: *Albifimbria terrestris*, *Cladosporium colombiae*, *Cladosporium halotolerans*, và *Corynespora cassiicola*.

- Kiểm tra sơ bộ thấy rằng các chủng nấm thi được có khả năng sinh hoạt chất chống ung thư.

6. Những hạn chế, thiếu sót của luận văn về nội dung, hình thức và câu hỏi:

- Luận văn còn nhiều lỗi chính tả
- Cần trích dẫn tài liệu tham cho các thông tin khoa học đưa ra trong luận văn. Cần bổ sung hoặc trích dẫn tài liệu tham ở các trang: Trang 7, trang 8, trang 22, trang 23.
- Ở phần kết quả nghiên cứu, mục 3.2.4. cần giải thích kỹ hơn về kết quả thí nghiệm.
- Ở phần Danh mục công trình của tác giả trang 61, cần liệt kê bài báo giống như bài báo trong phần tài liệu tham khảo và bôi đậm tên học viên để người đọc có thể dễ dàng theo dõi.

7. Nếu tác giả chưa viết bài báo khoa học thì nội dung của luận văn có thể được viết thành các bài báo để gửi đăng trên tạp chí khoa học, sách chuyên ngành hoặc tuyển tập công trình hội nghị khoa học cấp quốc gia, quốc tế hay không?

.....

.....

.....

.....

.....

8. Kết luận chung (khẳng định mức độ đáp ứng các yêu cầu đối với một luận văn Thạc sĩ; luận văn có thể đưa ra bảo vệ để nhận học vị Thạc sĩ được hay không?): Có

Luận văn đáp ứng yêu cầu đối với một luận văn thạc sĩ

Luận văn có thể đưa ra bảo vệ để nhận học vị Thạc sĩ.

Hà Nội, ngày 08 tháng 05 năm 2023

Người nhận xét
(Ký, ghi rõ họ tên)



Trần Minh Đức

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

BẢN NHẬN XÉT PHẢN BIỆN LUẬN VĂN THẠC SĨ

Họ và tên người nhận xét: Trương Quốc Phong; Học hàm, học vị: PGS.TS
Chức danh trong Hội đồng: Phản biện
Cơ quan công tác: Đại học Bách khoa Hà Nội
Họ và tên học viên: Lê Quang Huy
Tên đề tài: Nghiên cứu phát hiện vi nấm nội sinh từ một số cây dược liệu Việt Nam

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm.

Mã số: 8 42 01 14

NỘI DUNG NHẬN XÉT

1. Tính cấp thiết, tính thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận văn:

Việt Nam là nước nhiệt đới với nguồn tài nguyên thiên nhiên phong phú và đa dạng. Trong đó có rất nhiều thực vật là các cây thuốc có giá trị phòng và điều trị nhiều loại bệnh khác nhau. Vi sinh vật nội sinh sống trong các mô khỏe mạnh của thực vật trong ít nhất một phần vòng đời của chúng mà không gây ra bất kỳ triệu chứng bệnh rõ ràng nào trên vật chủ của chúng. Nấm nội sinh liên quan đến cây thuốc có thể sản xuất các hợp chất giống hoặc tương tự như các hợp chất có nguồn gốc từ cây thuốc Do đó, việc phân lập và nghiên cứu các điều kiện nuôi cấy nhằm tìm kiếm các chủng nấm nội sinh và nâng cao khả năng sinh tổng hợp các hợp chất có hoạt tính là rất có ý nghĩa. Vì vậy, đề tài luận văn “Nghiên cứu phát hiện vi nấm nội sinh từ một số cây dược liệu Việt Nam” của học viên Lê Quang Huy là cần thiết và có ý nghĩa cả về khoa học và thực tiễn.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình khoa học, luận văn đã công bố ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo:

- Theo hiểu biết và thông tin có được của người viết nhận xét thì luận văn này không trùng lặp với các công trình khoa học khác.
- Các tài liệu tham khảo được trích dẫn trung thực và đầy đủ.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung nghiên cứu cũng như với chuyên ngành và mã số đào tạo:

- Tên đề tài là phù hợp với nội dung nghiên cứu cũng như chuyên ngành và mã số đào tạo

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp nghiên cứu đã sử dụng để hoàn thành luận văn:

- Luận văn đã sử dụng các phương pháp nghiên cứu hiện đại và phù hợp với nội dung nghiên cứu.

5. Kết quả nghiên cứu của luận văn:

- Đã phân lập được 5 chủng nấm nội sinh từ các mô lá, thân và rễ của cây Dừa cạn và cây Bạch hoa xà thiệt thảo. Các chủng nấm được xác định có quan hệ gần với 4 loài nấm: *Albifimbria terrestris*, *Cladosporium colombiae*, *Cladosporium halotolerans*, và *Corynespora cassiicola* dựa trên hình thái và trình tự ITS.

6. Những hạn chế, thiếu sót của luận văn về nội dung, hình thức và câu hỏi:

- Cần có biện luận cơ sở nào hoặc lý do gì mà cần phải giải mã 2 – 3 đoạn gen đối với mỗi loại thực vật để định danh.
- Cần làm rõ kích thước sản phẩm PCR của cả 5 mẫu là như nhau (Hình 3.10) nhưng kết quả giải trình tự lại khác nhau (trang 49-50) và kết quả trong bảng 3.5 không phản ánh đúng kết quả giải trình tự thu được về kích thước đoạn gen.
- Cần bổ sung tổng quan về vinblastin và vincristin có hoạt tính chống ung thư? trên cơ sở đó thì kết quả 3.2.4 mới có ý nghĩa.
- Cần bổ sung tổng quan hoặc trình bày cơ sở khoa học của việc sử dụng thuốc thử dragendoff phát hiện đặc hiệu vinblastin và vincristin.

7. Nếu tác giả chưa viết bài báo khoa học thì nội dung của luận văn có thể được viết thành các bài báo để gửi đăng trên tạp chí khoa học, sách chuyên ngành hoặc tuyển tập công trình hội nghị khoa học cấp quốc gia, quốc tế hay không?

- Có

8. Kết luận chung (khẳng định mức độ đáp ứng các yêu cầu đối với một luận văn Thạc sĩ; luận văn có thể đưa ra bảo vệ để nhận học vị Thạc sĩ được hay không?):

- Luận văn còn một số điểm cần bổ sung, làm rõ, tuy nhiên trên tổng thể thì nội dung đã đáp ứng được yêu cầu đối với một luận văn Thạc sĩ.
- Luận văn có thể đưa ra bảo vệ để nhận học vị Thạc sĩ.

Hà Nội, ngày 08. tháng . 05 năm 2023

Người nhận xét
(Ký, ghi rõ họ tên)



PGS.TS Trương Quốc Phong

**BẢN GIẢI TRÌNH CHỈNH SỬA LUẬN VĂN
THEO KẾT LUẬN CỦA HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN VĂN THẠC SĨ**

Họ tên học viên: Lê Quang Huy

Lớp: 2019B

Tên đề tài luận văn: Nghiên cứu phát hiện vi nấm nội sinh từ một số cây dược liệu Việt Nam

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8 42 01 14

Người hướng dẫn khoa học: GS.TS. Nguyễn Huy Hoàng

Ngày bảo vệ luận văn: 09/05/2023

Căn cứ biên bản họp hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ và 5 nhận xét của các thành viên hội đồng, học viên đã nghiêm túc tiếp thu và chỉnh sửa luận văn theo các ý kiến góp ý của hội đồng đánh giá, chi tiết như sau:

STT	Nội dung đề nghị bổ sung, chỉnh sửa	Nội dung đã bổ sung, chỉnh sửa
1	<ul style="list-style-type: none">- Cần viết lại mục tiêu cho tổng quát và súc tích hơn. Phần có sở khoa học và tính thực tiễn đưa sang tổng quan. Phần tổng quan nên sắp xếp và viết ngắn gọn lại cho phù hợp và logic với tên đề tài.- Hình ảnh minh họa cần trích dẫn cụ thể vào các mục trong luận văn.	<ul style="list-style-type: none">- Đã đưa phần cơ sở khoa học và tính thực tiễn sang phần tổng quan. Đã viết lại phần tổng quan, sắp xếp lại phần tổng quan phù hợp với tên đề tài. (Trang 2, 3, 11, 12)- Đã trích dẫn các hình ảnh cụ thể vào trong luận văn. (Trang 4, 6, 29, 33, 35-48)
2	<ul style="list-style-type: none">- Thêm trích dẫn tài liệu tham khảo cho các trang 7, 8, 22, 23, 32, 33.- Danh mục công trình của tác giả, cần liệt kê bài báo giống	<ul style="list-style-type: none">- Đã thêm tích dẫn tài liệu tham khảo vào các trang theo ý kiến của Hội đồng (Trang, 7, 8, 22, 23, 32, 33)- Đã liệt kê công trình của tác giả theo



	<p>như trong phần tài liệu tham khảo và bồi đắp tên học viên.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Cần giải thích kỹ hơn về kết quả thí nghiệm mục 3.2.4 	<p>giống như phần tài liệu tham khảo và đã bồi đắp tên của tác giả cho dễ nhận biết. (Trang 62)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Đã giải thích lại kết quả thí nghiệm mục 3.2.4 (Trang 59, 60)
3	<ul style="list-style-type: none"> - Cần có biện luận lý do cần giải mã 2-3 đoạn gen đối với mỗi loài thực vật để định danh. - Cần làm rõ kích thước sản phẩm PCR của cả 5 mẫu vi nấm nội sinh - Cần bổ sung tổng quan về vinblastin và vincristin có hoạt tính chống ung thư 	<ul style="list-style-type: none"> - Đã thêm phần biện luận lý do cần giải mã 2-3 đoạn gen đối với mỗi loài thực vật để định danh (Trang 29) - Đã làm rõ lại kích thước sản phẩm PCR của cả 5 mẫu vi nấm nội sinh phân lập được (Trang 49-51) - Đã bổ sung thêm phần tổng quan về vinblastin và vincristin có hoạt tính chống ung thư (Trang 13-15)
4	<ul style="list-style-type: none"> - Bổ sung thông tin về gen trnL, RbcL - Nên giải thích rõ hơn về phương pháp xác định khả năng sinh hoạt chất chống ung thư ở nấm phân lập được. 	<ul style="list-style-type: none"> - Đã bổ sung thêm thông tin về gen trnL, RbcL (Trang 24) - Đã giải thích rõ về phương pháp xác định khả năng sinh hoạt tính chống ung thư của các chủng vi nấm nội sinh phân lập được (Trang 32, 33)
5	<ul style="list-style-type: none"> - Còn nhiều lỗi câu, lỗi chính tả. Viết lại kết luận và kiến nghị. (Trang 61) 	<ul style="list-style-type: none"> - Đã chỉnh sửa lại lỗi câu, chính tả. Đã viết lại phần kết luận và kiến nghị cho phù hợp với kết quả của luận văn.

Hà Nội, ngày 22 tháng 05 năm 2023

CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG

TẬP THỂ HƯỚNG DẪN

HỌC VIÊN





GS. TS. Nghiêm Ngọc Minh

GS. TS. Nguyễn Huy Hoàng

Lê Quang Huy

XÁC NHẬN CỦA CƠ SỞ ĐÀO TẠO



**KI. GIÁM ĐỐC
PHÓ GIÁM ĐỐC**



Nguyễn Thị Trung