

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Trần Thị Hoa

**NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP VI NÂM
NỘI SINH TỪ CÂY DƯỢC LIỆU BÁT GIÁC LIÊN
VÀ ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG SINH HOẠT
CHẤT PODOPHYLLOTOXIN VÀ CÁC DẪN XUẤT**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC ỨNG DỤNG

Hà Nội - 2025

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

Trần Thị Hoa

NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP VI NẤM
NỘI SINH TỪ CÂY DƯỢC LIỆU BÁT GIÁC LIÊN
VÀ ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG SINH HOẠT
CHẤT PODOPHYLLOTOXIN VÀ CÁC DẪN XUẤT

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC ỨNG DỤNG

Ngành: Công nghệ sinh học

Mã số: 9 42 02 01

Xác nhận của Học viện
Khoa học và Công nghệ

Người hướng dẫn 1
(Ký, ghi rõ họ tên)

Người hướng dẫn 2
(Ký, ghi rõ họ tên)

TS. Trần Hồ Quang

PGS.TS. Phạm Bích Ngọc

Hà Nội - 2025

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan luận án: "*Nghiên cứu phân lập vi nấm nội sinh từ cây dược liệu Bát Giác Liên và đánh giá khả năng sinh hoạt chất podophyllotoxin và các dẫn xuất*" là công trình nghiên cứu của chính mình dưới sự hướng dẫn khoa học của tập thể hướng dẫn. Luận án sử dụng thông tin trích dẫn từ nhiều nguồn tham khảo khác nhau và các thông tin trích dẫn được ghi rõ nguồn gốc. Các kết quả nghiên cứu của tôi được công bố chung với các tác giả khác đã được sự nhất trí của đồng tác giả khi đưa vào luận án. Các số liệu, kết quả được trình bày trong luận án là hoàn toàn trung thực và chưa từng được công bố trong bất kỳ một công trình nào khác ngoài các công trình công bố của tác giả. Luận án được hoàn thành trong thời gian tôi làm nghiên cứu sinh tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Hà Nội, ngày 24 tháng 11 năm 2025

Tác giả luận án

(Ký và ghi rõ họ tên)



Trần Thị Hoa

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành được luận án này, tôi xin gửi lời cảm ơn sâu sắc nhất tới hai thầy hướng dẫn TS. Trần Hồ Quang và PGS.TS. Phạm Bích Ngọc đã tạo mọi điều kiện thuận lợi nhất để tôi nghiên cứu và hoàn thành tốt chương trình học của mình. Hai thầy đã định hướng nghiên cứu, sửa bản thảo về kết quả và cho tôi những lời khuyên quý báu, đúng đắn trong suốt quá trình nghiên cứu và hoàn thành luận án.

Tôi xin chân thành cảm ơn GS.TS. Chu Hoàng Hà, TS. Đỗ Tiến Phát, ThS. Nguyễn Thị Hồng Hà, ThS. Nguyễn Thu Giang, ThS. Trần Thị Huyền và tập thể cán bộ Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Sinh học đã luôn giúp đỡ, chia sẻ những kiến thức hữu ích và tạo những điều kiện tốt nhất cho tôi trong suốt quá trình thực hiện luận án.

Tôi xin trân trọng cảm ơn đến tập thể cán bộ nghiên cứu Phòng Thử nghiệm sinh học, Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ Gen, Trung tâm Giống và Bảo tồn nguồn gen Vi sinh vật, Phòng Dược liệu biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Luận án được thực hiện nhờ sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài TĐCNSH cấp Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, mã số TĐCN.01/20-22 do TS. Trần Hồ Quang làm chủ nhiệm.

Tôi xin chân thành cảm ơn đến Ban Lãnh đạo, phòng Đào tạo, các phòng chức năng của Khoa Công nghệ sinh học - Học viện Khoa học và Công nghệ, các phòng chức năng của Viện Sinh học đã hướng dẫn và giúp đỡ tôi trong suốt thời gian học tập và hoàn thành luận án.

Đặc biệt, tôi vô cùng biết ơn bố, mẹ, chồng, các con và tất cả các thành viên trong đại gia đình thân yêu của tôi. Nhờ những động viên, khích lệ, đồng hành và chia sẻ khó khăn của những người thân trong gia đình mà tôi thực sự quyết tâm và nghị lực cao trong quá trình nghiên cứu để hoàn thành luận án này.

Hà Nội, ngày 24 tháng 11 năm 2025

Tác giả luận án

(Ký và ghi rõ họ tên)

Trần Thị Hoa

MỤC LỤC

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT	i
DANH MỤC BẢNG	ii
DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ	iv
MỞ ĐẦU	1
Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU.....	4
1. Tổng quan về cây Bát Giác Liên và vi nấm nội sinh liên quan	4
1.1. Giới thiệu chung về cây Bát Giác Liên và vi nấm nội sinh.....	4
1.1.1. Đặc điểm sinh học và phân bố.....	4
1.1.2. Thành phần hóa học và tác dụng dược lý của cây Bát Giác Liên	5
1.1.3. Ứng dụng của cây Bát Giác Liên trong Y học cổ truyền.....	6
1.2. Vi nấm nội sinh và mối quan hệ với cây chủ.....	6
1.2.1. Sơ lược về vi nấm nội sinh.....	6
1.2.2. Mối quan hệ giữa vi nấm nội sinh và cây chủ.....	7
1.2.3. Đa dạng vi nấm nội sinh thực vật	9
2. Podophyllotoxin, các dẫn xuất và vi nấm nội sinh.....	11
2.1. Tổng quan về podophyllotoxin và các dẫn xuất	11
2.1.1. Giới thiệu về podophyllotoxin và các dẫn xuất.....	11
2.1.2. Hoạt tính sinh học của podophyllotoxin và các dẫn xuất	13
2.1.3. Con đường sinh tổng hợp podophyllotoxin trong thực vật.....	15
2.2. Nghiên cứu về podophyllotoxin từ vi nấm nội sinh	17
2.2.1. Tình hình nghiên cứu thu nhận podophyllotoxin và các dẫn xuất từ vi nấm nội sinh trên thế giới.....	17
2.2.2. Các nghiên cứu về gen và hệ gen liên quan đến chuyển hoá lignan ở vi nấm.....	20
2.2.3. Các gen chức năng tham gia con đường chuyển hoá podophyllotoxin và các dẫn xuất ở vi nấm.....	23
3. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình sinh tổng hợp podophyllotoxin và các dẫn xuất của nó từ vi nấm nội sinh	25
3.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ	25
3.2. Ảnh hưởng của pH.....	25
3.3. Ảnh hưởng của tốc độ lắc và thể tích dịch lên men.....	256
3.4. Ảnh hưởng của thời gian.....	26
3.5. Ảnh hưởng của nguồn carbon và nitơ.....	27
3.6. Ảnh hưởng của tỷ lệ giống	27
3.7. Ảnh hưởng của nguồn cơ chất cảm ứng.....	28
Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	29

2.1.	ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU	29
2.1.1.	Vật liệu nghiên cứu	29
2.1.2.	Thiết bị và hóa chất nghiên cứu.....	29
2.2.	PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	30
2.2.1.	Phương pháp thu thập mẫu cây dược liệu.....	30
2.2.2.	Phương pháp định danh mẫu dược liệu nghiên cứu	31
2.2.3.	Phương pháp chiết xuất thực vật từ mẫu rễ cây Bát Giác Liên.....	312
2.2.4.	Phương pháp phân lập và định loại vi nấm nội sinh.....	32
2.2.5.	Phương pháp sàng lọc các chủng nấm nội sinh sinh hoạt chất podophyllotoxin và các dẫn xuất	36
2.2.6.	Phương pháp xác định hoạt tính gây độc tế bào của chiết xuất nấm.....	37
2.2.7.	Phương pháp xác định hoạt tính kháng khuẩn của chiết xuất nấm	38
2.2.8.	Phương pháp nghiên cứu hệ gen của nấm nội sinh có khả năng sinh tổng hợp podophyllotoxin	39
2.2.9.	Phương pháp xác định điều kiện lên men thích hợp cho nấm sinh tổng hợp podophyllotoxin và các dẫn xuất	40
2.2.10.	Phương pháp phân lập chất podophyllotoxin bằng sắc ký cột (Column chromatography - CC).....	43
2.2.11.	Phương pháp xác định cấu trúc hóa học	43
2.2.12.	Phương pháp đánh giá tác dụng chống oxy hóa.....	43
2.2.13.	Phương pháp xử lý số liệu.....	44
2.2.14.	Sơ đồ nghiên cứu tổng quát trong luận án	45
Chương 3. KẾT QUẢ.....		46
3.1.	Phân lập, định danh và sàng lọc chủng nấm nội sinh sản sinh hoạt chất podophyllotoxin.....	46
3.1.1.	Thu thập mẫu cây Bát Giác Liên	46
3.1.2.	Phân lập, định danh, xây dựng cây phát sinh chủng loại và phân tích chỉ số đa dạng của các chủng nấm nội sinh	47
3.1.3.	Sàng lọc và tuyển chọn chủng <i>Penicillium herquei</i> HGN12.1R có khả năng sinh hoạt chất podophyllotoxin và dẫn xuất.....	57
3.1.4.	Đặc điểm sinh học của chủng <i>Penicillium herquei</i> HGN12.1R đã tuyển chọn	63
3.2.	Đặc điểm hệ gen của chủng <i>Penicillium herquei</i> HGN12.1R	66
3.2.1.	Kết quả tách chiết DNA	66
3.2.2.	Giải trình tự và phân tích hệ gen	66
3.2.3.	Kết quả chú giải hệ gen.....	68

3.2.4.	Dự đoán các nhóm gen liên quan đến sinh tổng hợp podophyllotoxin ở chủng <i>Penicillium herquei</i> HGN12.1R.....	68
3.3.	Xác định điều kiện thích hợp cho sản sinh podophyllotoxin và các dẫn xuất từ <i>Penicillium herquei</i> HGN12.1R bằng công nghệ lên men.	72
3.3.1.	Ảnh hưởng của môi trường	72
3.3.2.	Ảnh hưởng của pH và nhiệt độ.....	73
3.3.3.	Ảnh hưởng của thời gian nhân giống và tỷ lệ giống.....	74
3.3.4.	Ảnh hưởng của độ thông khí đến khả năng sinh trưởng của các chủng nấm.....	76
3.3.5.	Ảnh hưởng nguồn cacbon, nitơ, muối khoáng tới sinh trưởng của <i>Penicillium herquei</i> HGN12.1R	77
3.3.6.	Ảnh hưởng của tiền chất đến sinh trưởng của các chủng nấm.....	80
3.4.	Lên men, thu hồi, xác định cấu trúc và đánh giá hoạt tính sinh học của các hợp chất từ <i>Penicillium herquei</i> HGN12.1R	82
3.4.1.	Động thái quá trình lên men	82
3.4.2.	Tách chiết, tinh sạch và xác định cấu trúc các hợp chất	84
3.4.3.	Đánh giá hoạt tính sinh học của các hợp chất	87
	Chương 4. THẢO LUẬN	90
4.1.	Phân lập, định danh, sàng lọc và nghiên cứu đặc điểm sinh học của chủng nấm nội sinh <i>Penicillium herquei</i> HGN12.1R từ cây Bát Giác Liên sản sinh PTOX và các dẫn xuất.	90
4.2.	Nghiên cứu đặc điểm và chú giải hệ gen của chủng nấm nội sinh <i>Penicillium herquei</i> HGN12.1R	96
4.3.	Xác định điều kiện thích hợp cho quá trình lên men, tách chiết, tinh sạch và xác định cấu trúc các hợp chất từ <i>Penicillium herquei</i> HGN12.1R	100
4.3.1.	Xác định điều kiện lên men thích hợp	101
4.3.2.	Lên men và tách chiết, tinh sạch và xác định cấu trúc các hợp chất từ <i>Penicillium herquei</i> HGN12.1R	103
4.3.3.	Đánh giá hoạt tính chống oxy hóa và hoạt tính gây độc tế bào của các hợp chất từ <i>Penicillium herquei</i> HGN12.1R.....	107
4.4.	Những hạn chế và hướng nghiên cứu tiếp theo.....	109
	KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	111
	DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN.....	112
	DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO	113

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

Các chữ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
BGL		Bát Giác Liên
Bp	Base pair	Cặp cơ sở
CC	Colum chromatography	Sắc kí cột
CSDL	Database	Cơ sở dữ liệu
DNA	Deoxyribonucleic acid	Phân tử mang thông tin di truyền
DPTOX	Deoxypodophyllotoxin	Dẫn xuất của podophyllotoxin
<i>D. difformis</i>	<i>Dysosma difformis</i>	Tên khoa học của cây Bát Giác Liên
GPS	Global Positioning System	Hệ thống định vị toàn cầu
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	Sắc kí lỏng hiệu năng cao
HepG2	Liver cancer cells	Tế bào ung thư gan
HL-60	Acute leukemia cells	Tế bào bạch cầu cấp tính
IC ₅₀	Half maximal inhibitory concentration	Nồng độ ức chế ở 50%
ITS	Internal transcribed spacer	Vùng đệm phiên mã bên trong
Kb	Kilobase	
L, T, R	Leaves, Stems, Roots	Lá, Thân, Rễ
LC-MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry.	Sắc ký lỏng-phổ khối
MS	Mass Spectrometry	Khối phổ
NCI	National Cancer Institute	Viện Ung thư Quốc gia Hoa Kỳ
NMR	Nuclear Magnetic Resonance	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân
OD	Optical Density	Mật độ quang
PTOX	Podophyllotoxin	Một lignans, có nguồn gốc từ một số loại thực vật
PCR	Polymerase Chain Reaction	Phản ứng chuỗi polymerase
PDA	Potato Dextrose Agar	Môi trường thạch khoai tây
Rf	Retention time	Thời gian lưu
SK-LU-1	Lung cancer cells	Tế bào ung thư phổi
TLC	Thin layer Chromatography	Sắc ký lớp mỏng
UV	ultraviolet	Tia cực tím
v/p	rpm	vòng/phút
VNNS	Endophytic fungi	Vi nấm nội sinh
VSV	Microorganism	Vi sinh vật
WGS	Whole Genome Sequencing	Toàn bộ hệ gen

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1.	Nấm nội sinh sản sinh podophyllotoxin và cây ký chủ của chúng	9
Bảng 1.2.	Hàm lượng của podophyllotoxin (PTOX), demethylpodophyllotoxin (Dm PTOX) và deoxypodophyllotoxin (DPTOX) ở các loài khác nhau của chi <i>Juniperus</i>	19
Bảng 1.3.	Vai trò xúc tác của các gen trong chuyển đổi coniferyl alcohol thành PTOX	23
Bảng 2.1.	Thành phần của phản ứng PCR/tổng thể tích mẫu.....	31
Bảng 3.1.	Thông tin số lượng mẫu cây thu nhận được	47
Bảng 3.2.	Mức độ tương đồng của vùng rbcL của mẫu nghiên cứu với một số trình tự trên Genbank.....	47
Bảng 3.3.	Kết quả phân lập vi nấm nội sinh trên cây BGL theo khu vực lấy mẫu.....	48
Bảng 3.4.	Mô tả hình thái của nấm nội sinh phân lập từ các mô khác nhau của cây BGL (<i>Dysosma difformis</i>) Hà Giang và Lai Châu	49
Bảng 3.5.	Các chỉ số đa dạng đặc trưng của nấm nội sinh phân lập từ các mô của <i>D. difformis</i>	56
Bảng 3.6.	Chỉ số tương tự Sorenson cho nấm sợi sinh của <i>D. difformis</i>	57
Bảng 3.7.	Các chỉ số đa dạng đặc trưng cho vị trí lấy mẫu của các loài nấm nội sinh phân lập từ <i>D. difformis</i>	57
Bảng 3.8.	Hoạt tính gây độc tế bào IC ₅₀ của 53 chiết xuất nấm gây độc trên dòng tế bào SK-LU-1.....	59
Bảng 3.9.	Hoạt tính gây độc tế bào IC ₅₀ của các chiết xuất nấm trên hai dòng tế bào ung thư HL-60 và HepG2	60
Bảng 3.10.	Dữ liệu HPLC để xác định PTOX.....	61
Bảng 3.11.	Đặc điểm hình thái chủng HGN12.1R.....	63
Bảng 3.12.	Đặc điểm sinh học của <i>Penicillium herquei</i> HGN12.1R.....	64
Bảng 3.13.	Hoạt tính kháng khuẩn của chiết xuất nấm HGN12.1R	65
Bảng 3.14.	Nồng độ và độ tinh sạch mẫu DNA tổng số của nấm	66
Bảng 3.15.	Đặc điểm hệ gen và số liệu lắp ráp hệ gen của <i>Penicillium herquei</i> HGN12.1R.....	67
Bảng 3.16.	Thống kê kết quả dự đoán các gen liên quan đến con đường sinh tổng hợp podophyllotoxin ở <i>Penicillium herquei</i> HGN12.1R giai đoạn từ coniferyl alcohol tới podophyllotoxin (E-value <1e ⁻¹⁰).....	71
Bảng 3.17.	Vai trò của môi trường nuôi cấy tới sinh trưởng của <i>Penicillium herquei</i> HGN12.1R	72

Bảng 3.18. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng sinh trưởng của nấm HGN12.1R.....	73
Bảng 3.19. Ảnh hưởng của pH đến khả năng sinh trưởng của nấm <i>Penicillium herquei</i> HGN12.1R	74
Bảng 3.20. Ảnh hưởng của thời gian nhân giống đến khả năng sinh trưởng của <i>Penicillium herquei</i> HGN12.1R.....	74
Bảng 3.21. Ảnh hưởng của tỷ lệ giống đến khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp của <i>Penicillium herquei</i> HGN12.1R	75
Bảng 3.22. Ảnh hưởng của tốc độ lắc đến khả năng sinh trưởng của <i>Penicillium herquei</i> HGN12.1R.....	76
Bảng 3.23. Ảnh hưởng của thể tích môi trường nuôi/thể tích bình đến khả năng sinh trưởng của <i>Penicillium herquei</i> HGN12.1R.....	77
Bảng 3.24. Ảnh hưởng của nguồn cacbon tới sinh trưởng của <i>Penicillium herquei</i> HGN12.1R.....	77
Bảng 3.25. Ảnh hưởng của nguồn nitơ tới sinh trưởng của <i>Penicillium herquei</i> HGN12.1R.....	78
Bảng 3.26. Ảnh hưởng của nguồn muối khoáng tới sinh trưởng của <i>Penicillium herquei</i> HGN12.1R.....	80
Bảng 3.27. Ảnh hưởng của tiền chất tới sinh trưởng của <i>Penicillium herquei</i> HGN12.1R.....	81
Bảng 3.28. Động thái lên men của chủng <i>Penicillium herquei</i> HGN12.1R trên thiết bị lên men 5-10 lít/mẻ.	82
Bảng 3.29. Giá trị EC ₅₀ của các chất phân lập từ chủng HGN12.1R	88
Bảng 3.30. Khả năng gây độc tế bào của mẫu nghiên cứu.....	89

DANH MỤC HÌNH VẼ

Hình 1.1.	Bát Giác Liên - <i>Podophyllum tonkinense</i> Gagnep.....	4
Hình 1.2.	Cấu trúc hoá học của podophyllotoxin	11
Hình 1.3.	Cấu trúc hoá học của etoposide và teniposide	12
Hình 1.4.	Cấu trúc hoá học của (A) Deoxypodophyllotoxin (B) Epipodophyllotoxin; (C) PTOX derivative	13
Hình 1.5.	Con đường sinh tổng hợp podophyllotoxin.	16
Hình 1.6.	Thời gian lên men <i>Aspergillus fumigatus</i> Fresenius sinh tổng hợp deoxypodophyllotoxin	26
Hình 2.1.	Sơ đồ nghiên cứu tổng quát trong luận án	45
Hình 3.1.	Thân và rễ cây Bát Giác Liên, mẫu thu tại Hà Giang và Lai Châu	46
Hình 3.2.	Khử trùng bề mặt mẫu trước khi phân lập	48
Hình 3.3.	Phân lập vi nấm nội sinh.....	48
Hình 3.4.	Hình thái khuẩn lạc của 28 chủng được phân lập từ cây BGL (<i>Dysosma difformis</i>) thu thập tại Hà Giang.....	52
Hình 3.5.	Hình thái khuẩn lạc của 25 chủng được phân lập từ cây BGL (<i>Dysosma difformis</i>) thu thập tại Lai Châu	53
Hình 3.6	Cây phát sinh loài của các nấm nội sinh phân lập từ mẫu cây <i>Dysosma difformis</i> _ Hà Giang.	54
Hình 3.7.	Cây phát sinh loài của các nấm nội sinh phân lập từ mẫu cây <i>Dysosma difformis</i> _ Lai Châu.	55
Hình 3.8.	Lên men và chiết xuất nấm (1: lên men; 2: lọc thu sinh khối nấm tươi; 3: sinh khối khô; 4: dịch chiết methanol tổng; 5: chiết xuất nấm).....	58
Hình 3.9.	Phân tích TLC của chiết xuất nấm nội sinh HGN13R, LCN8T, LCN3T, HGN12.1R, HGN12.2R và HGN13.1R; Podophyllotoxin được sử dụng làm chuẩn, đối chứng dương (P); môi trường không có nấm được sử dụng làm đối chứng âm (N).....	60
Hình 3.10.	Xác định PTOX bằng HPLC-DAD.....	62
Hình 3.11.	Biểu đồ hoạt tính kháng khuẩn của chiết xuất nấm HGN12.1R.....	65
Hình 3.12.	Hoạt tính kháng khuẩn trên đĩa thạch của chiết xuất nấm HGN12.1R..	65
Hình 3.13.	Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm tách DNA	66
Hình 3.14.	Biểu đồ Venn chú giải gen chức năng trên các CSDL RefSeq, Uniprot, Gene Onology, Pfam và KEGG của nấm <i>Penicillium herquei</i> HGN12.1R	68
Hình 3.15.	Các enzyme liên quan tới giai đoạn đầu hình thành coniferyl alcohol ..	69

Hình 3.16. Các gen tham gia vào quá trình chuyển hoá từ coniferyl alcohol đến podophyllotoxin.....	70
Hình 3.17. TLC xác định sự có mặt của Chất/tiền chất ở các môi trường khác nhau ảnh hưởng tới sinh trưởng của <i>Penicillium herquei</i> HGN12.1R.	73
Hình 3.18. Ảnh hưởng của nhiệt độ tới sinh trưởng của nấm HGN12.1R	73
Hình 3.19. Ảnh hưởng của pH tới sinh trưởng, màu sắc của nấm HGN12.1R	74
Hình 3.20. Lượng sinh khối nấm hình thành ở các thời gian nhân giống khác nhau của chủng <i>Penicillium herquei</i> HGN12.1R	75
Hình 3.21. Ảnh hưởng % nhân giống tới khả năng sinh trưởng của chủng <i>Penicillium herquei</i> HGN12.1R.....	76
Hình 3.22. Sắc ký lớp mỏng (TLC) của chiết xuất nấm trên các môi trường có nguồn đường khác nhau.....	78
Hình 3.23. Ảnh hưởng của các nguồn nitơ khác nhau tới sinh trưởng của chủng <i>Penicillium herquei</i> HGN12.1R	79
Hình 3.24. Sắc ký lớp mỏng (TLC) của chiết xuất nấm trên các nguồn nitơ khác nhau	79
Hình 3.25. Ảnh hưởng của nguồn muối khoáng tới sinh trưởng của <i>Penicillium herquei</i> HGN12.1R.....	80
Hình 3.26. Sắc ký lớp mỏng (TLC) ảnh hưởng của tiền chất tới lên men chủng <i>Penicillium herquei</i> HGN12.1R.....	81
Hình 3.27. Biểu đồ động thái lên men <i>Penicillium herquei</i> HGN12.1R.....	83
Hình 3.28. Sắc ký lớp mỏng (TLC) của chiết xuất nấm theo thời gian lên men trên hệ thống 5-10 lít/mẻ.....	83
Hình 3.29. Các công đoạn lên men, thu hồi sản phẩm và tách chiết xuất nấm <i>Penicillium herquei</i> HGN12.1R.....	84
Hình 3.30. Sơ đồ chiết phân lớp của mẫu VN-12C	85
Hình 3.31. Sơ đồ chiết phân lập hợp chất từ phân đoạn VN-12C-D.....	85
Hình 3.32. Cấu trúc phân tử của hợp chất VN-12C-03	86
Hình 3.33. Cấu trúc hóa học của hợp chất VN-12C-06.....	87

MỞ ĐẦU

Cây Bát Giác Liên với tên khoa học là *Dysosma difformis* (Hemsl & E.H. Wilson) T.H.Wang, được biết đến như một loại thảo mộc đặc biệt thuộc họ *Berberidaceae*. Nó đã được người dân Việt Nam sử dụng rộng rãi như một phương thuốc dân gian để điều trị nhiều bệnh lý khác nhau như rắn cắn, sung tẩy, áp xe vú, nhọt độc, ho đờm và thậm chí là ung thư vú. Việc sử dụng thảo dược này được ghi nhận là rất hiệu quả và ít hoặc không gây ra tác dụng phụ đáng kể [1]. Hơn nữa, hiệu quả chữa bệnh của nó đã được các nghiên cứu khoa học chứng minh rõ ràng, xác định được bảy hợp chất chính có hoạt tính sinh học bao gồm podophyllotoxin (1) và các dẫn xuất khác như quercetin (2), rutin (3), kaempferol (4), nicotiflorin (5), α -peltatin (6), deoxypodophyllotoxin (7), tất cả đều được phân lập từ phần thân rễ dưới mặt đất của cây Bát Giác Liên [2], hầu hết các hợp chất này đều có hoạt tính dược lý phổ rộng. Do có những hoạt tính quý này nên việc khai thác quy mô lớn có thể dẫn đến suy thoái đối với loài cây này trong hệ sinh thái. Hiện nay, loài Bát Giác Liên được đưa vào nhóm thực vật đang nguy cấp trong sách đỏ Việt Nam 2007 [3]. Để bảo tồn và thay thế nguồn nguyên liệu quý hiếm này, các nhà khoa học đang hướng đến việc nghiên cứu các gen liên quan đến quá trình trao đổi chất, đặc biệt là các gen trong con đường tổng hợp các hợp chất có hoạt tính làm thuốc. Đồng thời, họ cũng tìm kiếm các phương pháp nhằm tăng cường sản lượng các hợp chất này.

Podophyllotoxin (PTOX) là một chất chuyển hóa có hoạt tính sinh học phổ rộng, được tìm thấy trong cả thực vật và nấm nội sinh. PTOX là chất gây độc tế bào và được sử dụng làm chất, tiền chất trong quá trình sinh tổng hợp thuốc chống ung thư ít độc hơn các hợp chất như teniposide, etoposide [4]. Chất này được chứng minh sử dụng hiệu quả cho ung thư phổi, u tinh hoàn, u nguyên bào thần kinh, u gan và các khối u khác [5], [6], v.v. Việc điều trị bằng deoxypodophyllotoxin (DPTOX) - một dẫn xuất của PTOX - đã được chứng minh làm giảm đáng kể sự gia tăng của tế bào DU-145. DPTOX đạt được hiệu quả này thông qua việc kích hoạt caspase-3 (một protease quan trọng trong quá trình phân hủy DNA), dẫn đến tăng cường quá trình chết tế bào theo chương trình (apoptosis). Ngoài ra, DPTOX còn tác động đến con đường truyền tín hiệu trong tế bào, làm giảm mức phosphoryl hóa Akt và kích hoạt con đường Bax/PTEN trong các tế bào DU-145 [7]. Gần đây, PTOX đã được tìm thấy trong dịch chiết ethanol của *D. difformis* (Hemsl. & E.H. Wilson) T.H. Wang, cho thấy hoạt động chống oxy hóa và/hoặc trị đái tháo đường đáng kể [1]. Ngoài ra, một số nghiên cứu chỉ ra rằng các dẫn xuất của PTOX được chiết xuất từ một số loài thuộc chi *Dysosma* có khả năng ức chế sự nhân lên của virus HIV thông qua việc ngăn chặn enzyme sao chép ngược [8]. Trong một nghiên cứu của Macrae và cộng sự, họ đã thử

nghiệm hoạt tính kháng virus của PTOX, α -peltatin và diphyllin trên hai loại virus: Cytomegalovirus murin (MCMV, virus DNA) và virus Sindbis (virus ARN). Kết quả cho thấy PTOX ở nồng độ 241 nM và α -peltatin ở nồng độ 250 nM có tác dụng ức chế mạnh mẽ virus MCMV (lần lượt là 74% và 85%), trong khi đó, hiệu quả ức chế đối với virus Sindbis lại rất kém (chỉ 3% và 5% tương ứng). Tuy vậy, sự tổng hợp hóa học của PTOX được coi là rất phức tạp và không hiệu quả bởi sự có mặt của 4 trung tâm bất đối cùng với một C lactone và mức độ oxy hóa cao [9], [10], [11], [12]. Hơn nữa, việc sử dụng công nghệ nuôi cấy sinh khối tế bào hoặc nuôi cấy cơ quan thực vật ở các loài có khả năng sản sinh PTOX khó khả thi do hàm lượng PTOX thu được rất thấp. Để tìm kiếm một nguồn thay thế cho việc sản xuất aryl tetralin lignin này, vi sinh vật nội sinh đã được phân lập và nghiên cứu.

Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra khả năng sản xuất PTOX thành công từ các loại nấm nội sinh. Cụ thể, các nhà khoa học đã phân lập nấm như *Phialocephala fortinii* từ *Podophyllum peltatum* [4], *Fusarium* sp. (WB5121) từ *D. Versipellis* [13], *Fusarium solani* từ *Podophyllum hexandrum* [14], *Aspergillus fumigatus* từ *Juniperus communis* [15], *Alternaria tenuissima* từ *Sinopodophyllum emodi* (Wall.) Ying [16], *Monilia* sp., *Penicillium* từ *Dysosma veitchii* [17], đều có khả năng sản xuất PTOX. Điều đó cung cấp bằng chứng khoa học cho thấy nấm nội sinh có tiềm năng thay thế nguồn tài nguyên đang dần cạn kiệt. Tiềm năng thu nhận các hợp chất có hoạt tính sinh học cao, đặc biệt là PTOX và các dẫn xuất từ vi nấm nội sinh *Dysosma difformis* (hemsl & E.H. Wilson) T.H.Wang là hướng đi mới và hiệu quả trong việc khai thác, phát triển và bảo tồn loài dược liệu quý hiếm này.

Xuất phát từ cơ sở khoa học và thực tiễn trên, chúng tôi thực hiện luận án: **“Nghiên cứu phân lập vi nấm nội sinh từ cây dược liệu Bát Giác Liên và đánh giá khả năng sinh hoạt chất podophyllotoxin và các dẫn xuất”**.

Mục tiêu nghiên cứu của luận án:

Phân lập và tuyển chọn được các chủng vi nấm nội sinh cây Bát Giác Liên có khả năng sinh tổng hợp podophyllotoxin và các dẫn xuất có hoạt tính sinh học.

Giải mã hệ gen chủng vi nấm nội sinh tuyển chọn.

Xác định các điều kiện thích hợp sinh tổng hợp podophyllotoxin và các dẫn xuất của chủng vi nấm nội sinh tuyển chọn ở quy mô phòng thí nghiệm.

Tinh chế và xác định được cấu trúc của chất/tiền chất podophyllotoxin từ chủng vi nấm nội sinh tuyển chọn.

Các nội dung nghiên cứu của luận án:

- Phân lập, định danh và sàng lọc chủng nấm nội sinh sản sinh hoạt chất

podophyllotoxin

- Giải mã hệ gen chủng vi nấm nội sinh tuyển chọn và đề xuất con đường sinh tổng hợp chất/tiền chất podophyllotoxin.

- Nghiên cứu một số điều kiện thích hợp cho sản sinh podophyllotoxin và các dẫn xuất của chủng vi nấm nội sinh lựa chọn bằng công nghệ lên men.

- Lên men, thu hồi, xác định cấu trúc và đánh giá hoạt tính sinh học của các hợp chất từ vi nấm nội sinh tuyển chọn.

Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của luận án:

Nấm nội sinh tồn tại bên trong các mô khỏe mạnh của cây Bát Giác Liên, việc phân lập và xác định được khả năng sinh hoạt chất podophyllotoxin và các dẫn xuất tương tự của cây đã mở ra hướng đi tiềm năng nhằm tạo ra nguồn sản xuất podophyllotoxin và các dẫn xuất có hoạt tính sinh học cho ngành công nghiệp dược. Kết quả nghiên cứu của luận án cho thấy, việc lựa chọn được các điều kiện thích hợp nhằm nâng cao khả năng sinh tổng hợp podophyllotoxin và các dẫn xuất của chủng vi nấm nội sinh *Penicillium. herquei* HGN12.1R đã tạo ra 02 hợp chất là các ứng viên triển vọng định hướng ứng dụng làm tiền chất để tổng hợp thuốc chống ung thư.

Những đóng góp mới của luận án:

Luận án là nghiên cứu mới có hệ thống về phân lập, định danh và đánh giá khả năng sinh hoạt chất podophyllotoxin và các dẫn xuất của các chủng vi nấm nội sinh phân lập từ cây dược liệu Bát Giác Liên. Đề tài đóng góp một phần quan trọng trong việc tạo ra nguồn nguyên liệu thay thế nguồn nguyên liệu tự nhiên đang dần cạn kiệt hiện nay mang lại hiệu quả kinh tế trong việc sản xuất podophyllotoxin cho ngành công nghiệp dược, tập trung vào các điểm chính sau:

- Đã phân lập được 6 chủng vi nấm nội sinh từ các mẫu cây Bát Giác Liên ở Việt Nam có khả năng gây độc tế bào ung thư mạnh. Đồng thời đã đánh giá được sự đa dạng về vi nấm nội sinh ở cây Bát Giác Liên bản địa.

- Tuyển chọn được chủng vi nấm nội sinh ở cây Bát Giác Liên *P. herquei* HGN12.1R có khả năng tổng hợp PTOX và giải trình tự hệ gen bằng công nghệ PacBio, chú giải gen và dự đoán con đường sinh tổng hợp podophyllotoxin và các dẫn xuất.

- Tách chiết, tinh sạch và xác định được cấu trúc của 02 hợp chất α -peltatin và β -peltatin là dẫn xuất của podophyllotoxin từ chủng vi nấm nội sinh *P. herquei* HGN12.1R và chứng minh được hoạt tính của chúng.

Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1. Tổng quan về cây Bát Giác Liên và vi nấm nội sinh liên quan

1.1. Giới thiệu chung về cây Bát Giác Liên và vi nấm nội sinh

1.1.1. Đặc điểm sinh học và phân bố

Theo Danh lục các loài thực vật Việt Nam, Cây Bát Giác Liên thuộc chi *Podophyllum* (*Dysosma*) có hai loài là *Podophyllum tonkinense* Gagnep, 1938 (hay *Dysosma difformis*) và *Podophyllum versipelle* Hence, 1883 (hay *Dysosma versipellis*), phân bố chủ yếu ở các tỉnh phía Bắc như Lai Châu, Lào Cai, Yên Bái, Hà Giang, Lạng Sơn [18].

Bộ: *Ranunculales*
Họ: *Berberidaceae*
Chi: *Podophyllum*
(*Dysosma*)
Loài: *tonkinense*



Hình 1.1. Bát Giác Liên - *Podophyllum tonkinense* Gagnep [3]

Theo tổng hợp của Man Thanh Long, cây Bát Giác Liên còn gọi là cây độc cước liên, độc điệp nhất chi hoa, cước điệp... có tên khoa học là *Dysosma difformis* (tên đồng nghĩa là *Podophyllum tonkinense* Gagnepain) thuộc họ Hoàng Liên gai, phân bố chủ yếu ở một số tỉnh của Trung Quốc (Quảng Tây, Quý Châu, Hồ Nam, ...) và Việt Nam (Lai Châu, Lào Cai, Yên Bái, Hà Giang...) [19].

Cây Bát Giác Liên (*Podophyllum tonkinense* Gagnep.), được mô tả trong Sách đỏ Việt Nam, là một loài cây thân thảo sống lâu năm, thường đạt chiều cao từ 30-50 cm. Đặc trưng của loài này là có thân rễ dạng chuỗi với nhiều đốt và các củ mọc ngang. Cây thường có 1-2 lá có cuống, phiến lá rộng 20-30 cm, xẻ thùy hình tam giác hoặc trứng với 6-8 thùy nông, mép lá có răng cưa nhỏ. Cuống lá thường dính gần giữa phiến. Cụm hoa của Bát Giác Liên bao gồm 5-9 hoa màu nâu tím, có cuống, thường mọc gần gốc lá và rủ xuống. Mỗi hoa có 6 lá đài phủ lông ngoài, 6 cánh hoa hình thuôn đầu tròn, 6 nhị ngắn hơn cánh hoa, và bầu thuôn với đầu nhụy to. Quả của

cây là quả mọng hình bầu dục hoặc trứng, chứa nhiều hạt nhỏ. Cây ra hoa vào khoảng tháng 3-5 và kết quả từ tháng 5-8. Loài này nhân giống tự nhiên chủ yếu từ hạt. Phần trên mặt đất của cây Bát Giác Liên thường tàn lụi vào mùa đông, và chồi non mới sẽ mọc lên từ thân rễ vào đầu xuân. Loài cây này ưa thích môi trường ẩm ướt và bóng râm, thường sinh trưởng trên đất mùn ẩm gần khe suối, dưới tán rừng kín thường xanh. Đặc biệt, Bát Giác Liên thường được tìm thấy ở rừng núi đá vôi có độ cao từ 800-1200 m. Hiện nay, do những đặc điểm sinh thái và giá trị của mình, Bát Giác Liên được xếp vào nhóm nguy cấp (EN A1a, c, d) trong Sách đỏ Việt Nam 2007 [3].

1.1.2. Thành phần hóa học và tác dụng dược lý của cây Bát Giác Liên

Nhóm nghiên cứu của Nguyễn Thị Dung năm 2018 đã tiến hành chiết tách và phân lập các thành phần hóa học từ phần dưới mặt đất (bao gồm rễ và thân rễ) của cây Bát Giác Liên (*Podophyllum tonkinense* Gagnep.). Kết quả nghiên cứu, họ đã xác định được 7 hợp chất từ mẫu thu thập tại Sa Pa (Lào Cai), bao gồm quercetin (1), rutin (2), kaempferol (3), nicotiflorin (4), α -peltatin (5), deoxypodophyllotoxin (6), và podophyllotoxin (7). Đáng chú ý, đây là lần đầu tiên hai hợp chất α -peltatin và nicotiflorin được phát hiện trong loài *Podophyllum tonkinense* Gagnepain [2].

Showkat Ahmad Ganie và cộng sự đã thực hiện một nghiên cứu *in vitro* cho thấy chiết xuất n-hexan từ cây *Dysosma emodi* (*Podophyllum hexandrum*) có khả năng loại bỏ hiệu quả nhiều loại gốc tự do, bao gồm DPPH, superoxit (O_2^-), hydroxyl (OH^-) và hydro peroxit (H_2O_2). Tác dụng chống oxy hóa của chiết xuất này được đánh giá là tương đương với vitamin E [20].

Trong một nghiên cứu tiếp theo, Ganie và cộng sự cũng chứng minh được tác dụng bảo vệ gan của chiết xuất n-hexan từ *Dysosma emodi* trên chuột thí nghiệm bị gây stress oxy hóa bằng CCl_4 . Bằng cách đo các chỉ số sinh hóa (như alanin aminotransaminase, aspartate aminotransaminase, lactate dehydrogenase) và các enzym chống oxy hóa huyết thanh, họ nhận thấy chiết xuất n-hexan ở các liều lượng 20, 30 và 50 mg/kg/ngày giúp giảm hoạt tính của các enzym marker tổn thương gan. Đồng thời, nó cũng làm tăng đáng kể mức độ của các enzyme chống oxy hóa quan trọng như glutathione (GSH), glutathion peroxidase (GPx), glutathion reductase (GR), superoxid dismutase (SOD) và glutathion-S-transferase (GST), với hiệu quả phụ thuộc vào liều lượng [20].

Theo một nghiên cứu khác của De Long Yang và cộng sự thì thân rễ của *P. hexandrum* chứa một số lignans có hoạt tính chống khối u. PTOX là sản phẩm tự nhiên gây độc tế bào mạnh. Nó được sử dụng làm hợp chất khởi đầu để tổng hợp thuốc chống ung thư etoposide và teniposide. PTOX hoạt động như một chất ức chế

quá trình lắp ráp vi ống. Những loại thuốc này được sử dụng cho ung thư phổi, ung thư tinh hoàn, u nguyên bào thần kinh, u gan và các khối u khác. Bên cạnh đó, nó cũng cho thấy các hoạt động chống vi rút bằng cách can thiệp vào một số quá trình vi rút quan trọng [20].

Trong quá trình tìm kiếm các hợp chất trừ sâu từ thực vật, RuigeYang và cộng sự đã phát hiện ra rằng PTOX và các dẫn xuất của nó có hoạt tính diệt côn trùng tốt. Các hợp chất này được phân lập từ dịch chiết của thân rễ các loài *Podophyllum hexandrum* và *Juniperus Sabina* [21].

1.1.3. Ứng dụng của cây Bát Giác Liên trong Y học cổ truyền

Cây Bát Giác Liên (*Dysosma difformis*), một thành viên của họ Hoàng Liên Gai (*Berberidaceae*), từ lâu đã được xem là một loại thảo mộc quý giá trong y học cổ truyền Việt Nam. Các tài liệu như Từ điển cây thuốc Việt Nam [18], [22] và Sách đỏ Việt Nam [3] đều khẳng định giá trị y học của loài cây này, đặc biệt là rễ và thân rễ chứa hoạt chất berberin với khả năng chữa trị đa dạng các bệnh lý từ mụn nhọt, lở ngứa, tràng nhạc, sưng yết hầu cho đến vết thương do rắn độc cắn. Một nghiên cứu khác, theo truyền thống, chúng được áp dụng phổ biến để điều trị viêm họng, mụn nhọt, rắn cắn, áp xe vú và ung thư vú [1]. Ngoài ra, toàn cây Bát Giác Liên còn được sử dụng rộng rãi trong dân gian để giải độc, tiêu viêm, tiêu phù, và sát trùng. Mặc dù sở hữu những công dụng quý giá, hiện trạng của hai loài chi Bát Giác Liên đang rất đáng báo động. Đây là nguồn gen quý hiếm có giá trị cao, loài cây này hiện nay bị khai thác rất nhiều để làm thuốc hoặc bị mất đi do nạn tàn phá rừng nên số lượng còn rất ít, vì vậy cần có những biện pháp bảo vệ phù hợp để bảo tồn nguồn gen quý phục vụ cho công tác nghiên cứu và bảo tồn [18].

1.2. Vi nấm nội sinh và mối quan hệ với cây chủ

1.2.1. Sơ lược về vi nấm nội sinh

Nấm nội sinh thực vật là những loài nấm sống toàn bộ hoặc một phần vòng đời bên trong các mô khỏe mạnh của cây chủ, bao gồm lá, thân, rễ, cành, mà thường không gây ra các triệu chứng bệnh rõ rệt [23]. Rễ là điểm xâm nhập chính của nhiều vi sinh vật nội sinh. Sau khi xâm nhập, vi nấm có thể tập trung tại một vị trí hoặc di chuyển khắp các mô dẫn đến rễ, thân, lá, từ đó thúc đẩy quá trình trao đổi chất, tăng cường phát triển lông rễ và hạn chế sự kéo dài của rễ [24]. Trong suốt thời gian dài đồng tiến hóa một số vi sinh vật nội sinh cùng tồn tại với các cây chủ của chúng, đã thiết lập một mối quan hệ đặc biệt với nhau và có thể ảnh hưởng đáng kể đến sự hình thành các sản phẩm trao đổi chất trong thực vật. Mặt khác các vi sinh vật nội sinh sẽ sản xuất một số hợp chất hoạt tính sinh học để giúp cây ký chủ chống lại các căng

thăng sinh học và phi sinh học bên ngoài, đôi lại mang lại lợi ích cho sự phát triển của vật chủ [25], [26]. Một số loại nấm nội sinh đã phát triển khả năng sản xuất các chất có hoạt tính sinh học tương tự như các chất có nguồn gốc từ cây ký chủ. Điều này có lợi cho chúng ta khi nghiên cứu các mối quan hệ giữa các vi sinh vật nội sinh và cây ký chủ của chúng, phát triển một cách tiếp cận mới có thể thay thế để sản xuất hiệu quả các hợp chất hoạt tính sinh học khan hiếm và có giá trị [27]. Những vi sinh vật này sản xuất kháng sinh, enzyme và các hợp chất hoạt tính sinh học khác cho phép chúng tồn tại trong môi trường cạnh tranh với các vi sinh vật khác. Ngoài ra, các chất chuyển hóa thứ cấp mang lại khả năng bảo vệ cho cây chủ của chúng chống lại các tác nhân gây bệnh do vi khuẩn và nấm khác và/hoặc có thể thúc đẩy sự phát triển của cây. Nấm nội sinh được xem là nguồn sản phẩm tự nhiên có hoạt tính sinh học đầy hứa hẹn, có thể được tối ưu hóa thông qua những thay đổi trong điều kiện trồng trọt. Việc khám phá các phân tử hoạt tính sinh học mới do các vi sinh vật này tạo ra đã thu hút sự chú ý của các nhà nghiên cứu. Sự đa dạng về hóa học và chức năng của các sản phẩm tự nhiên từ nấm nội sinh thể hiện một loạt các ứng dụng trong y học, nông nghiệp, công nghiệp và môi trường [28].

Trong hai thập kỷ qua, nhiều hợp chất tự nhiên có hoạt tính sinh học cao đã được khám phá thành công từ nấm nội sinh. Các hợp chất này thể hiện tiềm năng ứng dụng rộng rãi trong nông nghiệp, y học và công nghiệp thực phẩm, nhờ vào các đặc tính như kháng khuẩn, diệt côn trùng, gây độc tế bào, chống ung thư, giảm thiểu oxy hóa, kháng tiểu đường, gây ức chế miễn dịch, kháng huyết khối, kháng viêm, kháng lại bệnh Alzheimer và một số bệnh lý khác [29], [30]. Cho đến nay, hàng trăm loài thực vật đã được nghiên cứu về nấm nội sinh và hầu hết chúng đều đã được chứng minh là có hệ nấm nội sinh đa dạng [31], [32].

Bằng chứng từ các mô hóa thạch của thân và lá cho thấy sự tồn tại của vi sinh vật liên quan đến thực vật từ khi thực vật bậc cao xuất hiện trên trái đất hàng trăm triệu năm trước [33], gợi ý về lịch sử phát triển lâu dài của vi sinh vật nội sinh. Mặc dù vậy, công tác phân lập và tối ưu các điều kiện nuôi cấy nhằm tìm kiếm các chủng nấm nội sinh có khả năng tổng hợp các hợp chất có hoạt tính vẫn còn hạn chế. Do đó, cần có thêm các nghiên cứu chuyên sâu hơn trong lĩnh vực này [34].

1.2.2. Mối quan hệ giữa vi nấm nội sinh và cây chủ

Một số vi sinh vật xuất hiện tích cực xâm nhập vào các mô thực vật thông qua xâm nhập hở hoặc vết thương, cũng như chủ động sử dụng các enzym thủy phân như cellulase và pectinase [35]. Trong thời gian dài đồng tiến hóa, các loại nấm nội sinh đã dần thích nghi với môi trường vi mô đặc biệt của chúng bằng biến thể di truyền, bao gồm cả việc hấp thu một số đoạn DNA của thực vật vào bộ gen của chúng, cũng

như chèn các đoạn DNA của nấm vào bộ gen của vật chủ. Điều này có thể dẫn đến một số vi sinh vật nội sinh có khả năng tổng hợp một số "hoạt chất thực vật" có nguồn gốc từ cây ký chủ của chúng [35], [36].

Mỗi loài thực vật chứa một hoặc nhiều loài nấm nội sinh. Nấm nội sinh là các nhóm vi sinh vật đa ngành và có thể phát triển mà không có triệu chứng trong các mô khỏe mạnh khác nhau của thực vật sống ở trên hoặc dưới mặt đất, bao gồm cả thân, lá, rễ. Ước tính có hơn một triệu loài nấm nội sinh trong tự nhiên [37]. Các hợp chất có hoạt tính sinh học do nấm nội sinh tạo ra là rất quan trọng để tăng khả năng thích ứng của cả nấm nội sinh và cây chủ của chúng, chẳng hạn như khả năng chịu đựng các áp lực sinh học và phi sinh học. Ngoài ra, các hợp chất này có thể tạo ra việc sản xuất rất nhiều chất chuyển hóa thứ cấp có hoạt tính sinh học mới [25], [26], [35] mà con người có thể khai thác và ứng dụng như những nguồn dược liệu quan trọng. Một số nghiên cứu cho thấy các cơ chế phân tử có thể phát sinh thông qua quá trình đồng tiến hóa của VSV nội sinh với vật chủ thực vật trong quá trình thiết lập mối quan hệ cộng sinh [38], [39]. Quá trình tổng hợp các hợp chất hoạt tính sinh học của nấm nội sinh có thể được điều chỉnh theo những thay đổi về môi trường và nhu cầu cụ thể trong các giai đoạn phát triển của nuôi cấy nấm [40]. Những thay đổi về các thông số nuôi cấy (ví dụ: thành phần môi trường, nhiệt độ, pH, ánh sáng) có thể ảnh hưởng đến đặc điểm chuyển hóa của nấm nội sinh vật [41]. Axit 3-hydroxypropionic (3-HPA) kháng khuẩn do nội sinh *Diaphorte phaseolorum* phân lập từ rừng ngập mặn Brazil tạo ra cho thấy hoạt tính in vitro chống lại cả *Staphylococcus aureus* và *Salmonella typhi* [42]. Gần đây, Rajini và cộng sự (2020) đã xác định sản xuất cellulase là một trong những đặc điểm của nấm nội sinh *Trichoderma asperellum*, *Epicoccum nigrum* và *Alternaria longipes* liên quan đến quá trình xâm chiếm của *Sorghum bicolor* và ức chế sự phát triển in vitro của *Fusarium thapsinum*, *Epicoccum sorghinum*, *Alternaria alternata* và *Curvularia lunata* bằng cách thủy phân thành tế bào [43]. Các enzyme phân giải do nấm nội sinh sản xuất thường ổn định hơn các enzyme do chất xúc tác hóa học truyền thống sản xuất và thường hoạt động trong điều kiện pH, nhiệt độ và áp suất vừa phải [44]. Hoạt tính phân giải lignin ngoại bào của *Ceratobasidium stevensii* nội sinh phân lập từ *Bischofia polycarpa* đã được chứng minh bởi [45].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tập trung vào việc khảo sát nấm nội sinh trên cây Bát Giác Liên (chi *Podophyllum*) nhằm mục đích thu nhận hợp chất có hoạt tính sinh học PTOX và các dẫn xuất liên quan. Đồng thời, nghiên cứu này cũng hướng đến việc xác định mối quan hệ giữa các loài nấm nội sinh này và cây chủ, để hiểu rõ hơn và tận dụng lợi thế của nấm nội sinh thực vật và đây cũng là một chiến lược để

thúc đẩy sản xuất một cách hiệu quả các hợp chất hoạt tính sinh học này thông qua quá trình lên men.

Bảng 1.1. Nấm nội sinh sản sinh podophyllotoxin và cây ký chủ của chúng [32]

Nấm nội sinh	Ký hiệu chủng	Cây chủ	Hàm lượng podophyllotoxin	TLTK
<i>Alternaria</i> sp.	-	<i>Sinopodophyllum hexandrum</i> (= <i>Podophyllum hexandrum</i>)	-	[17]
<i>Alternaria</i> sp.	SC13	<i>Sabina vulgaris</i>	-	[46]
<i>Alternaria neesex</i>	Ty	<i>Sinopodophyllum hexandrum</i>	2.4 µg/L	[47]
<i>Fusarium oxysporum</i>	JRE1	<i>Sabina recurva</i> (= <i>Juniperus recurva</i>)	28 µg/L	[48]
<i>Monilia</i> sp.	-	<i>Dysosma veitchii</i>	-	[17]
<i>Penicillium</i> sp.	-	<i>Sinopodophyllum hexandrum</i>	-	[17]
<i>Penicillium</i> sp.	-	<i>Diphylleia sinensis</i>	-	[17]
<i>Penicillium</i> sp.	-	<i>Dysosma veitchii</i>	-	[17]
<i>Phialocephala fortinii</i>	PPE5, PPE7	<i>Sinopodophyllum peltatum</i>	0.5-189 µg/L	[4]
<i>Trametes hirsuta</i>	-	<i>Sinopodophyllum hexandrum</i>	30 µg/L	[49]

1.2.3. Đa dạng vi nấm nội sinh thực vật

Nấm nội sinh (VNNS) có sự phân bố rộng rãi trong thế giới thực vật, được công nhận là nguồn dồi dào các sản phẩm hoạt tính sinh học đầy hứa hẹn. Sự đa dạng sinh học của VNNS giúp khám phá các loài nấm mới hoặc ít được nghiên cứu, từ đó góp phần tìm kiếm các hợp chất có tiềm năng lớn trong y học (kháng sinh, chống ung thư, kháng viêm), nông nghiệp và công nghiệp.

Việc phân lập VNNS từ các cây thuốc đã mang lại những kết quả quan trọng, đặc biệt là các cây sản sinh podophyllotoxin (PTOX) – một hợp chất chống ung thư quan trọng có trong cây Bát Giác Liên. Các nghiên cứu đã chứng minh khả năng đặc

biệt của nhiều chủng nấm nội sinh trong việc tổng hợp hoặc chuyển hóa để sản xuất PTOX, cho thấy sự đa dạng của các chi nấm liên quan.

Sự phân bố rộng rãi của nấm nội sinh trong thực vật bậc cao được công nhận là nguồn dồi dào các sản phẩm hoạt tính sinh học đầy hứa hẹn. Những loại nấm này tổng hợp các lớp cấu trúc đa dạng của các chất chuyển hóa thứ cấp có tiềm năng điều trị. Nadeem (2012) đã phân lập được một loại nấm từ rễ cây *Podophyllum hexandrum*. Loại nấm này có khả năng sản xuất 29 $\mu\text{g g}^{-1}$ podophyllotoxin dựa trên trọng lượng khô theo phân tích HPLC. Việc khuếch đại và giải trình tự DNA ribosome 16S đã cho thấy sự đồng nhất 99% với trình tự rDNA 16S tương ứng của nấm *Fusarium solani* [14]. Chủng nấm nội sinh *Fusarium oxysporum* được tìm thấy trong cây *Juniperus recurva* cũng sản xuất podophyllotoxin thông qua quá trình chuyển hóa của chính nó [48]. Gần đây, một báo cáo đã đưa ra bằng chứng về việc sản xuất podophyllotoxin bởi các chủng nấm *Fusarium* nội sinh. Hai chủng nấm *Fusarium* phân lập từ *Dysosma versipellis* (một loại cây thuốc Trung Quốc) đã được đánh giá về sản lượng podophyllotoxin, chúng cho thấy khả năng sản xuất 277 và 1,25 $\mu\text{g g}^{-1}$ của hợp chất tương ứng [50]. Các nhà nghiên cứu đã phân tích các chất chuyển hóa thứ cấp của một số loại nấm nội sinh khác phân lập từ các cây sản sinh podophyllotoxin. *Aspergillus fumigatus*, một loại nấm nội sinh thu được từ *Juniperus communis*, sản sinh ra deoxypodophyllotoxin, có thể được chuyển hóa thành podophyllotoxin hoặc 6-methoxypodophyllotoxin và các glycoside của chúng [15]. Một loại nấm nội sinh khác, cụ thể là *Phialocephala fortinii* phân lập từ thân rễ của cây *Podophyllum peltatum*, sản sinh ra lượng podophyllotoxin thấp hơn theo báo cáo của [4]. Liang và cộng sự (2016) đã báo cáo rằng nấm nội sinh *Alternaria tenuissima* phân lập từ rễ và thân rễ của cây *Sinopodophyllum emodi*, có khả năng sản sinh podophyllotoxin như đã nghiên cứu thông qua phân tích sắc ký lỏng khối phổ [16]. Một số loài *Penicillium* được tìm thấy dưới dạng nấm nội sinh bên trong cây *Diphylleia sinensis*, được báo cáo là có khả năng sản sinh podophyllotoxin [51]. Eyberger và cộng sự đã tìm thấy vi nấm nội sinh *Trametes hirsuta* từ mẫu rễ khô của cây *Podophyllum hexandrum* ở Himalaya, Ấn Độ. Tương tự, hai chủng nấm *Phialocephala fortinii* phân lập từ rễ của cây *Podophyllum peltatum* cũng có khả năng sản xuất podophyllotoxin [52].

Các nghiên cứu đã thành công trong việc phân lập nhiều chủng nấm nội sinh mới từ các chi khác nhau, chứng minh khả năng sản xuất các hợp chất hoạt tính tương tự thực vật. Điều này đặc biệt quan trọng vì nấm nội sinh rất phong phú và hiện diện trong gần như tất cả các loài thực vật [53]. Việc phân lập VNNS, đặc biệt từ các loài

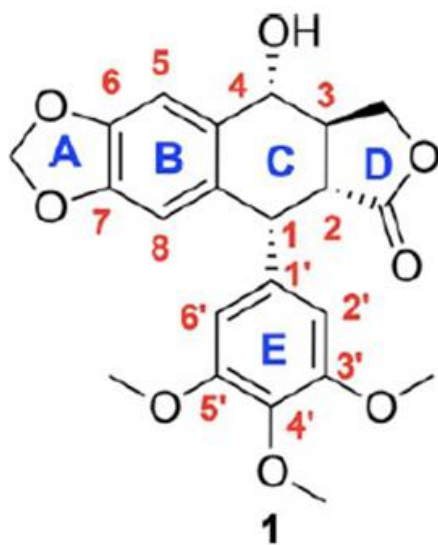
cây có đặc điểm sinh học và sinh thái độc đáo hoặc các cây thuốc quý, là một chiến lược hiệu quả để tìm kiếm các hoạt chất mới hoặc nguồn thay thế bền vững cho các hoạt chất quan trọng.

2. Podophyllotoxin, các dẫn xuất và vi nấm nội sinh

2.1. Tổng quan về podophyllotoxin và các dẫn xuất

2.1.1. Giới thiệu về podophyllotoxin và các dẫn xuất

PTOX là một chất hoá học nổi tiếng trong số hàng trăm chất từ thực vật, được phân lập chủ yếu từ rễ và thân của một số loài thuộc chi *Podophyllum* (hay *Dysosma*). PTOX được sử dụng làm tiền chất để tổng hợp thuốc chống ung thư etoposide và teniposide và etopophose phosphate [4], [5], [48], [54]. Aryl tetralin lignans tự nhiên này được sử dụng như một tác nhân hóa trị liệu cho nhiều loại ung thư [55]. PTOX lần đầu tiên được phân lập từ *Podophyllum peltatum* bởi Podwyssotzki vào năm 1880 [56], nhưng cấu trúc hoá học của chất này mới được xác định vào năm 1951 [57]. Vào cuối năm 2010 đã phân lập được PTOX từ các loại thực vật khác nhau như một số cây thuộc chi *Podophyllum* (*Podophyllum hexandrum*), cây Táo ma (*Podophyllum peltatum*) thành phần chính của cây là podophylloxin hay một số cây thuộc chi *Juniperus* như *Juniperus sabina*, *Juniperus thurifera*, *Juniperus chinensis*..., và một số loài thuộc chi *Linum* [58].

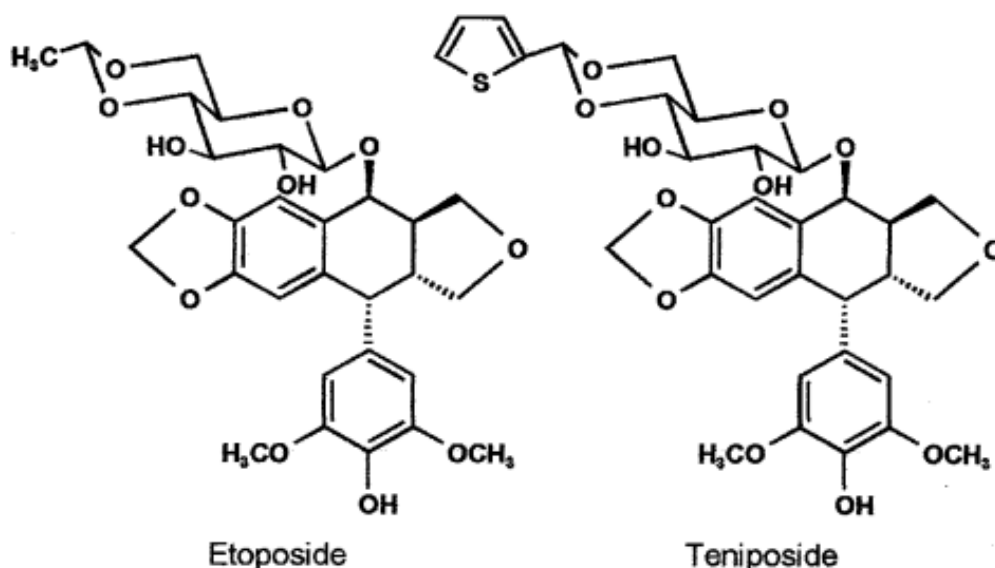


Hình 1.2. Cấu trúc hoá học của podophyllotoxin [57]

PTOX hiện được thu nhận chủ yếu từ thực vật, sự tổng hợp hóa học của PTOX được coi là rất phức tạp và không hiệu quả bởi vì sự có mặt của 4 trung tâm bất đối cùng với một C lactone và mức độ oxy hóa cao [9], [10], [11], [12], [49]. Để tìm kiếm

một nguồn thay thế cho việc sản xuất aryl tetralin lignans này, vì sinh vật nội sinh đã được phân lập và nghiên cứu. Gần đây PTOX đã được báo cáo là được sản xuất bởi vi sinh vật nội sinh từ *Podophyllum hexandrum* [49] và *Podophyllum peltatum* [4].

PTOX, cùng với các dẫn xuất và đồng phân khác nhau của nó được công nhận rộng rãi là các hợp chất có hoạt tính dược lý phổ rộng. Etoposide là một acetal mạch vòng được điều chế từ 4-demethylepipodophyllotoxin β -D-glucopyranoside và acetaldehyde (dưới dạng dimethyl acetal của nó), trong khi teniposide là acetal mạch vòng được điều chế bằng cách thay thế 2-thiophenecarboxaldehyde của acetaldehyde. Hai loại thuốc này không hòa tan trong nước, nhưng hòa tan trong dung môi hữu cơ được sử dụng trong bệnh bạch cầu cấp tính, ung thư hạch Hodgkin và không Hodgkin, ung thư phổi tế bào nhỏ, tinh hoàn ung thư, ung thư biểu mô tế bào gan, u nguyên bào thần kinh và Kaposi sarcoma liên quan đến AIDS [59].



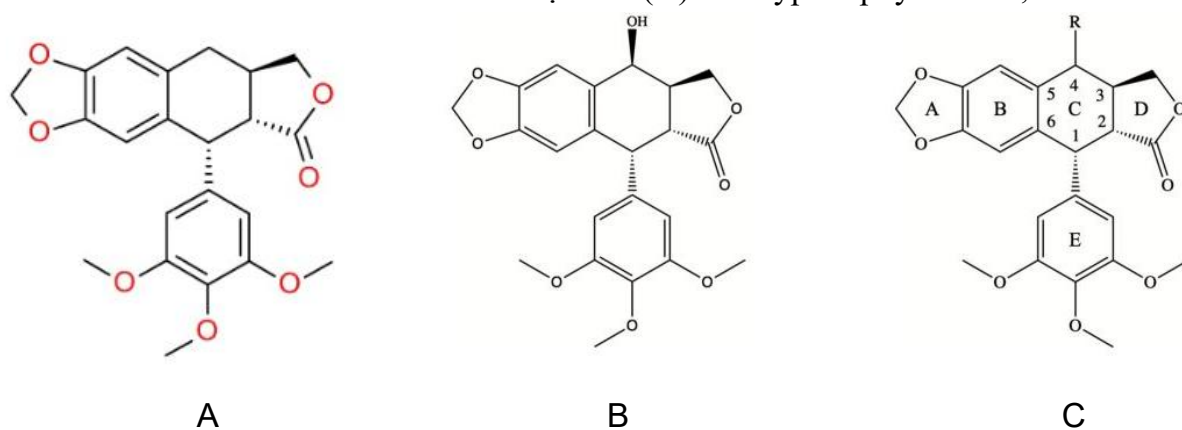
Hình 1.3. Cấu trúc hoá học của etoposide và teniposide [59]

Khả năng chuyển hóa một lượng lớn 2,7'-cyclo lignan DPTOX thành 6-methoxypodophyllotoxin 7-O-glucoside đã được chứng minh trong nuôi cấy tế bào *Linum flavum* [60]. Ngoài vai trò là tiền chất tiềm năng của PTOX chống ung thư, DPTOX bản thân nó là một lignan quan trọng có tác dụng chữa bệnh hiệu quả chống lại rất nhiều khối u ác tính. DPTOX đã được chứng minh chống lại một số dòng tế bào khối u bao gồm A549, SK-OV-3, SK-MEL-2, HCT15, B16F10 và K562 [61]. Hơn nữa, DPTOX đã được ghi nhận thể hiện hoạt động kết tập tiểu cầu [62], hoạt tính chống hen trong cơ thể sống [63] và có phổ diệt côn trùng rộng [64], [65]. Gần đây, DPTOX đã được báo cáo là chống dị ứng bởi vì nó không chỉ ức chế phản ứng phản vệ thụ động ở da (PCA) mà còn có một cyclooxygenase kép (COX)-2 hoạt tính ức chế chọn lọc 5-lipoxygenase (LOX) [66], [67]. Thêm vào đó, tiềm năng sử dụng

DPTOX trong điều trị tăng sắc tố gây ra bởi bức xạ tia cực tím hoặc bởi rối loạn sắc tố da đã được báo cáo [68].

Hiện nay, nhiều dẫn xuất PTOX đã được phát triển bằng cách cải thiện cấu trúc hóa học hoặc bằng cách liên hợp với các phân tử khác, do đó cho phép đạt được các đặc tính sinh học tốt hơn [69]. Việt Nam hiện nay các nghiên cứu về PTOX mới chỉ dừng lại ở việc phân lập về thành phần các chất từ phần dưới mặt đất của *Dysosma difformis* (hemsl & E.H. Wilson) T.H.Wang [2]. *Dysosma versipelle* theo truyền thống được áp dụng phổ biến để điều trị viêm họng, mụn nhọt, rắn cắn, áp xe vú và ung thư vú [1]. Như vậy, việc khám phá sản xuất hiệu quả PTOX và các dẫn xuất mà không cần thu thập các loại cây này trong tự nhiên là một đặc quyền cho việc sử dụng PTOX trong tương lai cũng như bảo tồn loài thực vật đang bị đe dọa này.

Hình 1.4. Cấu trúc hoá học của (A) Deoxypodophyllotoxin;



(B) Epipodophyllotoxin; (C) PTOX derivative [62], [69]

2.1.2. Hoạt tính sinh học của podophyllotoxin và các dẫn xuất

PTOX một hợp chất từ Bát Giác Liên, có khả năng gây độc tế bào và ức chế quá trình lắp ráp các vi ống, đã được chứng minh là hiệu quả trong điều trị nhiều loại ung thư (phổi, tinh hoàn, u nguyên bào thần kinh, u gan) và các khối u khác [6], [70].

PTOX là một chất chuyển hóa thứ cấp quan trọng về mặt y học của thực vật và cũng có nguồn gốc nội sinh. Nó là một hợp chất chống ung thư tự nhiên tiềm năng (với một số đặc tính chữa bệnh khác) được tìm thấy trong một số loài thuộc chi *Podophyllum* như *P. hexandrum*, *P. peltatum*, *P. emodi*, v.v. Nó không chỉ giới hạn ở chi *Podophyllum* mà còn được tìm thấy ở một số chi khác chẳng hạn như *Jeffersonia*, *Diphylleia* và *Dysosma* (*Berberidaceae*), *Catharanthus* (*Apocynaceae*), *Polygala* (*Polygalaceae*), *Anthriscus* (*Apiaceae*), *Linum* (*Linaceae*), *Hyptis* (*Verbenaceae*), *Teucrium*, *Nepeta* and *Thymus* (*Labiaceae*), *Thuja*, *Juniperus*, *Callitris* and *Thujopsis* (*Cupressaceae*), *Cassia* (*Fabaceae*), *Haplophyllum*

(*Rutaceae*), *Commiphora* (*Burseraceae*), *Hernandia* (*Hernandiaceae*) [71] và nhiều loài khác. Tuy nhiên, các biện pháp canh tác ở những cây sản xuất PTOX phải đối mặt với những hạn chế nhất định về môi trường làm hạn chế việc sản xuất hợp chất vô cùng quý giá này [72]. Sản xuất nông nghiệp của *Podophyllum* đã không thành công vì cây không thể canh tác trong trường hợp không có điều kiện khí hậu thích hợp [73], [74]. Các phương pháp *in vitro* cũng đã không thể thực hiện được do toàn bộ quá trình sinh hóa, con đường chuyển hóa liên quan đến các enzyme chính, biến thể di truyền tham gia vào quá trình sinh tổng hợp PTOX, vẫn chưa được biết đến. Phương pháp nuôi cấy mô cũng không mang lại kết quả mong muốn [10], [12].

DPTOX một dẫn xuất của PTOX, được biết đến với khả năng kháng virus, chống oxy hóa, kháng khuẩn, kích thích miễn dịch và chống thấp khớp. Các hoạt tính này chủ yếu được tìm thấy ở các chi *Juniperus* và *Podophyllum* [4], [17], [46], [48], [49]. Về ứng dụng của PTOX làm tiền chất tổng hợp thuốc chống ung thư, một nghiên cứu của Paul năm 2002 còn chỉ ra rằng DPTOX và β -peltatin có hoạt tính kháng virus đối với virus sởi (virus ARN) và virus Herpes simplex I (HSV-I, virus DNA) [75]. Ngoài ra, một số dẫn xuất PTOX chiết xuất từ một số loài thuộc chi *Dysosma* đã được chứng minh có khả năng ức chế sự nhân lên của virus HIV bằng cách ngăn chặn enzyme sao chép ngược [8]. Nghiên cứu của Macrae và cộng sự đã đánh giá hoạt tính kháng virus của PTOX, α -peltatin, và diphyllin trên virus Cytomegalovirus murin (MCMV, virus DNA) và virus Sindbis (virus ARN). Kết quả cho thấy PTOX (241 nM) và α -peltatin (250 nM) có khả năng ức chế MCMV một cách hiệu quả (lần lượt là 74% và 85%), nhưng lại có tác dụng ức chế kém đối với virus Sindbis (tương ứng 3% và 5%). [23].

Khả năng chống hoạt động khối u của PTOX tương tự như của paclitaxel [76]. Ngoài ra, các xét nghiệm huyết học và thí nghiệm sinh hóa kiểm tra cho thấy PTOX không có độc tính nội tạng trong mô hình động vật [77]. Trong một thử nghiệm lâm sàng, ảnh hưởng của PTOX đối với mụn cóc sinh dục được so sánh với kem imiquimod 5%, kết quả cho thấy tác dụng ức chế mạnh đối với sự phát triển của mụn cóc trong nhóm được điều trị bằng PTOX so với nhóm được điều trị bằng kem imiquimod [78]. Nhiều nghiên cứu lâm sàng cho thấy rằng sự hấp thụ qua da của PTOX là giới hạn và PTOX trong cơ thể trải qua chuyển hóa ở gan và thận [79].

Dựa trên nghiên cứu của Sheng Hu và cộng sự (2016), DPTOX cho thấy tiềm năng chống ung thư tuyến tiền liệt trên tế bào PCa người DU-145. Dữ liệu chỉ ra rằng DPTOX làm giảm đáng kể sự tăng trưởng tế bào và kích hoạt caspase-3, một enzyme quan trọng trong quá trình apoptosis ở tế bào DU-145. Hơn nữa, việc điều trị bằng

DPTOX còn làm giảm đáng kể mức phosphoryl hóa Akt và kích hoạt con đường tín hiệu XEN (Bax)/PTEN trong các tế bào này [7].

Trong điều trị lâm sàng, các dẫn xuất PTOX như etoposide (VP-16) và teniposide (VM-26) được sử dụng làm tác nhân hóa trị liệu, chẳng hạn như kiểm soát ung thư phổi tế bào nhỏ [80], [81]. Tuy nhiên, những hạn chế của các loại thuốc này nổi bật là tác dụng sinh học chưa cao và kháng thuốc, đòi hỏi phải phát triển các loại thuốc chống ung thư mới dựa trên PTOX. Hiện nay, nhiều dẫn xuất PTOX đã được phát triển bằng cách cải thiện cấu trúc hóa học hoặc bằng cách liên hợp với các phân tử khác, do đó cho phép đạt được các đặc tính sinh học tốt hơn.

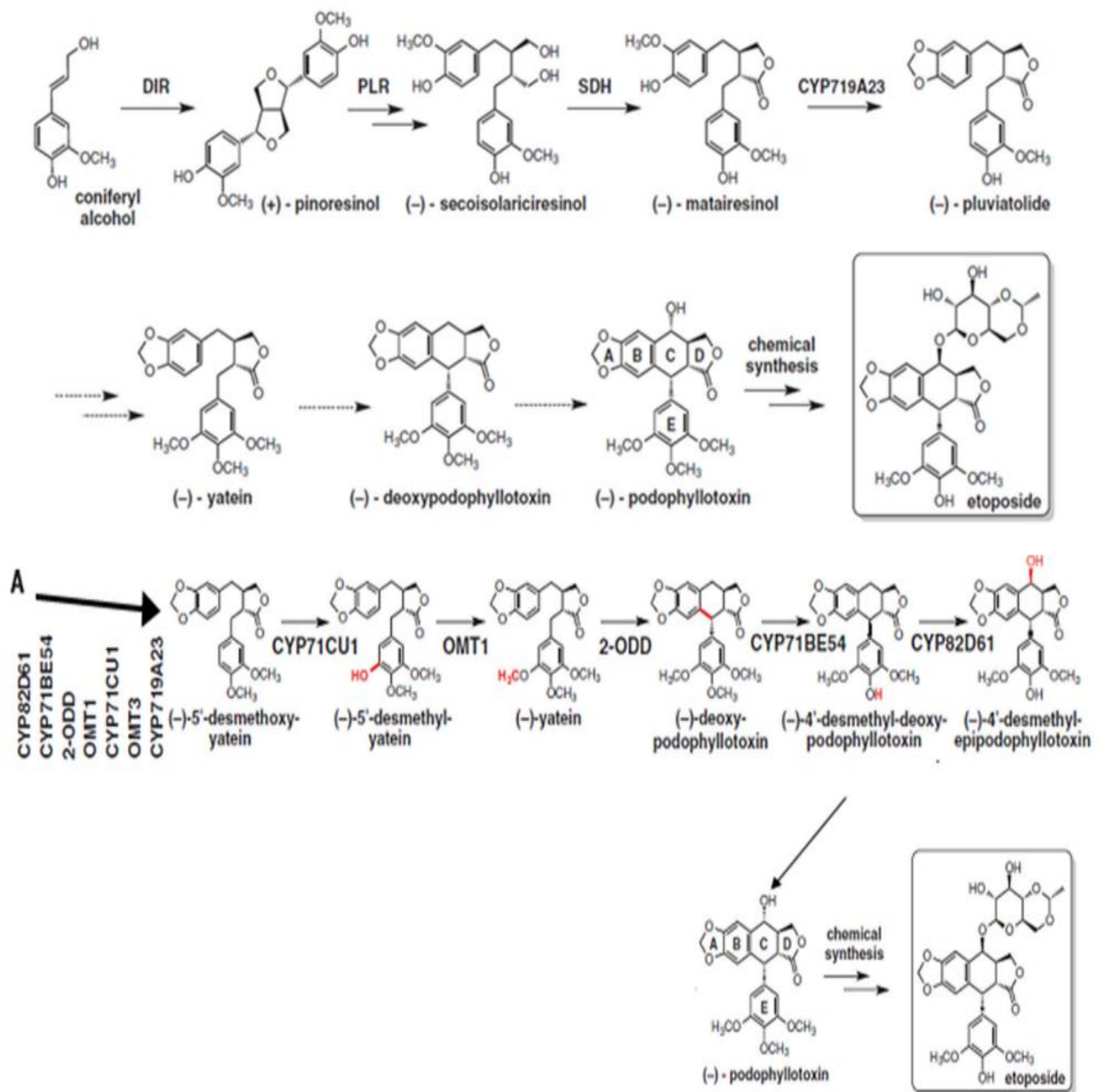
Trong một nghiên cứu khác, dẫn xuất PTOX cho thấy khả năng gây độc tế bào đầy hứa hẹn chống lại các dòng tế bào ung thư người HL-60, A-549, HeLa và HCT-8 [82].

2.1.3. Con đường sinh tổng hợp podophyllotoxin trong thực vật

PTOX là tiền chất sản phẩm tự nhiên của etoposide hóa trị liệu, tuy nhiên chỉ một phần của con đường sinh tổng hợp của PTOX được biết, điều này cản trở các nghiên cứu tiếp cận tạo các vật chủ để sản xuất chất này. PTOX là một hợp chất quan trọng nhất của con đường sinh tổng hợp lignans, cho đến nay con đường sinh tổng hợp của PTOX ở thực vật được nghiên cứu ngày một rõ ràng hơn [33]. Thật vậy, một số nghiên cứu về một số loài *Forsythia*, *Linum* và *Podophyllum* đã bước đầu tổng hợp PTOX. Người ta đã chứng minh rằng axit ferulic và axit cinnamic thay thế methylenedioxy là những enzym quan trọng tham gia vào quá trình sinh tổng hợp PTOX [34], [83].

Đã có báo cáo rằng quá trình sinh tổng hợp PTOX được bắt đầu từ rượu coniferyl được chuyển thành pinoresinol thông qua quá trình dime hóa một chất trung gian gốc đặc hiệu với sự có mặt của chất oxy hóa. Sau đó, pinoresinol bị khử thành secoisolariciresinol thông qua chất trung gian lariciresinol nhờ hoạt động của chất khử pinoresinol-lariciresinol. Sericoisolariciresinol dehydrogenase xúc tác quá trình lacton hóa secoisolariciresinol để tạo ra matairesinol, cuối cùng dẫn đến sự hình thành PTOX [84]. PTOX mang bốn trung tâm bất đối liên tiếp với bốn vòng hợp nhất, nó

có một số nhóm chức chứa oxy, tức là rượu, lactone, acetal và ba nhóm methoxy. Sự tổng hợp các dẫn xuất diễn ra do tính chất đa dạng của các vòng [85].



Hình 1.5. Con đường sinh tổng hợp podophyllotoxin [86].

Các đường đứt nét là các bước sinh tổng hợp các chất dự kiến.

Lau and Sattely (2015) đã nghiên cứu hệ phiên mã trong *Podophyllum hexandrum* (mayapple) để xác định các gen sinh tổng hợp trong con đường PTOX là tiền chất của etoposide, chất ức chế topoisomerase tiềm năng. Kết quả đã xác định sáu enzyme mới xúc tác các bước chính sản xuất PTOX (Hình 1.5). Trình tự các enzyme góp phần vào quá trình sinh tổng hợp PTOX là dirigent protein (DIR), thành rượu coniferyl, thành (+)-pinoresinol, sau đó dưới tác động của pinoresinol-lariciresinol reductase (PLR) được chuyển đổi thành (-)-secoisolariciresinol, chất này tiếp tục được chuyển đổi thành (-)-matairesinol bởi tác động của

sericoisolariciresinol dehydrogenase (SDH). Matairesinol sẽ tiếp tục được chuyển đổi bởi CYP719A23 thành (-)-pluviatolide. Pluviatolide có khả năng được chuyển đổi bởi Phex13114 (OMT1) thành (-)-yatein, tiếp tục được chuyển đổi bởi Phex30848 (2-ODD) thành (-)-deoxypodophyllotoxin [86].

Nghiên cứu trên loài *Dysosma versipellis* (Hance) M. Chang, Palaniyandi và Jun đã chỉ ra rằng phân tích biểu hiện mRNA của các gen con đường chuyển hóa podophyllotoxin secoisolariciresinol dehydrogenase và pinoresionol lariciresinol reductase mức độ biểu hiện phụ thuộc vào nhiệt độ [157]. Trên thực tế, cây trồng ở nhiệt độ thấp làm tăng rõ rệt sự tích tụ PTOX trong thân rễ của *D. versipellis* lên 3,49 lần so với nhiệt độ nhà kính. Từ kết quả này cho thấy rằng sự tích tụ PTOX trong thân rễ của *D. versipellis* ở nhiệt độ thấp biểu hiện gen trong con đường sinh tổng hợp PTOX.

2.2. Nghiên cứu về podophyllotoxin từ vi nấm nội sinh

2.2.1. Tình hình nghiên cứu thu nhận podophyllotoxin và các dẫn xuất từ vi nấm nội sinh trên thế giới

PTOX là một hợp chất hữu cơ tự nhiên thuộc nhóm lignans không phải alkaloid có nguồn gốc thực vật được tìm thấy trong một số loài *Podophyllum* và một số chi khác như *Sinopodophyllum*, *Juniperus*, *Dysosma*, *Diphylleia*, *Linum*, *Lithospermum* v.v. Một số loại nấm nội sinh tạo ra PTOX như chất chuyển hóa thứ cấp được nghiên cứu và báo cáo trong một số tài liệu. Việc chiết xuất chất chuyển hóa của chúng có thể được thực hiện bằng các phương pháp sắc ký lớp mỏng (TLC) và sắc ký màng lỏng hiệu năng cao (HPLC) [87].

PTOX, một chất tự nhiên nổi tiếng aryltetralin lignans xuất hiện ở một số loài thực vật được sử dụng làm tiền chất cho quá trình tổng hợp hóa học của thuốc chống ung thư như etoposide, teniposide và etopophose phosphate. Điều này báo cáo lần đầu tiên về việc sản xuất PTOX do một loại nấm nội sinh *Fusarium oxysporum* phân lập từ cây thuốc *Juniperus recva* ở Ấn Độ. Việc định lượng PTOX được thực hiện bởi HPLC, LC-MS và LC-MS / MS, theo đó nhóm tác giả đã chuẩn hóa các điều kiện nuôi cấy để đạt được sự tăng trưởng tối ưu và sản xuất PTOX. Thời gian tăng trưởng của nấm được quan sát lên đến 9 ngày, sinh khối sợi nấm cao nhất được ghi nhận vào ngày thứ 7, tuy nhiên hoạt chất PTOX đo được cao nhất vào ngày thứ 4 đạt 28μg/g trọng lượng khô tế bào [48].

Yang Xianzhi và cộng sự đã lên men 92 chủng nấm nội sinh được phân lập từ *Sinopodophyllum hexandrum*, *Diphylleia sinensis* và *Dysosma veitchii*, phân tích bằng TLC, HPLC. Kết quả cho thấy 6 chủng nấm nội sinh có thể tạo ra PTOX chiếm

khoảng 6,5% tổng số chủng đã được phân lập. Trong đó 7% nấm nội sinh được phân lập từ *S. hexandrum*, 3% từ *D. sinensis* và 10% từ *D. veitchii* [17].

Eyberger và cộng sự thu được thành công hai chủng *Phialocephala fortinii* nội sinh là PPE5 và PPE7 từ thân rễ của *Sinopodophyllum peltatum* mà có thể tạo ra PTOX với năng suất 0,5-189 $\mu\text{g/l}$ trong nuôi cấy lên men sau 4 tuần [4].

Một số nghiên cứu trên thế giới về cách xác định PTOX thông qua vi nấm nội sinh, bằng kỹ thuật phân tích sắc ký màng lỏng (TLC) và sắc ký màng lỏng hiệu năng (HPLC) các nhà khoa học đã phân lập và xác định được nhiều chủng vi nấm nội sinh trong một số chi *Sinopodophyllum*, *Juniperus*, *Dysosma*, *Diphylleia*, *Linum*, *Lithospermum*... sản sinh PTOX và các dẫn xuất (Bảng 1.2). Đây là cơ sở cho nghiên cứu của NCS tập trung phân lập vi nấm trong hai loài Bát Giác Liên ở Việt Nam là *Dysosma difformis* và *Dysosma versipelle*, trong các tài liệu đối với hai loài này chưa thấy có công bố việc thu nhận PTOX thông qua vi nấm nội sinh.

Các hợp chất thứ cấp có nguồn gốc thực vật, dù thường chỉ được sản xuất với hàm lượng rất thấp, lại sở hữu hoạt tính sinh học mạnh mẽ, mang ý nghĩa to lớn đối với con người trong cả ngành thực phẩm và y tế. Nhiều hợp chất trong số này, như vincristin, vinblastin, taxol, PTOX, đã chứng minh hiệu quả trong điều trị ung thư. Tuy nhiên, việc phân tách và tinh chế các hợp chất thứ cấp này gặp nhiều khó khăn và tốn kém thời gian, đặc biệt khi chúng chỉ tồn tại với nồng độ cực kỳ nhỏ trong tế bào thực vật. Việc chiết xuất các chất chuyển hóa được thực hiện dựa trên nguyên tắc chiết xuất dung môi bằng cách sử dụng chủ yếu là metanol và etyl axetat làm dung môi hữu cơ. Sau đó, dung môi được làm bay hơi với sự trợ giúp của thiết bị cô quay, cặn thu được hòa tan lại trong dung môi thích hợp như dimethyl sulphoxide [49]. Một số tác giả đã sử dụng hỗn hợp dung môi metanol-dichloromethane-etyl axetat theo một tỷ lệ nhất định [88], [89], [90]. Phát hiện và định lượng thông qua phân tích HPLC, LC-MS, GC-MS, v.v. là bước cuối cùng của xác nhận đặc tính của các hợp chất thu được.

Một nghiên cứu của nhóm S. Kusari [15] đã thành công trong việc tách chiết thu nhận DPTOX từ *Aspergillus fumigatus* Fresenius, một loại nấm nội sinh *Juniperus communis* L. Horstmann bằng hệ dung môi CHCl_3 -MeOH (4:1, v/v) (Hình 1B, phụ lục B). Tương tự, nhóm tác giả [48] đã đề xuất một phương pháp tách chiết và nhận biết PTOX đơn giản, hiệu quả từ nấm *Fusarium oxysporum* nội sinh *Juniperus recurva* (Hình 2B, phụ lục B).

Bảng 1.2. Hàm lượng của podophyllotoxin (PTOX), demethylpodophyllotoxin (Dm PTOX) và deoxypodophyllotoxin (DPTOX) ở các loài khác nhau của chi *Juniperus* [15]

Cây chủ	Địa điểm lấy mẫu	Mô	Khối lượng (g)	Mùa (tháng)	Dịch chiết	PDT ($\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$)	DmPDT ($\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$)	DPDT ($\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$)
<i>Juniperus communis</i> L. Horstmann	Rombergpark, Germany	Twigs	10	June	Organic	623	<LOQ	17 235
					Aqueous	<LOQ	<LOQ	484
<i>Juniperus communis</i> L. Meyer	Rombergpark, Germany	Twigs	10	June	Total	623	<LOQ	17 719
					Organic	<LOQ	<LOQ	8248
					Aqueous	<LOQ	<LOQ	389
<i>Juniperus communis</i> L. Wilseder Berg	Rombergpark, Germany	Twigs	10	June	Total	<LOQ	<LOQ	8637
					Organic	1492	<LOQ	13 306
					Aqueous	<LOQ	<LOQ	943
<i>Juniperus communis</i> Hibernica (irischer Sa"ulenwachh older)	Rombergpark, Germany	Twigs	10	June	Total	1492	<LOQ	14 249
					Organic	<LOQ	<LOQ	7886
					Aqueous	<LOQ	<LOQ	355
<i>Juniperus blaaws</i>	Rombergpark, Germany	Twigs	10	June	Total	<LOQ	<LOQ	8241
					Organic	<LOQ	<LOQ	29
					Aqueous	<LOQ	<LOQ	33
<i>Juniperus procumbens</i> Tremonia	Rombergpark, Germany	Twigs	10	June	Total	<LOQ	<LOQ	62
					Organic	<LOQ	<LOQ	168
					Aqueous	<LOQ	<LOQ	20
<i>Juniperus x-media</i> Pfitzeriana	Rombergpark, Germany	Twigs	10	June	Total	<LOQ	<LOQ	25 006
					Organic	97030	<LOQ	2534
					Aqueous	3070	<LOQ	348
<i>Juniperus squamata</i> Wilsonii	Rombergpark, Germany	Twigs	10	June	Total	100100	<LOQ	25 006
					Organic	4611	<LOQ	2534
					Aqueous	<LOQ	<LOQ	348
<i>Juniperus recurva</i>	Yarika, J & K, India	Twigs	10	June	Total	4611	<LOQ	2882
					Organic	819	106	1683
					Aqueous	<LOQ	<LOQ	19
<i>Juniperus recurva</i>	Bonera, J & K, India	Twigs	10	June	Total	819	106	1702
					Organic	5522	214	91
					Aqueous	<LOQ	<LOQ	123
<i>Juniperus recurva</i>	Sonamarg, J & K, India	Twigs	10	June	Total	5522	214	214
					Organic	3230	288	11 269
					Aqueous	<LOQ	<LOQ	32

Phương pháp của M. Yousefzadi và cộng sự [91] khi tối ưu hoá chiết xuất PTOX cho thấy hệ dung môi metanol chiết xuất PTOX là cho kết quả tốt nhất, kết hợp với định lượng HPLC có thể xác định một lượng nhỏ PTOX trong nuôi cấy tế bào. Một nghiên cứu khác [16] cũng chỉ ra việc chiết xuất PTOX từ vi nấm nội sinh thông qua việc ngâm cấy tế bào trong dung môi methanol, tiếp đó chiết cạn với isopycnic chloroform và n-butyl alcohol, siêu âm phá vỡ tế bào, cô quay bay hơi dung môi, cạn còn lại xác định PTOX bởi TLC, HPLC...vv

Trên đây là một số các phương pháp tách chiết PTOX và dẫn xuất từ nấm nội sinh cho hiệu quả cao, đó là cơ sở cho nghiên cứu hiện tại khi lựa chọn hệ dung môi chiết xuất PTOX nhanh, an toàn.

2.2.2. Các nghiên cứu về gen và hệ gen liên quan đến chuyển hóa lignan ở vi nấm

Các nghiên cứu về toàn bộ hệ gen (WGS) đóng vai trò cốt lõi trong việc giải mã cơ chế sinh tổng hợp phức tạp của lignan, bao gồm cả PTOX, ở các chủng nấm nội sinh. WGS cung cấp dữ liệu cơ sở di truyền để xác định các gen tham gia vào con đường sinh tổng hợp PTOX và lignan. Làm rõ tính đa dạng sinh học: Sự đa dạng của các dẫn xuất lignan mà vi nấm tạo ra phụ thuộc vào sự biểu hiện và hoạt tính của các cụm gen CYP450 và các enzyme khác như methyltransferases và reductases. Việc phân tích hệ gen chi tiết cho phép xác định các cụm gen này, từ đó mở ra hướng nghiên cứu và tối ưu hóa khả năng sản xuất lignan của vi nấm nội sinh. Theo đó, Lignan, bao gồm cả PTOX, là sản phẩm của con đường sinh tổng hợp phức tạp, bắt đầu bằng việc chuyển hóa các tiền chất trong con đường Shikimate và Phenylpropanoid. Các monolignol (như coniferyl alcohol) được tạo ra và sau đó trải qua bước dimer hóa oxy hóa (oxidative coupling) quan trọng, xúc tác bởi các enzyme laccase hoặc peroxidase, được mã hóa bởi các gen tương ứng trong hệ gen nấm. Cơ chế hình thành các lignan phức tạp đòi hỏi sự tham gia của các enzyme chuyên biệt, nổi bật là họ gen cytochrome P450 monooxygenases (CYP450). Các enzyme này chịu trách nhiệm cho các phản ứng hydroxyl hóa, methylen hóa vòng, và tuần hoàn (cyclization), tạo nên cấu trúc vòng methylenedioxy đặc trưng của PTOX. Sự đa dạng của các dẫn xuất lignan mà vi nấm tạo ra phụ thuộc vào sự biểu hiện và hoạt tính của các cụm gen CYP450 và các enzyme khác như methyltransferases và reductases. Việc phân tích hệ gen chi tiết cho phép xác định các cụm gen này, từ đó mở ra hướng nghiên cứu và tối ưu hóa khả năng sản xuất lignan của vi nấm nội sinh. Nhiều nghiên cứu WGS đã được thực hiện trên các chi nấm quan trọng, đặc biệt là *Penicillium* và *Aspergillus*, mang lại các kết quả đáng chú ý.

Chi *Penicillium*, với 536 loài được công nhận, là một trong những chi nấm phổ biến và quan trọng nhất [92], [93]. Các loài *Penicillium* nổi tiếng với khả năng sản xuất nhiều loại chất chuyển hóa thứ cấp đa dạng, bao gồm các dẫn xuất phenalenone

[94], [95], polyene chuỗi dài [96], dẫn xuất acetaminophen [97] và dẫn xuất triene [98]. Tuy nhiên, các nghiên cứu tập trung vào giải trình tự bộ gen, khai thác và tìm kiếm các gen liên quan đến quá trình sinh tổng hợp các hợp chất hoạt tính sinh học trong *Penicillium herquei* vẫn còn hạn chế.

Các bộ gen *Penicillium* được nghiên cứu trước đây đã ước tính kích thước bộ gen, dao động từ 25 Mb đến 36 Mb [99]. Các loài *Penicillium* thường có từ bốn đến tám nhiễm sắc thể [100], [101]. Trong tương lai, các phương pháp giải trình tự bộ gen bổ sung như PacBio hoặc các phương pháp giải trình tự đọc dài khác có thể giúp lắp ráp bộ gen chính xác hơn [102]. Dữ liệu của nhóm Guohua Yin và cộng sự cho biết khả năng trao đổi chất thứ cấp phức tạp của *Penicillium* spp., đặc biệt liên quan đến cơ sở di truyền của độc tố nấm mốc [103]. Theo cơ sở dữ liệu GenBank, các bộ gen ty thể *Penicillium* thường có kích thước khoảng 26–28 kb. Một nghiên cứu đã phân tích bộ gen ty thể lõi của 15 bộ gen ty thể của *Aspergillus* và *Penicillium*, xác định được 14 gen mã hóa protein lõi, tất cả đều nằm trên mạch thẳng [104].

Các nghiên cứu gần đây đã mở rộng hiểu biết về bộ gen của chi *Penicillium*. Visagie và cộng sự đã công bố bộ gen dự thảo của ba loài *Penicillium* khác nhau *P. brevicompactum* 18316 (31,00 Mb), *P. biforme* 15300 (35,45 Mb), và *P. solitum* 18327 (34,18 Mb) [93]. Nhóm nghiên cứu của Huong Mai Pham đã giải trình tự bộ gen của chủng *Penicillium oxalicum* IIR1 phân lập từ rễ cây *Ixora chinensis* đã được giải trình tự bằng công nghệ Pacbio Sequel, Bộ gen hoàn chỉnh có kích thước 30,8 Mb, được lắp ráp thành 8 nhiễm sắc thể, cùng với một mitogenome 26 kb. Phân tích chức năng đã tiết lộ các gen mã hóa cytochrome P450 và các enzyme liên quan đến sinh tổng hợp chất chuyển hóa thứ cấp. Phân tích so sánh cho thấy bộ gen lớn và khép kín của *P. oxalicum* chứa 9.500 nhóm orthologous, cung cấp dữ liệu giá trị cho các nghiên cứu phát sinh loài và quần thể trong tương lai [105].

Ngoài ra, khi nghiên cứu bộ gen của *Aspergillus sojae* NBRC4239, sử dụng công nghệ giải trình tự pyrosequencing 454 và nghiên cứu bộ gen về các enzyme và các chất chuyển hóa thứ cấp so với các loài *Aspergillus* khác đã được giải trình tự đã tạo ra một trình tự không trùng lặp dài 39,5 Mb. Dữ liệu bộ gen *A. sojae* NBRC4239 sẽ hữu ích để mô tả các đặc điểm chức năng của nấm này được sử dụng trong các ngành công nghiệp Nhật Bản [106]. Hệ gen của chủng *Fusarium solani* MC503 nội sinh cây anh túc (*Macleaya cordata*), bằng cách sử dụng phần mềm BUSCO và CEGMA để đánh giá chất lượng lắp ráp bộ gen, kích thước bộ gen của chủng MC503 là 61.238.035 bp, nó cung cấp thông tin về các gen tiềm năng liên quan đến quá trình sinh tổng hợp các chất chuyển hóa thứ cấp, bao gồm cả ancaloit và khả năng tương

tác với cây chủ. Đây là một ví dụ về việc giải trình tự hệ gen để khám phá tiềm năng sinh học của nấm nội sinh [107].

Những kết quả giải trình tự bộ gen này là nền tảng quan trọng để hiểu rõ hơn về tiềm năng sinh tổng hợp của *Penicillium herquei* và các loài vi nấm khác. Chúng mở ra hướng đi cho việc khai thác các gen liên quan đến sản xuất các hợp chất hoạt tính sinh học, góp phần vào phát triển dược phẩm và các ứng dụng công nghệ sinh học khác.

2.2.3. Các gen chức năng tham gia con đường chuyển hóa podophyllotoxin và các dẫn xuất ở vi nấm

Vi sinh vật nội sinh đóng vai trò quan trọng trong việc thúc đẩy sự tăng trưởng, phát triển thực vật và bảo vệ vật chủ khỏi các tác nhân gây bệnh [108], [109]. Mối quan hệ tương tác sinh lý, dinh dưỡng và di truyền phức tạp giữa cộng đồng vi sinh vật nội sinh và vật chủ cho thấy sự đồng tiến hóa. Điều này cho phép chúng trao đổi vật liệu di truyền thông qua chuyển gen ngang và chia sẻ các con đường tổng hợp chất chuyển hóa thứ cấp [110], [111].

Trong các hệ sinh thái tự nhiên, vi sinh vật nội sinh và vật chủ của chúng cùng tồn tại trong các mối quan hệ di truyền và sinh thái phức tạp. Các nghiên cứu trước đây đã mô tả các con đường sinh tổng hợp của PTOX và xác định các gen, protein liên quan ở thực vật [112], [113], [114]. Cụ thể, ở *Podophyllum hexandrum*, ít nhất tám gen bao gồm DIR, PLR, SDH, CYP719A13, OMT3, CYP71CU1, OMT1 và 2-ODD được cho là đóng vai trò quan trọng trong việc chuyển đổi coniferyl alcohol thành DPTOX và etoposide [75]. Các gen này mã hóa cho các enzyme thực hiện các loại phản ứng khác nhau như oxy hóa, khử, methyl hóa và tổng hợp, từng bước xây dựng nên phân tử PTOX từ các tiền chất ban đầu.

Tuy nhiên, các cơ chế sinh hóa và phân tử chi phối quá trình sản xuất PTOX của nấm vẫn chưa được khám phá rộng rãi, đặc biệt đối với các nấm nội sinh như *Penicillium herquei*. Để làm sáng tỏ điều này, nhiều công cụ và phương pháp tin sinh học đã được sử dụng để xác định, chú thích và so sánh bộ gen vi khuẩn. Các công cụ này bao gồm phân tích trình tự khoảng cách phiên mã nội bộ (ITS), giải trình tự bộ gen, hệ gen so sánh, mảng vi mô, giải trình tự thế hệ tiếp theo, metagenomics và metatranscriptomics [94]. Những công cụ này cho phép phát hiện bộ gen nấm cũng như hiểu được mối liên hệ chặt chẽ giữa vi sinh vật nội sinh và vật chủ thực vật của chúng

Bảng 1.3. Vai trò xúc tác của các gen trong chuyển đổi coniferyl alcohol thành PTOX

STT	Gene		Vai trò
	ID	Description	
1	SDH	Secoisolariciresinol dehydrogenase	Xúc tác bước: Chuyển đổi secoisolariciresinol. Cụ thể hơn, trong con đường sinh tổng hợp lignan, enzyme dehydrogenase này thường xúc tác quá trình oxy hóa secoisolariciresinol thành matairesinol. Đây là một bước quan trọng trong việc chuyển đổi các lignan.
2	CYP71BE54	Desmethyl-deoxy-podophyllotoxin synthase	Xúc tác bước: Tổng hợp Desmethyl-deoxy-podophyllotoxin. Là một enzyme cytochrome P450, nó tham gia vào các phản ứng hydroxyl hóa hoặc các biến đổi oxy hóa khác để tạo ra desmethyl-deoxy-podophyllotoxin từ một tiền chất nào đó (chẳng hạn như deoxypodophyllotoxin hoặc một lignan liên quan).
3	CYP82D61	Demethylepipodophyllotoxin synthase	Xúc tác bước: Tổng hợp Demethylepipodophyllotoxin. Tương tự như enzyme CYP P450 khác, nó xúc tác một bước chuyển hóa oxy hóa để tạo ra demethylepipodophyllotoxin từ một tiền chất. Epi- thường chỉ một đồng phân cấu hình.
4	CYP719A23	Pluviatolide synthase	Xúc tác bước: Tổng hợp Pluviatolide. Enzyme này xúc tác phản ứng tạo ra pluviatolide, một lignan vòng, từ các tiền chất tuyến tính.
5	CPY719A24	Pluviatolide synthase	Xúc tác bước: Tổng hợp Pluviatolide. Tương tự như CYP719A23, nó cũng xúc tác phản ứng tạo ra pluviatolide. Có thể có sự dư thừa chức năng hoặc chúng hoạt động ở các điều kiện khác nhau.
6	CYP71CU1	Desmethyllatein synthase	Xúc tác bước: Tổng hợp Desmethyllatein. Xúc tác phản ứng tạo ra lignan desmethyllatein từ một tiền chất
7	VdtD*	Inactive carboxylesterase-like protein VdtD	Không trực tiếp xúc tác một bước sinh tổng hợp podophyllotoxin.

STT	Gene		Vai trò
	ID	Description	
			Mặc dù có "carboxylesterase-like", nhưng được mô tả là "inactive" (không hoạt động). Nó có thể là một protein có cấu trúc tương tự enzyme nhưng không có hoạt tính xúc tác, hoặc có vai trò khác không phải xúc tác trực tiếp (ví dụ: điều hòa, vận chuyển).
8	OMT3	Pluviatolide O-methyltransferase	Xúc tác bước: O-methyl hóa Pluviatolide. Enzyme này xúc tác phản ứng thêm một nhóm methyl (-CH ₃) vào một nguyên tử oxy trên phân tử pluviatolide. Đây là một bước biến đổi quan trọng trong nhiều con đường sinh tổng hợp.
9	OMT1	Desmethyl-yatein O-methyltransferase	Xúc tác bước: O-methyl hóa Desmethyl-yatein. Tương tự OMT3, enzyme này xúc tác phản ứng thêm nhóm methyl vào nguyên tử oxy trên phân tử desmethyl-yatein.
10	2-ODD	Deoxydophyllotoxin synthase	Xúc tác bước: Tổng hợp Deoxypodophyllotoxin. Enzyme này chịu trách nhiệm xúc tác phản ứng tạo ra deoxypodophyllotoxin, một tiền chất trực tiếp và rất gần với podophyllotoxin.
11	PLR	Bifunctional pinoresinol-lariciresinol reductase	Xúc tác bước: Khử pinoresinol và lariciresinol. Enzyme này xúc tác phản ứng khử (thêm hydro) trên hai lignan tiền chất là pinoresinol và lariciresinol, chuyển chúng thành các dạng khác trên con đường sinh tổng hợp.

3. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình sinh tổng hợp podophyllotoxin và các dẫn xuất của nó từ vi nấm nội sinh

Hiệu suất thu nhận PTOX từ vi nấm nội sinh trong quá trình lên men bị chi phối bởi nhiều yếu tố như thời gian, pH môi trường, nhiệt độ, nguồn carbon và nitơ. Việc xác định một chu trình lên men tối ưu cho từng chủng vi sinh vật là vô cùng quan trọng để đạt được sản lượng chất chuyển hóa cao nhất, do sự khác biệt về giai đoạn phát triển và sản xuất chất chuyển hóa giữa các chủng. Điểm chung ở hầu hết các chủng là khả năng sản sinh các hợp chất chuyển hóa thứ cấp chủ yếu diễn ra trong giai đoạn giữa và cuối pha cân bằng của quá trình lên men.

3.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Trong báo cáo của J.-X. Huang và nhóm nghiên cứu [115] về các chủng vi nấm nội sinh sinh tổng hợp PTOX có dải nhiệt độ từ 22-32 °C, nhiệt độ dưới 22 °C chủng phát triển kém và do đó ảnh hưởng tới hàm lượng PTOX sinh ra, ở nhiệt độ trên 35 °C- 37 °C chủng không sinh trưởng. Kết quả nghiên cứu [14], [15], [16], [116], cho thấy nhiệt độ tối ưu sinh hoạt chất PTOX trung bình từ 26 °C- 28 °C. Như vậy, nhiệt độ lên men có tác động rõ rệt đến sự sinh trưởng và sinh tổng hợp PTOX. Các nghiên cứu cho thấy khoảng nhiệt thích hợp cho sản sinh PTOX là không rộng.

3.2. Ảnh hưởng của pH

Khả năng sinh trưởng của vi nấm diễn ra trong một khoảng pH rộng, từ 2 đến 9, với điều kiện tối ưu thường là khoảng 5 đến 7. Trong quá trình phát triển, sự thay đổi pH môi trường có thể làm biến đổi hoạt động trao đổi chất của vi nấm, bao gồm việc hấp thu chất dinh dưỡng và bài tiết các chất chuyển hóa. Cụ thể, việc giải phóng các axit hữu cơ như axit oxalic có xu hướng làm giảm pH, trong khi quá trình đồng hóa axit hữu cơ hoặc thủy phân urê lại làm tăng pH.

Độ pH là một yếu tố then chốt ảnh hưởng đến tính thấm của thành và màng tế bào nấm, từ đó tác động trực tiếp đến sự vận chuyển ion và các chất khác qua màng tế bào. Do đó, pH của môi trường nuôi cấy có vai trò quyết định đối với quá trình trao đổi chất và đặc biệt là sự sinh tổng hợp các hợp chất chuyển hóa, đồng thời ảnh hưởng rõ rệt đến sự phát triển của vi sinh vật nội sinh [87].

Mỗi loài vi sinh vật đều có một khoảng pH sinh trưởng đặc trưng và một giá trị pH tối ưu cho sự phát triển. Dựa vào pH tối ưu, các vi sinh vật được phân loại thành ưa axit (pH 0-5,5), ưa trung tính (pH 5,5-8,0) và ưa kiềm (pH 8,5-11,5). Một số loài có thể phát triển tốt nhất ở pH 10 trở lên. Các nghiên cứu cho thấy rằng pH tối ưu cho sự phát triển và sinh tổng hợp PTOX của vi nấm thường nằm trong khoảng axit yếu, cụ thể là từ 5.6-6.5 [14], [15], [16], [85]. Điều này cho thấy pH môi trường nuôi cấy nên được điều chỉnh để phù hợp với các chủng nấm nội sinh, nhằm đạt được

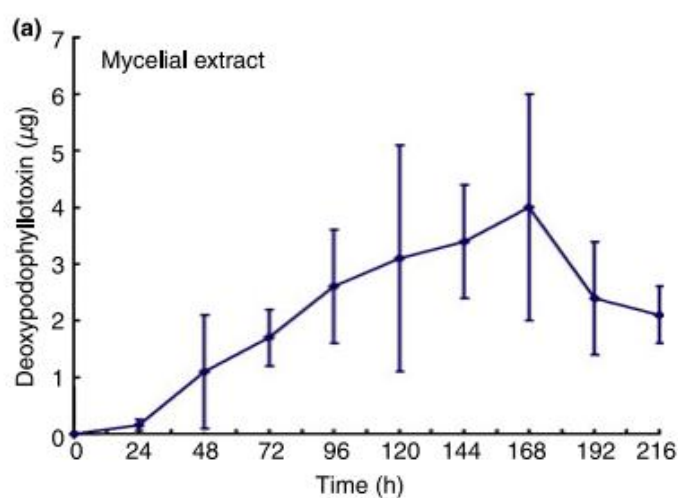
sản lượng mong muốn. Do đó, các nghiên cứu về ảnh hưởng của pH là rất cần thiết để tối ưu hóa hiệu suất sinh tổng hợp PTOX.

3.3. Ảnh hưởng của tốc độ lắc và thể tích dịch lên men

Sự dao động về tốc độ lắc có tác động đến sinh trưởng của sợi nấm trong môi trường dịch thể. Khi lắc, oxy hòa tan được đưa vào môi trường tốt hơn và sợi nấm được đảo trộn đều, giúp chúng tiếp xúc đồng đều với môi trường từ trên xuống dưới. Thể tích dịch lên men trong thiết bị nuôi cấy cũng rất quan trọng để cung cấp đủ lượng oxy hòa tan và tốc độ thông thoáng, tạo điều kiện cho vi sinh vật phát triển và tổng hợp các hợp chất thứ cấp quan trọng.

Các nghiên cứu thường tối ưu tốc độ lắc trong khoảng 100 đến 250 vòng/phút, với tỷ lệ thể tích môi trường nuôi/thể tích bình là 5-30% (v/v). Chẳng hạn, một báo cáo của S. Kusari và cộng sự [15] đã chỉ ra rằng chủng nấm *Aspergillus fumigatus* Fresenius sản sinh PTOX hiệu quả dưới điều kiện lắc 200 vòng/phút và thể tích dịch nuôi cấy 20%. Tương tự, một nghiên cứu khác [14] cho thấy chủng *Fusarium solani* có thể sản xuất PTOX khi được lắc ở 100 vòng/phút, với thể tích dịch nuôi cấy 40%. Với nấm *Phellinus linteus* tăng trưởng tốt nhất ở 150 vòng/phút, ở 200 vòng/phút mật độ nấm giảm [117].

3.4. Ảnh hưởng của thời gian



Hình 1.6. Thời gian lên men *Aspergillus fumigatus* Fresenius sinh tổng hợp deoxypodophyllotoxin [15]

Nhiều nghiên cứu đã chứng minh khả năng sản xuất thành công các hợp chất có hoạt tính sinh học từ nấm nội sinh. Mohammad Nadeem và cộng sự đã nuôi cấy nấm *Fusarium solani* trên môi trường PDB trong 15 ngày, thu được sản lượng PTOX là 29,0 μg/g trọng lượng khô tế bào ở 28 °C và pH 6,5, với tốc độ lắc 100 vòng/phút [14]. Tương tự, *Mucor fragilis* Fresen tổng hợp được 49,3 μg/g PTOX sau 7 ngày

nuôi cấy ở 26 °C, pH 6,5 và 180 vòng/phút [116]. Năm 2009, S. Kusari và cộng sự cũng báo cáo sản lượng DPTOX từ nấm *Aspergillus fumigatus* Fresenius là 4 ± 2 µg/100 g trọng lượng khô tế bào, sau 9 ngày lên men ở 28 ± 2 °C, pH 5,6 và 200 vòng/phút [15]. Một nghiên cứu khác đã nuôi cấy chủng TG9 trong 300 mL môi trường lỏng PDA ở 28 °C, pH 6,0 và 120 vòng/phút trong một tuần, sau đó xác định sự hiện diện của PTOX bằng phương pháp HPLC [16]. Những nghiên cứu này đã chứng minh rằng thời gian tối ưu cho quá trình sinh tổng hợp PTOX và các dẫn xuất của nó là khác nhau, tùy thuộc vào đặc tính sinh học của từng chủng nấm và điều kiện nuôi cấy cụ thể.

3.5. Ảnh hưởng của nguồn carbon và nitơ

Theo Gogoi và cộng sự, nghiên cứu của họ đã đi sâu vào tác động của các nguồn carbon và nitơ đối với sự phát triển và khả năng sản xuất chất chuyển hóa thứ cấp của chủng nấm *Fusarium sp.* DF2. Vi nấm này đạt sinh khối và sản lượng chất chuyển hóa cao nhất khi môi trường lên men chứa 0,1% dextrose, tiếp theo là glucose, sucrose và glycerol. Ngược lại, việc sử dụng tinh bột, lactose và mannitol làm giảm đáng kể cả sinh khối và lượng chất chuyển hóa

Khi nghiên cứu về nguồn nitơ, các nhà khoa học nhận thấy dịch chiết nấm men có khả năng thúc đẩy sự tích lũy chất chuyển hóa thứ cấp, trong khi dịch chiết bò, pepton và $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ chủ yếu làm tăng sinh khối nhưng không hiệu quả trong việc sản xuất các hoạt chất sinh học [118]. Trong báo cáo của [29] khi bổ sung 1% đường glucose; 1% cao nấm men; 0.5 % pepton; 0.5% tryton trong môi trường lên men chủng *Penicillium reticulisporum* tsp41 sinh tổng hợp Huperzin A cao nhất 0,0341 mg/L dịch lên men. Phân lập từ môi trường nước ở rừng ngập mặn Yung Shue O, Hồng Kông, chủng vi nấm biển *A. saccharicola* phát triển tối ưu trong môi trường có bổ sung 0,5% pepton và 0,5% dịch chiết nấm men. Trong khi glucose không tác động đến sự tăng trưởng, nó lại là yếu tố quan trọng đối với quá trình sinh tổng hợp các hợp chất kháng khuẩn của chủng vi nấm này [119].

3.6. Ảnh hưởng của tỷ lệ giống

Bên cạnh các yếu tố môi trường dinh dưỡng, tỷ lệ tiếp giống ban đầu cũng là một yếu tố quan trọng cần xác định để đảm bảo quá trình sinh trưởng diễn ra hiệu quả. Tỷ lệ này ảnh hưởng trực tiếp đến sự cạnh tranh của vi sinh vật về dinh dưỡng và oxy. Cả khi mật độ tế bào quá cao hoặc quá thấp đều có thể làm giảm khả năng sinh trưởng [120]. Nếu mật độ ban đầu quá thấp, pha sinh trưởng log có thể bị kéo dài, trong khi mật độ ban đầu quá cao có thể nhanh chóng dẫn đến pha tử vong [121]. Ở hầu hết các nghiên cứu tỷ lệ tiếp giống thường dao động trong khoảng 1-15%, tùy thuộc vào quá trình khảo sát ban đầu.

3.7. Ảnh hưởng của nguồn cơ chất cảm ứng

Một số nghiên cứu gần đây đã chứng minh tầm quan trọng của việc tối ưu hóa quá trình lên men cùng với việc sử dụng các nguồn cơ chất cảm ứng để tối đa hóa việc sản xuất các hợp chất có lợi ích kinh tế từ nấm nội sinh. Theo nghiên cứu của [29] nguồn ethanol và methanol được bổ sung vào môi trường như nguồn carbon đạt nồng độ cuối 0,5-2% đã kích thích sự phát triển của nấm và làm tăng khả năng sản xuất Huperzin A. Cũng liên quan đến việc làm tăng cường khả năng sinh tổng hợp Huperzin A, [122] đã bổ sung vào môi trường lên men một số chất cảm ứng HSE (*H. serata* extracts- tách chiết từ lá thạch tùng rang cưa), L-Lysine và acid acetic với các nồng độ lên men khác nhau. Kết quả cho thấy L-Lysine và HSE đã kích thích khả năng sinh Huperzin A và hệ sợi nấm. Trên cơ sở đó, chúng tôi đã bổ sung cao chiết từ cây Bát Giác Liên để nghiên cứu nâng cao hoạt tính PTOX từ nấm nội sinh. Dựa vào con đường sinh tổng hợp PTOX và các dẫn xuất cho thấy axit ferulic và axit cinnamic là những enzyme quan trọng tham gia vào quá trình sinh tổng hợp PTOX, phenylalanine như một nguồn nitơ và các gốc alcohol cần được xem xét đưa vào nghiên cứu.

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

2.1.1. Vật liệu nghiên cứu

Mẫu cây được liệu Bát Giác Liên (Loài *Dysosma difformis* (hemsl.&E.H.Wilson) T.H.Wang) khoẻ mạnh được thu thập ngẫu nhiên vào tháng 06/2020 tại Thôn Phìn Sảng, Xã Minh Tân, Huyện Vị Xuyên, Tỉnh Hà Giang. Tọa độ: 23°0'40.14"N 104°53'6.92"E, độ cao 1074 m và Bản Ngải Thầu, Xã Khun Há, Huyện Tam Đường, tỉnh Lai Châu. Tọa độ: 22°13'2.55"N 103°35'0.58"E, độ cao 1890m. Nhiệt độ trung bình dao động khoảng 18-27 °C.

Chủng vi sinh vật: Gram âm (*Escherichia coli* DH5) và Gram dương (*Staphylococcus* sp., *Bacillus* 7TM11, *Bacillus* 2TM6, *Enterobacter* 14RM7-1) được lưu giữ tại Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Sinh học.

Các dòng tế bào ung thư ở người: SK-LU-1 (tế bào ung thư phổi); HepG2 (tế bào ung thư gan); HL-60 (tế bào bạch cầu cấp tính) do GS. TS. J. M. Pezzuto, Trường Đại học Long-Island, US và GS. Jeanette Maier, trường Đại học Milan, Italia cung cấp.

2.1.2. Thiết bị và hóa chất nghiên cứu

Thiết bị, dụng cụ nghiên cứu:

Box cấy (Esco), tủ sấy (Selecta 52 L), tủ ẩm nuôi cấy trong tối, máy lắc ổn nhiệt (WiseCube), máy PCR, máy điện di, máy voltex, máy li tâm, máy siêu âm phá vỡ tế bào, nồi hấp tiệt trùng (ALPMC-40DP), Kính hiển vi quang học (Carl Zeiss), tủ hút Streamline Class II (ESCO, Troisdorf, Đức); ELISA Plate Reader (Biotek, USA); Tủ lạnh sâu -20 °C, -80 °C; Tủ lạnh 4 °C; Bình nitơ lỏng; Cân kỹ thuật (SHINKO GS 600G), Máy lọc nước; Hệ thống lên men Bioflo 10 L (New Brunswick); Hệ thống lên men Blue Fer 100 L (Blue Fer 100, Vilab – Việt Nam); Máy đo pH (Hanna); Tủ lạnh 4 °C giữ giống (Jeio Tech); Máy cô quay R300 (Buchi, Flawil, Switzerland).

Sắc ký lớp mỏng được thực hiện trên bản mỏng nhôm tráng sẵn silicagel 60 F254 Merk (dày 0,25mm) với hệ dung môi dichloromethane:methanol tỷ lệ (9:1, v/v). Quan sát các vết sắc ký được thực hiện bằng đèn UV ở bước sóng 365nm, tiếp theo là hiện màu bằng dung dịch H₂SO₄ 10%.

Các dụng cụ như cối, chày sứ, pank, đĩa cấy, giấy thấm, dao, kéo, đĩa petri, que cấy, que trang, phiến kính, lamên, pipetman, bình tam giác 250ml, 500ml; Bình pyrex 500ml, bông không thấm nước, giấy bạc, cân kỹ thuật. Dụng cụ được hấp tiệt trùng ở 121 °C, 1atm trong 30 phút.

Hóa chất nghiên cứu

Các hóa chất sử dụng: podophyllotoxin (Sigma, CAS No. 518-28-5); D-glucose (Germany); TCA 20% (Sigma, Germany); G-spin™ Total DNA Extraction kit (INtRON Biotechnology, Sangdaewon, Korea); Methanol hữu cơ (India); Ethanol 70%, Sodium thiosulfat 2,5% (MERCK), Sodium hypoclorit 5% (MERCK); Ellipticine (Sigma, Germany); DMSO 1% (Sigma, Germany); Cefotaxime (Invitrogen, Carlsbad, CA, Mỹ).

Một số hóa chất khác: Nitor lỏng, CTAB, NaCl, NaOH, Tris-HCl, EDTA, H₂O deion, Isopropanol, Ethanol, Chloroform, Isoamyl alcohol, RNase, đệm rửa, đệm tách, javen, cồn 75⁰,...

Cặp mồi ITS1/ITS4 khuếch đại vùng ITS:

ITS1 (5'-CCGTAGGTGAACCTGCGG-3') và

ITS4 (5'-TCC TCCGCTTATTGATATGC-3')

Môi trường nuôi cấy nấm: Thạch khoai tây glucose (PDA): Khoai tây, 20 g/l; glucose, 20 g/l; thạch, 20 g/l; nước cất 1 lít; pH 6,5 ± 0,2. Cách tiến hành, khoai tây gọt vỏ, rửa sạch, cắt thành dạng hạt lựu, bổ sung 500 ml nước cất và đun sôi trong 20 phút, sau đó lọc chiết lấy nước trong, hòa tan glucose và thêm nước cất đến 1000 ml.

Môi trường nuôi cấy khuẩn: Môi trường thạch Lysogeny Broth (LB): Peptone, 10 g/l; cao nấm men, 5 g/l; NaCl, 5 g/l; thạch, 20 g/l; nước cất 1 lít; pH 7,0 ± 0,2.

Địa điểm thực hiện nghiên cứu

Việc xác định loài *Dysosma difformis* (Bát Giác Liên) do Trịnh Ngọc Bon, Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam và Nguyễn Thị Thanh Hương, phòng Thực vật học, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật xác định.

Hoạt tính gây độc tế bào của mẫu nghiên cứu đã được thử nghiệm tại Phòng thử nghiệm sinh học, Viện Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Việc phân lập và xác định cấu trúc phân tử được thực hiện tại Phòng Dược liệu biển, thuộc Viện Hóa Học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Phân lập, tách chiết và nghiên cứu các điều kiện nuôi cấy nấm nội sinh, hoạt tính kháng khuẩn được thực hiện tại Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Phương pháp thu thập mẫu cây dược liệu

Mẫu cây Bát Giác Liên thuộc chi *Podophyllum* (*Dysosma*) được thu thập tại

khu bảo tồn tự nhiên tại Lai Châu, Hà Giang. Lựa chọn các cây khỏe mạnh, không còi cọc, không bị sâu hại hay biểu hiện bệnh như đốm lá, vàng cây... thu thập vào túi bóng vô trùng và bảo quản ở 8-10 °C cho tới khi thí nghiệm trong vòng 24h.

2.2.2. Phương pháp định danh mẫu được liệu nghiên cứu

- Phương pháp truyền thống: Mẫu sau khi thu thập được phân loại dựa trên phương pháp hình thái truyền thống phân loại thực vật [18], [22].

- Phương pháp sinh học phân tử: DNA lá non của mẫu cây được liệu nghiên cứu được tách chiết và tinh sạch theo phương pháp CTAB của Doyle và cs. có cải tiến [123].

Kiểm tra sản phẩm DNA sau tách chiết được điện di trên gel agarose 1%. Nồng độ và độ tinh sạch của DNA tổng số của mẫu thể hiện qua thông số A260/280 (1,6-2,0 được coi là mẫu tinh sạch).

Thực hiện phản ứng PCR: Thành phần phản ứng PCR bao gồm

Bảng 2.1. Thành phần của phản ứng PCR/tổng thể tích mẫu

Thành phần	Thể tích
DNA (100 ng/μl)	4μl
Môi xuôi (100 pM)	2 μl
Môi ngược (100 pM)	2 μl
Buffer (10X)	5 μl
MgCl ₂ (25mM)	5μl
dNTP (2,5mM)	5μl
Tag polymerase (1 U/ μl)	2μl
H ₂ O	25 μl
Tổng	50 μl

Chu trình nhiệt cho gen matK: 94°C/5 phút; lặp lại 35 chu kỳ với (94°C/30 giây, 50-54 °C/60 giây, 72°C /50 giây); 72°C /10 phút và giữ ở 4°C.

Cặp môi khuếch đại gen đích matK:

matK-F 5'- CGATCTATTTCATTCAATATTTC-3'

matK-R 5'- TCTAGCACACGAAAGTCGAAGT-3'

Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng cách chạy điện di trên gel agarose 1% ở điện áp 60-80 V trong 45 phút, sau đó nhuộm bằng ethidium bromide để hiển thị các

bằng. Kích thước tương đối của các băng được so sánh với thước DNA 1 kb (GeneRuler 1kb DNA Ladder SM0311, Thermo Scientific). Sau khi tinh sạch, các sản phẩm PCR được giải trình tự trên hệ thống ABI PRISM® 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) theo nguyên lý của Sanger.

Phân tích kết quả: Trình tự các phân đoạn gen của mẫu thực vật được so sánh với trình tự của các loài tham chiếu trên ngân hàng Genbank (NCBI) thông qua phần mềm Bioedit.

2.2.3. Phương pháp chiết xuất thực vật từ mẫu rễ cây Bát Giác Liên

Tương tự như chiết xuất nấm, mẫu cây Bát Giác Liên được rửa sạch nhiều lần với nước cất, khử trùng bề mặt với ethanol 70 % trong 5 phút, cắt rễ thành các đoạn nhỏ 1 cm trong điều kiện vô trùng, nghiền nát và sấy khô đến trọng lượng không đổi. Bột khô sau đó được ngâm trong 100 ml metanol trong 24 giờ và siêu âm trong 1 giờ, tần số 20 kHz, lặp lại 3 lần để thu được dung dịch chiết xuất rễ cây. Sau khi lọc, dịch lọc chiết xuất rễ cây được bay hơi bằng thiết bị cô quay R300 ở 30 °C để thu cao chiết phục vụ các nghiên cứu tiếp theo [16] với một số bổ sung.

2.2.4. Phương pháp phân lập và định loại vi nấm nội sinh

2.2.4.1. Quy trình khử trùng bề mặt mẫu với một số bổ sung [124], [125]

Nhằm đảm bảo chắc chắn nấm thu được là nấm nội sinh, nhóm nghiên cứu đã thực hiện các bước xử lý bề mặt mẫu cây Bát Giác Liên để loại bỏ hoàn toàn vi nấm và vi khuẩn ngoại sinh. Các mẫu rễ, thân, lá được rửa sạch dưới vòi nước để loại bỏ đất và sau đó để khô tự nhiên. Tiếp theo, các mẫu này được rửa lại bằng nước cất vô trùng rồi cắt thành các đoạn có kích thước 1 cm đặt trên giấy thấm vô trùng, để khô trong box cấy vô trùng. Tiến hành khử trùng bề mặt bằng cồn 70% trong 3 phút (đối với mẫu lá) hoặc 5 phút (đối với mẫu rễ và thân), sau đó rửa bằng natri hypochlorit 5% cho 2 phút (đối với mẫu lá) hoặc 3 phút (đối với rễ và thân), ngâm trong dung dịch natri thiosulfat 2,5% trong 5 phút, tiếp theo rửa sạch trong ethanol 75%. Mẫu được tráng lại bằng nước cất vô trùng vài lần, thấm khô bằng giấy thấm vô trùng, sau đó đặt mẫu trên các đĩa chứa môi trường thạch LB. Các đĩa petri được ủ ở 25 °C và kiểm tra hàng ngày. Sau 5 ngày, mẫu nào không có dấu hiệu phát triển của vi khuẩn hoặc vi nấm xung quanh vùng cấy sẽ được xác nhận là sạch và đủ điều kiện cho việc phân lập vi nấm nội sinh.

2.2.4.2. Phân lập nấm nội sinh

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

Bước 2. Mẫu nghiền được phết lên thạch đĩa PDA có bổ sung chloramphenicol

(0,2%), mỗi mẫu được lặp lại ít nhất 3 lần và được ủ ở 25 ± 2 °C trong 1-2 tuần. Từ mô thực vật sau khi được nghiền nát xuất hiện các khuẩn lạc nấm được coi là vi nấm nội sinh. Những loại nấm này được thuần khiết thêm trên các đĩa PDA mới để thu được các chủng nấm sạch.

Các chủng nấm nội sinh thu được, được mã hóa theo vị trí và mô ban đầu (mã hóa HG, LC cho các mẫu từ Hà Giang và Lai Châu; mã hóa L, T, R cho các mẫu từ lá, thân, rễ tương ứng). Các nấm nội sinh này được cấy trong các ống thạch nghiêng PDA và lưu trữ thời gian ngắn ở nhiệt độ 4 °C, giữ lâu dài trong môi trường PDA lỏng có bổ sung 40% glycerol ở -80 °C tại Bộ sưu tập vi sinh vật thuộc Viện Sinh học.

2.2.4.3. Định danh vi nấm sơ bộ bằng phương pháp truyền thống và bảo quản

Nhận dạng chủng nấm qua màu sắc, hình dạng, kích thước, dạng mặt, dạng mép khuẩn lạc, màu sắc hệ sợi, màu sắc mặt dưới, giọt tiết, sắc tố khuếch tán ra môi trường và các đặc điểm vi thể như vách ngăn sợi nấm, bào tử và cuống bào tử, ... theo các khoá phân loại [126], [127], [128] để sơ bộ nhận dạng, phân loại các chủng nấm đến chi.

2.2.4.4. Định danh vi nấm sơ bộ bằng phương pháp sinh học phân tử [129]

**Tách chiết DNA:* Nghiền khoảng 10-50 mg mẫu sinh khối nấm trong nitor lỏng và tách chiết DNA tổng số theo kit tách chiết DNA genom G-spin™ Total DNA Extraction kit (INTRON, Korea).

**Thực hiện phản ứng PCR:* DNA tổng số của chủng được sử dụng trong phản ứng PCR nhằm nhân dòng các gene quan tâm thông qua cặp mồi đặc hiệu

ITS1 (forward): 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'

ITS4 (reverse): 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

Thể tích phản ứng PCR (50µl) bao gồm 300 ng DNA khuôn, 25 µl hỗn hợp Big Dye Terminator sequencing, 1,5 µmol/l mỗi mồi và nước khử ion. Chu trình nhiệt bao gồm: 95 °C trong 1 phút; sau đó là 36 chu kỳ nhiệt: 94 °C trong 30 giây, 53 °C trong 20 giây, 72 °C trong 30 giây; kéo dài ở 72 °C trong 5 phút; giữ ở 15 °C cho đến khi lấy mẫu. Sau khuếch đại, điện di sản phẩm PCR trên gel agarosa 1%, đoạn DNA có kích thước khoảng 490 bp là phù hợp.

Tiếp theo, đoạn gen được xác định trình tự nucleotit bằng máy giải trình tự AEI PRISM @ 3700 Genetic Analyzer. Trình tự nucleotit đã được phân tích bằng phần mềm BioEdit sequence Alignment Editor. Sau đó, trình tự vùng này được so sánh với cơ sở dữ liệu trên Genbank (NCBI) sử dụng công cụ BLAST SEARCH.

Độ đồng nhất trình tự lớn hơn 99%, giữa 95% và 99%, $\leq 95\%$ tương ứng với phân loại cấp loài, chi, họ.

2.2.4.5. Phương pháp xây dựng cây phân loại

Tất cả các trình tự đã được điều chỉnh bằng cách loại bỏ các khoảng trống và dữ liệu bị thiếu trong phần mềm Chromas 2.5 trước khi được sử dụng để phân tích phát sinh loài trong phần mềm MEGA7. Phương pháp Neighbor-Joining đã được sử dụng để suy ra lịch sử tiến hóa. Khoảng cách tiến hóa đã được chứng minh bằng phương pháp Maximum Composite Liability. Các giá trị Bootstrap nhỏ hơn 50 không được hiển thị trên phát sinh loài [130].

2.2.4.6. Phương pháp phân tích chỉ số đa dạng

Sự đa dạng của nấm nội sinh đã được phân tích bằng cách sử dụng các chỉ số khác nhau như chỉ số ưu thế Simpson (D), chỉ số đa dạng Simpson (1 - D), chỉ số đa dạng Shannon (H'), chỉ số giàu có Margalef (Dmg), chỉ số giàu có Menhinick (Dmn), chỉ số ưu thế Camargo (1/Dmn) và chỉ số đồng đều Pielou (P). Chỉ số tương đồng cho các quần thể nấm nội sinh giữa các mô được thử nghiệm và vị trí lấy mẫu cũng được đánh giá bằng cách sử dụng chỉ số Sorensen (S) [131], [132], [133], [134]. Theo đó, công thức tính các chỉ số như sau:

Chỉ số ưu thế Simpson (D)	Trong đó:	$D = \sum_{i=1}^S (n_i/N)^2$
	ni: Số lượng cá thể (hoặc khuẩn lạc) của loài thứ i.	
	N: Tổng số cá thể (hoặc khuẩn lạc) của tất cả các loài trong mẫu.	
	S: Tổng số loài (hoặc OTU) tìm thấy trong mẫu.	
Chỉ số đa dạng Simpson (1 - D)		$1 - D = 1 - \sum_{i=1}^S (n_i/N)^2$
Chỉ số đa dạng Shannon (H')	Trong đó:	$H' = - \sum_{i=1}^S (p_i \cdot \ln p_i)$
	• pi: Tỷ lệ cá thể của loài thứ i trong quần xã (ni/N).	
	• ln: Logarit tự nhiên.	
Chỉ số giàu có Margalef (Dmg)	Trong đó:	$Dmg = (S - 1) / \ln N$
	• S: Tổng số loài (hoặc OTU) tìm thấy trong mẫu.	

- N: Tổng số cá thể (hoặc khuẩn lạc) của tất cả các loài trong mẫu.

Chỉ số giàu có
Menhinick (Dmn)

$$Dmn = S/\sqrt{N}$$

Trong đó:

- S: Tổng số loài (hoặc OTU) tìm thấy trong mẫu.
- N: Tổng số cá thể (hoặc khuẩn lạc) của tất cả các loài trong mẫu.

Chỉ số ưu thế
Camargo (1/Dmn)

$$1/Dmn = \sqrt{N}/S$$

Chỉ số đồng đều
Pielou (P)

$$P(\text{hoặc } J') = H' / \ln S$$

Trong đó:

- H': Chỉ số đa dạng Shannon.
- S: Tổng số loài (hoặc OTU) tìm thấy trong mẫu.

Chỉ số Sorensen (S)

$$S = 2C/(A + B)$$

Trong đó:

- A: Số lượng loài (hoặc OTU) chỉ có trong quần xã/mẫu thứ nhất.
 - B: Số lượng loài (hoặc OTU) chỉ có trong quần xã/mẫu thứ hai.
 - C: Số lượng loài (hoặc OTU) có mặt ở cả hai quần xã/mẫu.
-

2.2.4.7. Phương pháp xác định đặc điểm sinh học

- *Phương pháp xác định các đặc điểm sinh lý sinh hoá bao gồm pH, nhiệt độ, khả năng sinh các enzyme ngoại bào* [135], [136]. Khảo sát dải pH từ 5-8 hoặc dải nhiệt độ 22 °C - 37 °C, các yếu tố cơ bản khác giữ nguyên. Xác định hoạt tính enzyme cellulase tác động lên cơ chất là cellulose 0,2% trong môi trường thạch. Cơ chất bị phân hủy làm độ đục của môi trường bị giảm và trở nên trắng đục khi nhuộm bằng dung dịch Lugol. Độ lớn của vòng phân giải phản ánh hoạt tính của enzyme cellulase.

- *Phương pháp xác định hoạt tính enzyme ngoại bào chitinase* [114]. Chitinase tác động lên cơ chất là chitin 0,2% trong môi trường thạch. Cơ chất bị phân hủy làm độ đục của môi trường bị giảm và trở nên trong suốt khi nhuộm bằng dung dịch Lugol. Độ lớn của vòng phân giải phản ánh hoạt tính của enzyme chitinase.

2.2.5. Phương pháp sàng lọc các chủng nấm nội sinh sinh hoạt chất podophyllotoxin và các dẫn xuất

2.2.5.1. Phương pháp nuôi cấy chủng nấm

Chủng vi nấm được nuôi cấy trong bình tam giác có dung tích 500 ml chứa 100 ml môi trường PDA, pH 7. Quá trình nuôi cấy diễn ra trên máy lắc tốc độ 150 vòng/phút ở nhiệt độ 25 °C. Sau thời gian ≥ 120 giờ tùy chủng, sinh khối sẽ được thu hoạch.

2.2.5.2. Phương pháp thu chiết xuất nấm [16] với một số bổ sung

Nấm nội sinh được nuôi cấy trong 100 ml PDA, pH 7, lắc 150 vòng/phút ở 25 ± 2 °C trong 5 ngày. Sinh khối và dịch lọc nuôi cấy được thu thập riêng biệt thông qua giấy lọc. Sinh khối tươi sau đó được rửa với nước cất hai lần và sấy khô ở 45 °C –60 °C. Sinh khối khô được ngâm trong 100 mL dung môi hữu cơ methanol trong 24 giờ, siêu âm phá vỡ tế bào trong 1 giờ lặp lại 3 lần để thu được chiết xuất sinh khối nấm. Sau khi lọc, dịch lọc lên men được bay hơi để thu được cao chiết dịch lọc. Chiết xuất sinh khối nấm và cao chiết dịch lọc nuôi cấy được trộn và sau đó cô quay ở 30 °C trong máy bay hơi R300 loại dung môi, thu chiết xuất nấm cho các nghiên cứu tiếp theo.

2.2.5.3. Phương pháp xác định hoạt chất podophyllotoxin và dẫn xuất

Phương pháp phát hiện nhanh bằng sắc ký bản mỏng TLC (Thin layer Chromatography) theo [116] với một số bổ sung: Chiết xuất nấm được hoà trong metanol (nồng độ 1 mg / ml). Phân tích 5 μ L dịch chiết lên men trong methanol (nồng độ 1 mg/mL) trên bản silica gel 0,25 mm và được thực hiện trong hệ dung môi Diclomethan:metanol (9:1, v/v). Chất chuẩn podophyllotoxin (1 mg/ml metanol) được sử dụng như đối chứng dương. Bản silica gel được phun H₂SO₄ 10 % để phát hiện PTOX hoặc được soi dưới tia UV bước sóng 254 nm để phát hiện các chất trong chiết xuất theo nghiên cứu của [137].

Phương pháp phân tích mẫu bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC (High-performance liquid chromatography) như mô tả của [138] với một số bổ sung, PTOX trong chiết xuất nấm được phân tích trong điều kiện sau:

Hệ thống HPLC Agilent 1200 được trang bị đầu dò detector (DAD) (Agilent Technologies, PaloAlto, CA, Hoa Kỳ).

Phạm vi bước sóng phát hiện từ 210 nm đến 365 nm, thu thập sắc ký được xác định ở 210 nm.

Cột sắc ký Eclipse XDB-C18 (kích thước hạt 250 mm x 4,6 mm, 5 μ m) (Agilent Technologies) ở nhiệt độ 25 °C.

Pha động là H₂O (A)/acetonitril (B) (Merck), tốc độ dòng 0,5 ml/phút

Nồng độ mẫu (Chiết xuất nấm và thực vật trong methanol): 10 mg/ml

Nồng độ chất chuẩn (podophyllotoxin trong metanol): 1 mg/ml

Thể tích tiêm mẫu 10 µl.

Pha động ACN-H₂O, chương trình rửa giải gradient dung môi:

Thời gian (phút):	0	10	23	35	60
ACN (% thể tích):	10	20	50	90	90

Việc xác định PTOX và các dẫn xuất được thực hiện bằng cách so sánh thời gian lưu (Rt) và phổ UV với PTOX chuẩn.

2.2.6. Phương pháp xác định hoạt tính gây độc tế bào của chiết xuất nấm

Quy trình nuôi cấy tế bào in vitro

Để nuôi cấy các dòng tế bào ung thư HL-60 và SK-LU-1 theo phương pháp đơn lớp, chúng tôi sử dụng môi trường DMEM (Hyclone, Logan, UT, Hoa Kỳ) có bổ sung 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate và 10% FBS (GIBCO). Đối với dòng tế bào HepG2, môi trường nuôi cấy là DMEM chứa 10% FBS (Huyết thanh bò thai nhi), 100 mg/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin (Sigma, Roedermark, Đức), cùng với 1% insulin. Tế bào được cấy chuyển sau mỗi 3 ngày với tỷ lệ 1:3 và được ủ trong tủ ấm CO₂ ở điều kiện 37°C và 5% CO₂.

Quy trình thực hiện

Phương pháp thử độc tế bào *in vitro*, được Viện Ung thư Quốc gia Hoa Kỳ (NCI) công nhận là một xét nghiệm chuẩn để sàng lọc và nhận diện các hợp chất có hoạt tính ức chế hoặc tiêu diệt tế bào ung thư trong môi trường *in vitro*, đã được áp dụng. Chúng tôi đã đánh giá độc tính tế bào của chiết xuất nấm bằng cách sử dụng xét nghiệm sulforhodamine B (SRB), với một số cải tiến so với phương pháp gốc được trình bày bởi [144]. Trong xét nghiệm này, hàm lượng protein tế bào tổng số được xác định dựa trên mật độ quang học (OD) đo được sau khi nhuộm protein bằng SRB. Vì giá trị OD tỷ lệ thuận với lượng SRB gắn kết với protein, OD cao hơn sẽ phản ánh số lượng tế bào và protein lớn hơn. Điều kiện thực hiện xét nghiệm như sau:

- Chiết xuất nấm (mẫu) được đưa vào giếng của khay 96 giếng để có nồng độ 0,032; 0,16; 0,8; 4; 20; 100 µg/mL.
- Các tế bào ung thư sau đó được tách rời bằng trypsin và đếm để điều chỉnh mật độ khoảng 10⁴ tế bào/ml. Các tế bào đã điều chỉnh mật độ sẽ được cấy vào các giếng đã chứa chiết xuất nấm. Trên cùng một đĩa thử, bố trí một số giếng để làm đối chứng ngày 0 (không có chiết xuất nấm, chỉ có tế bào ung thư). Sau 1h, các

giếng đối chứng 0 ngày sẽ được cố định tế bào bằng axit Trichloroacetic (TCA 20%) (Sigma, Deisenhofen, Đức) trong khi các đĩa còn lại tiếp tục được nuôi cấy trong tủ ấm CO₂ ở 37°C, 5% CO₂ trong 72 giờ.

- Sau 72 giờ, tế bào được cố định vào đáy giếng bằng TCA trong 1 giờ, sau đó rửa sạch và làm khô ở nhiệt độ phòng. Tất cả các giếng tiếp theo được nhuộm bằng SRB trong 30 phút ở 37°C. Sau đó, chúng được rửa 3 lần bằng axit axetic và sấy khô ở nhiệt độ phòng. Để hòa tan lượng SRB còn lại, 10 mM Tris base không đệm được thêm vào. Các đĩa được lắc nhẹ trong 10 phút trước khi đọc kết quả mật độ quang học (OD) ở bước sóng 540 nm trên Máy đọc đĩa ELISA (Biotek, Hoa Kỳ). Khả năng ức chế tế bào sống khi có mặt chiết xuất nấm sẽ được xác định bằng công thức sau:

$$\% \text{ tế bào sống sót} = \frac{[\text{OD (mẫu)} - \text{OD (ngày 0)}] \times 100}{\text{OD (đối chứng âm)} - \text{OD (ngày 0)}}$$

$$\% \text{ ức chế tế bào} = 100\% - \% \text{ tế bào sống sót}$$

DMSO 1% được sử dụng như đối chứng âm.

Ellipticine (Sigma, Deisenhofen, Đức) ở nồng độ 10 µg /ml; 2 µg /ml; 0,4 µg /ml; 0,08 µg /ml và podophyllotoxin ở nồng độ 0,032 µg /ml; 0,16 µg /ml; 0,8 µg /ml; 4; 20 µg /ml; 100 µg /ml được sử dụng như đối chứng dương.

Giá trị IC₅₀ (nồng độ ức chế 50% sự phát triển) được xác định bằng phần mềm máy tính Table Curve 2Dv4.

Để đảm bảo tính chính xác, các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Giá trị IC₅₀ của chiết xuất nấm, chiết xuất *D. difformis* và đối chứng dương (podophyllotoxin và ellipticine) được đánh giá theo tiêu chuẩn của Viện Ung thư Quốc gia Hoa Kỳ (NCI) [139].

2.2.7. Phương pháp xác định hoạt tính kháng khuẩn của chiết xuất nấm

Hoạt tính kháng khuẩn của chiết xuất nấm được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch [15] với một số bổ sung. Chiết xuất nấm hòa trong methanol để có nồng độ 1 mg/mL. Vi khuẩn Gram âm và Gram dương được nuôi lỏng trong môi trường LB ở 37 °C trong 24-48 giờ sao cho mật độ đạt khoảng 10⁷-10⁸ cfu/mL. Sử dụng 100 µL vi khuẩn trải đều bề mặt đĩa thạch. Giấy thấm vô trùng có đường kính 6 mm được nhúng vào 40 µL chiết xuất nấm, để khô và đặt lên đĩa thạch. Đĩa thạch được đặt trong 4 °C, 2 giờ, sau đó chuyển vào tủ 37 °C trong 48 giờ. Sử dụng 04 đối chứng, trong đó 01 giấy thấm vô trùng tẩm môi trường, 01 giấy thấm vô trùng tẩm dung môi methanol, 01 giấy thấm vô trùng tẩm kháng sinh Cefotaxime (1

mg/mL), 01 giấy thấm vô trùng tâm cao chiết rễ cây Bát Giác Liên. Đường kính kháng khuẩn được đo bằng mm, thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

2.2.8. Phương pháp nghiên cứu hệ gen của nấm nội sinh có khả năng sinh tổng hợp podophyllotoxin

Chiết xuất DNA bộ gen, chuẩn bị thư viện và giải trình tự bộ gen

DNA bộ gen nấm được chiết xuất bằng bộ kit DNA nấm E.Z.N.A.® Fungal DNA Mini (OMEGA, Hoa Kỳ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Số lượng và chất lượng sản phẩm DNA được đánh giá bằng bộ kit xét nghiệm Qubit™ dsDNA HS (Máy đo huỳnh quang QUBIT 3.0) và điện di gel agarose 0,8%. DNA bộ gen nấm được pha loãng đến nồng độ 4 ng μL^{-1} với đệm EB, sau đó được cắt thành các đoạn nhỏ khoảng 10 kb bằng g-TUBE™ (Covaris), và được kiểm tra bằng máy Bioanalyzer Agilent 2100 với Bộ kit Agilent DNA 12000 (5067-1508-Agilent).

Việc chuẩn bị thư viện được thực hiện bằng Bộ dụng cụ Chuẩn bị Mẫu SMRTbell Express 2.0 (100-938-900-PacBio), sau đó gắn polymerase và tinh sạch bằng bộ dụng cụ Liên kết Sequel và Kiểm soát Nội bộ 3.0 (101626-600-PacBio). Trước khi nạp vào Đĩa Mẫu (000-448-888-PacBio), nồng độ DNA bộ gen đã được xác định (9 pM) và thiết lập bằng phần mềm thiết lập mẫu trong cổng thông tin SMRTLink, phiên bản 9.0.

Cuối cùng, bộ gen HGN12.1R được giải trình tự bằng PacBio SEQUEL với chip Khay Sequel SMRT Cell 1M v3 (101-531-001—PacBio) và Bộ dụng cụ Giải trình tự Sequel 3.0 (101-597-900—PacBio).

Lắp ráp De novo, đánh giá chất lượng và chú thích gen chức năng

Lắp ráp De novo

Các trình tự thô (raw reads) từ bộ gen nấm đã được lắp ráp *de novo* bằng cách sử dụng quy trình Hierarchical Genome-Assembly Process (HGAP) phiên bản 4 (Chin et al., 2013). Các trình tự lắp lại trong bộ gen HGN12.1R đã được che (masked) bằng công cụ RepeatMasker trên nền tảng trực tuyến Galaxy (<https://usegalaxy.eu/>) để tạo điều kiện thuận lợi cho các phân tích tiếp theo (The Galaxy Community, 2022). Việc dự đoán các gen tRNA và rRNA được thực hiện bằng cách sử dụng tRNAscan-SE (phiên bản 2.0, <http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>, truy cập ngày 22 tháng 7 năm 2023) và công cụ barrnap trên máy chủ Galaxy Australia (<https://usegalaxy.org.au/>, truy cập ngày 6 tháng 9 năm 2023).

Xác định và đánh giá gen

Việc xác định gen *ab initio* cho trình tự bộ gen HGN12.1R đã được tiến hành bằng AUGUSTUS (phiên bản 3.4.0) trong OmicsBox phiên bản 3.0

(<https://www.biobam.com/omicsbox/>), với *Penicillium chrysogenum* đóng vai trò là loài tham chiếu có quan hệ gần gũi. Mức độ hoàn chỉnh của quá trình lắp ráp bộ gen HGN12.1R sau đó được đánh giá bằng chương trình BUSCO (phiên bản 5) được triển khai trên máy chủ web gVolante (<https://gvolante.riken.jp/analysis.html>, truy cập ngày 7 tháng 9 năm 2023) so với cơ sở dữ liệu nấm.

Chú thích chức năng gen

Các chú thích chức năng gen được thực hiện với OmicsBox (phiên bản 3.0) sử dụng Blast2GO so với các cơ sở dữ liệu nonredundant (Nr) của NCBI, Gene Ontology (GO) và Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), với ngưỡng giá trị E là $e-05$. InterProScan5 trong OmicsBox được sử dụng để xác định các trình tự có sự tương đồng đáng kể với các trình tự protein đã biết (giá trị E-value được đặt là $e-10$). Sau đó, phân loại thứ bậc của các thuật ngữ Gene Ontology (GO), bao gồm thành phần tế bào (CC), chức năng phân tử (MF) và quá trình sinh học (BP), đã được phân tích và trực quan hóa bằng công cụ OmicsBox.

Xác định các gen liên quan đến quá trình sinh tổng hợp PTOX ở *Penicillium herquei*

Để xác định các gen tương đồng ở nấm nội sinh, chúng tôi đã sử dụng 10 gen tham gia vào con đường sản xuất PTOX ở *Podophyllum hexandrum*. Trình tự protein của chúng được lấy từ cơ sở dữ liệu UniProtKB (<https://www.uniprot.org>) bằng cách sử dụng các mã số sau: DIR (Q1ZZU9), PLR (B0LL23), SDH (A3F5F0), 2-ODD (A0A0N9HQ36), OMT1 (A0A0N9HTA1), OMT3 (A0A0N9HMN6), CYP719A23 (L7T8H2), CYP71BE54 (A0A0N9HT29), CYP71CU1 (A0A0N9HTU1) và CYP82D61 (A0A0N7F297). Đối với gen VdtD, một trong những gen tham gia vào quá trình sinh tổng hợp viriditoxin ở nấm, protein của gen này đã được tải xuống từ <https://www.uniprot.org> với số hiệu truy cập A0A443HK52. Sau đó, các protein này được sử dụng để BLAST so sánh các trình tự protein *Penicillium herquei* đã được chú thích đầy đủ bằng công cụ BLASTP (sắp xếp hai hoặc nhiều trình tự) trên NCBI với ngưỡng giá trị E là $e-05$. Cuối cùng, các protein có giá trị E nhỏ hơn $e-10$ đã được chọn để phân tích sâu hơn bằng cơ sở dữ liệu UniProtKB (<https://www.uniprot.org>) và Pfam (<http://pfam-legacy.xfam.org/>).

2.2.9. Phương pháp xác định điều kiện lên men thích hợp cho nấm sinh tổng hợp podophyllotoxin và các dẫn xuất [140]

2.2.9.1. Phương pháp hoạt hóa giống

Giống được bảo quản ở 4 °C cần được hoạt hóa lại trước khi sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo. Cấy một miếng nấm kích thước khoảng 1x1 cm trên đĩa thạch PDA và ủ ở tủ ẩm 25-28 °C. Sau 5-7 ngày, khi sợi nấm lan đều, mọc tốt thì được cấy chuyển từ môi trường thạch sang môi trường lỏng cho các mục đích tiếp theo. Với giống được cất giữ ở -20 °C hay nitơ lỏng cũng được hoạt hóa theo phương pháp tương tự.

2.2.9.2. Phương pháp xác định khối lượng sinh khối tế bào

Sinh khối tươi: Tiến hành thu nhận sinh khối tế bào nấm sau thời gian nuôi cấy 3-5 ngày tùy mục đích thí nghiệm bằng cách ly tâm ở tốc độ 6.000 vòng/phút trong 10 phút. Sau đó, dịch nổi được loại bỏ và thu sinh khối nấm lắng ở đáy ống ly tâm.

Sinh khối khô: Sấy khô sinh khối nấm tươi đến khối lượng không đổi ở 50°C và cân xác định khối lượng khô của sinh khối nấm.

2.2.9.3. Phương pháp khảo sát môi trường lên men

Nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường lên men chúng tôi tiến hành trên 05 môi trường có thành phần dinh dưỡng khác nhau: PDA, YMA, PGA, Sabouraud broth, Zhao, Czapek-Dox được tham khảo từ nhiều tác giả khác nhau, từ đó đánh giá sinh trưởng của nấm và sự sản sinh PTOX và các dẫn xuất.

- Môi trường lên men PDA (g/l): Khoai tây 200 g, dextrose 20 g, nước cất 1 lít; pH= 6.
- Môi trường lên men YMA (Yeast Malt Agar) (g/l): Peptone 5g; Yeast extract 3g; Malt extract 3g; Dextrose 10g; Agar 20g; nước cất 1 lít; pH= 6 – 6,5.
- Môi trường lên men PGA (g/l): Khoai tây 200 g, glucose 20 g, nước cất 1 lít; pH= 6.
- Môi trường Sabouraud broth (g/l): Dextrose 40 g/l; peptone 10g/l, pH= 6,5.
- Czapek-Dox (g/l): Saccharose 30g; NaNO₃ 3g; K₂HPO₄ 1g; KCl 0.05g; MgSO₄.7H₂O; FeSO₄.7H₂O 0.1g; Nước cất 1 lít; pH= 6.
- Môi trường lên men của Zhao (Zhao et al., 2013) (g/l): Potato (soup extract) 200 g/l; peptone 5 g/l; glucose or sucrose 10 g/l; K₂HPO₄ 1 g/l; KCl 0.5 g/l; MgSO₄.7H₂O 1 g/l; pH= 6.

2.2.9.4. Phương pháp khảo sát ảnh hưởng của thời gian nhân giống và tỷ lệ giống

Thời gian và tỷ lệ tiếp giống là hai yếu tố thiết yếu ảnh hưởng đến hiệu suất của quá trình lên men, bởi lẽ chúng tác động trực tiếp đến sự phát triển của vi sinh vật, từ đó quyết định hiệu quả lên men. Để tối ưu hóa quá trình này, cần xác định chính xác thời gian và tỷ lệ tiếp giống phù hợp. Trong nghiên cứu hiện tại, sau khi

nhân giống trong môi trường lỏng PDA ở 25 °C, 48h chúng tôi đã khảo sát các tỷ lệ tiếp giống 1%, 3%, 5%, 7%, 9% sau và các mốc thời gian nhân giống tại 24, 36, 48, 60, và 72 giờ.

2.2.9.5. Phương pháp khảo sát ảnh hưởng của pH và nhiệt độ

Trên cơ sở lựa chọn được môi trường thích hợp, tỷ lệ giống phù hợp, các bình nhân sinh khối được nuôi lắc 150 vòng/phút trong thời gian 3-5 ngày. Đánh giá tốc độ sinh trưởng ở dải nhiệt độ 22-32 °C, pH từ 5-8

2.2.9.6. Phương pháp khảo sát ảnh hưởng của độ thông khí (tốc độ lắc và thể tích môi trường/ thể tích bình)

Thể tích dịch lên men trong thiết bị nuôi cấy cũng rất quan trọng để cung cấp hàm lượng oxi hòa tan, tốc độ lắc giúp cho VSV tiếp xúc được các chất dinh dưỡng đầy đủ hơn và tổng hợp được nhiều hợp chất thứ cấp có giá trị kinh tế cao. Thông thường các nghiên cứu với nấm đa số tối ưu tốc độ lắc trong khoảng 100, 120, 150, 180, 200 và 220 vòng/phút, thể tích môi trường nuôi/ thể tích bình là 5; 10; 15; 20; 25 và 30 % (v/v).

2.2.9.7. Phương pháp khảo sát ảnh hưởng nguồn cacbon, nitơ, muối khoáng

Để nghiên cứu ảnh hưởng nguồn cacbon, nitơ, muối khoáng đối với chủng nấm nghiên cứu, sau khi lựa chọn được môi trường lên men phù hợp từ nghiên cứu trước sẽ được bổ sung thay đổi các nguồn dinh dưỡng cacbon gồm tinh bột tan, dextrose, sucrose, D-maltose, mannitol, inositol [141]. Các nguồn dinh dưỡng nitơ khảo sát gồm cao nấm men, peptone, cao thịt, cao thịt bò, NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ [142] và có bổ sung một trong 03 loại muối khoáng $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 và KCl [141] được dùng để khảo sát theo phương pháp một biến một lúc [143].

2.2.9.8. Phương pháp khảo sát ảnh hưởng của tiền chất đến sinh tổng hợp Chất/tiền chất podophyllotoxin

Mục đích để tìm ra tiền chất có thể làm tăng khả năng sinh tổng hợp Chất/tiền chất PTOX, các chất được sử dụng trong nghiên cứu gồm phenylalanine [144] và chiết xuất rễ cây Bát Giác Liên [145].

2.2.9.9. Nghiên cứu động thái quá trình lên men sinh tổng hợp Chất/tiền chất podophyllotoxin và các dẫn xuất

Từ các kết quả nghiên cứu về điều kiện, thành phần môi trường lên men chúng tôi tiến hành nghiên cứu động thái lên men sinh tổng hợp Chất/tiền chất PTOX trên thiết bị lên men 5-10 lít/mẻ để xác định thời điểm thu hồi sản phẩm. Đây là giai đoạn quan trọng cần xác định được đúng thời điểm kết thúc lên men trước khi vi nấm bị

phân hủy làm giảm hàm lượng Chất/tiền chất PTOX tạo thành. Thí nghiệm được tiến hành trong 192h và cứ sau mỗi 12 giờ lên men, tiến hành lấy mẫu xác định pH, sinh khối nấm và sự hình thành Chất/tiền chất PTOX thông qua phương pháp TLC, HPLC.

2.2.10. Phương pháp phân lập chất podyphyllotoxin bằng sắc ký cột (Column chromatography - CC)

Dịch chiết metanol khô từ các chủng nấm được phân bố đều trong nước (500 mL) và được chiết xuất liên tiếp lần lượt với n-hexan, methylene clorua và etyl axetat (3 x 500 mL cho mỗi dung môi) để thu được dịch chiết tương ứng và lớp nước còn lại. Phần methylene clorua được đưa vào cột silica-gel pha đảo (ODS-A, YMC), rửa giải với gradient MeOH-H₂O (1/2, v/v) lên đến 100% MeOH để thu được các phân đoạn. Các phân đoạn cho thấy có băng tương tự trên tấm TLC được kết hợp sau đó được tinh chế thêm bằng HPLC (Agilent 1260 Infinity II). Rửa giải bằng các hỗn hợp acetonitril-H₂O 66/34, acetonitril-H₂O 65/35v/v) và Prep-HPLC (đồng phân acetonitril-H₂O 57/43, v/v) để thu được các hợp chất tiếp theo [146].

2.2.11. Phương pháp xác định cấu trúc hóa học

Cấu trúc hóa học của các hợp chất được xác định bằng cách kết hợp các phương pháp phổ hiện đại, bao gồm phổ khối (ESI-, HR-ESI-MS) và phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) một chiều (¹H-, ¹³C-NMR, DEPT) và hai chiều (HSQC, HMBC, ¹H-¹H-COSY). Cụ thể như sau:

Sau khi tinh chế bằng các phương pháp sắc ký, các hợp chất thu được sẽ được đo phổ proton NMR (H1-NMR) để xác định độ tinh sạch. Tiếp theo, cấu trúc hóa học của chúng sẽ được xác định thông qua phổ C13-NMR và các phổ NMR hai chiều như HSQC, HMBC và COSY. Công thức phân tử của hợp chất sau đó sẽ được khẳng định bằng phổ khối (MS). Cuối cùng, dựa trên cấu trúc đã xác định, tên và tính mới của các hợp chất sẽ được kiểm tra bằng cách đối chiếu với các cơ sở dữ liệu hóa học chuyên ngành, ví dụ như SciFinder của Chemical Abstracts Service (CAS) [146].

2.2.12. Phương pháp đánh giá tác dụng chống oxy hóa

Hoạt tính chống oxy hóa của cao chiết đã được xác định bằng cách đo khả năng trung hòa gốc tự do DPPH theo phương pháp của [147] có chỉnh sửa.

Mẫu thử được pha stock trong DMSO ở nồng độ 2 mg/ml. Sau đó, pha loãng bằng nước cất khử ion để tạo dải nồng độ thử gồm: 100; 20; 4; 0,8 µg/ml. DPPH pha trong methanol (100%) nồng độ 0,25 µM. Hút 1ml mẫu nghiên cứu ở từng nồng độ vào các ống thủy tinh. Mỗi nồng độ được lặp lại 3 lần. Thêm 1ml dung dịch DPPH

đã chuẩn vào mỗi ống có mẫu nghiên cứu.

Ống đối chứng âm: Chứa 1ml DMSO 2 mg/ml và 1ml dung dịch DPPH.

Ống đối chứng dương: Chỉ chứa 1ml nước và 1ml DPPH. Không có mẫu thử

Sau khi ủ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút, độ hấp thụ quang được đo ở bước sóng 517 nm trên máy đọc ELISA.

Khả năng trung hòa gốc tự do được tính theo công thức:

$$\text{DPPH (\%)} = \frac{\text{OD}_{\text{đối chứng dương}} - (\text{OD}_{\text{mẫu thử}} - \text{OD}_{\text{đối chứng âm}})}{\text{OD}_{\text{đối chứng dương}}} \times 100$$

Trong đó: $\text{OD}_{\text{đối chứng dương}}$: Độ hấp thụ tại giếng không chứa chất thử

$\text{OD}_{\text{đối chứng âm}}$: Độ hấp thụ tại giếng chứa dung môi DMSO

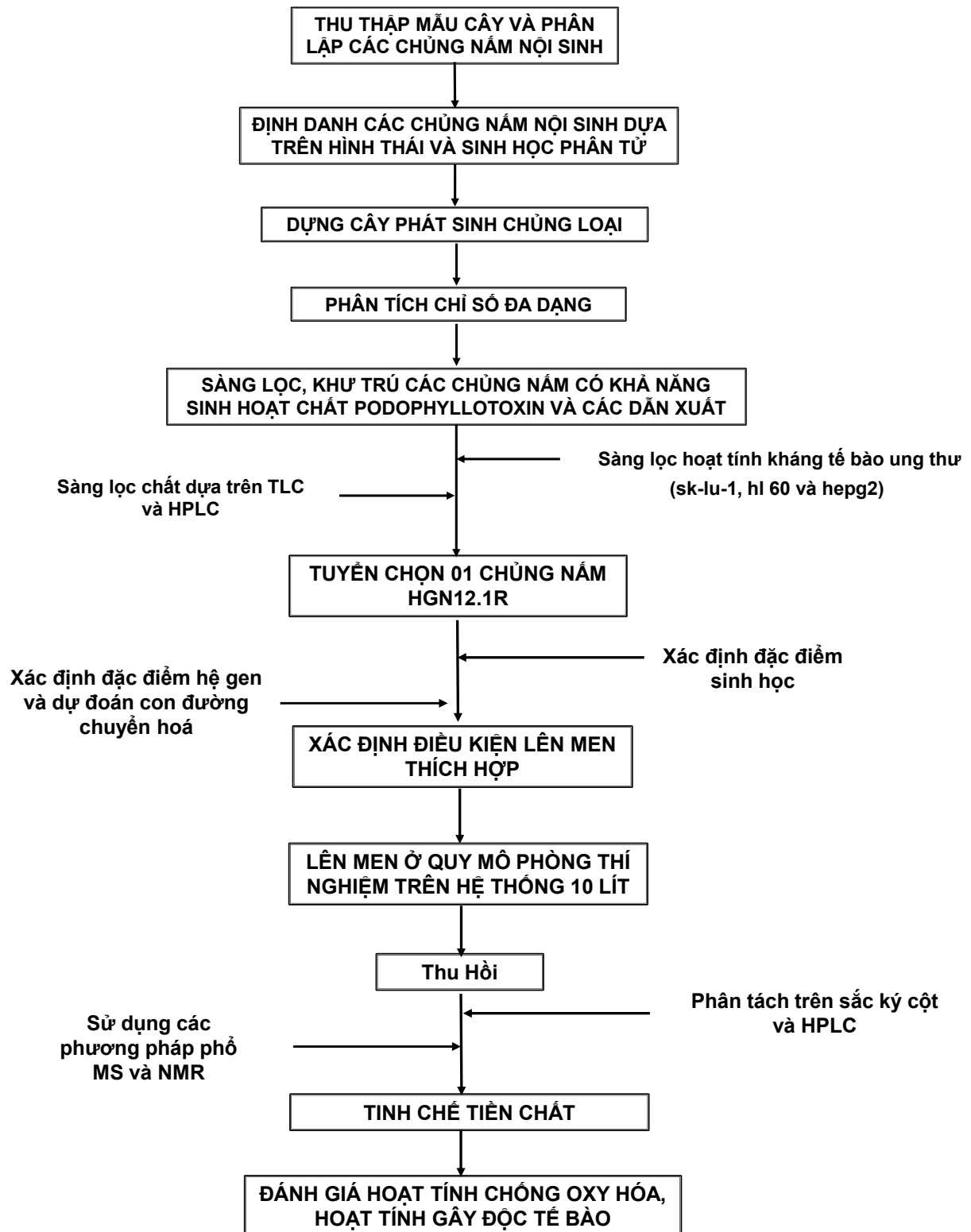
$\text{OD}_{\text{mẫu thử}}$: Độ hấp thụ tại giếng chứa chất thử

Giá trị EC_{50} (Effective Concentration at 50% - nồng độ dịch chiết cho khả năng trung hòa 50% gốc tự do DPPH) sẽ được xác định theo phần mềm TableCurve. Mẫu nào có giá trị EC_{50} càng thấp thì hoạt tính chống oxy hóa càng cao.

2.2.13. Phương pháp xử lý số liệu

Để đảm bảo tính tin cậy, các số liệu phân tích trong nghiên cứu này được thu thập ít nhất ba lần. Sau đó, phương pháp phân tích phương sai hai chiều (two-way ANOVA) và so sánh nhiều nhóm (Tukey's multiple comparisons test) đã được sử dụng để xử lý thống kê các dữ liệu này tại mức ý nghĩa $P < 0,05$.

2.2.14. Sơ đồ nghiên cứu tổng quát trong luận án



Hình 2.1. Sơ đồ nghiên cứu tổng quát trong luận án

Chương 3. KẾT QUẢ

3.1. Phân lập, định danh và sàng lọc chủng nấm nội sinh sản sinh hoạt chất podophyllotoxin

3.1.1. Thu thập mẫu cây Bát Giác Liên

Mẫu cây khỏe mạnh được thu thập tại 2 địa điểm: (1) thôn Phìn Sảng, xã Minh Tân, Huyện Vị Xuyên, tỉnh Hà Giang, (2) bản Ngải Thầu, xã Khun Há, huyện Tam Đường, tỉnh Lai Châu.



Hà Giang



Lai Châu

Hình 3.1. Thân và rễ cây Bát Giác Liên, mẫu thu tại Hà Giang và Lai Châu

Các mẫu thu được mọc dưới tán rừng nguyên sinh, bị tác động mạnh vì trồng thảo quả. Tầng cây gỗ bao gồm các loài: Dẻ gai trung quốc, Dẻ móc, Sồi đĩa, Rơ đê quả to, Mỡ, Kháo nhậm, Lá dương đỏ. Tầng cây bụi: Không có, do bị phát hăng năm. Thảm tươi: Thảo quả, Cao hùng, Mua nguồn, nhục tháp, Quyền bá. Tầng đất dày >1,2m.

Bảng 3.1. Thông tin số lượng mẫu cây thu nhận được

STT	Tên khoa học	Địa điểm thu mẫu	GPS	Số cây thu được
1	<i>Dysosma difformis</i>	Thôn Phìn Sảng, xã Minh Tân, huyện Vị Xuyên, tỉnh Hà Giang.	23°0'40.14"N 104°53' 6.92"E, Độ cao 1 074m.	30
2	<i>Dysosma difformis</i>	Bản Ngải Thầu, Xã Khun Há, huyện Tam Đường, Lai Châu	22°13'2.55"N 103°35' 0.58"E, Độ cao: 1890m	11

Kết quả so sánh trình tự vùng gen *rbcL* của mẫu nghiên cứu với 5 trình tự gen *rbcL* của các loài trong chi *Dysosma* đã công bố trên Genbank cho thấy độ tương đồng rất cao dao động từ 98,25% đến 99,77% (Bảng 3.2). Mức độ sai khác chỉ từ 0,23% đến 1,75%. Cụ thể, trình tự vùng gen *rbcL* của mẫu nghiên cứu có độ tương đồng 99,77% so với trình tự mã số NC_037906.1 (*Dysosma difformis*). Kết quả này đã khẳng định đối tượng nghiên cứu chính là loài *Dysosma difformis*.

Bảng 3.2. Mức độ tương đồng của vùng *rbcL* của mẫu nghiên cứu với một số trình tự trên Genbank

Mã số tra cứu trên Genbank	Loài	Giá trị E	Độ tương đồng
NC_037906.1	<i>Dysosma difformis</i>	0	99,77
MG593056.1	<i>Dysosma difformis</i>	0	99,51
MW927475.1	<i>Dysosma difformis</i>	0	99,39
MN604379.1	<i>Dysosma versipellis</i>	0	98,28
NC_037898.1	<i>Dysosma versipellis</i>	0	98,25

3.1.2. Phân lập, định danh, xây dựng cây phát sinh chủng loại và phân tích chỉ số đa dạng của các chủng nấm nội sinh

3.1.2.1. Phân lập nấm nội sinh

Từ hai mẫu vật liệu *Dysosma difformis* được thu từ Hà Giang và Lai Châu, nhóm nghiên cứu đã phân lập được 53 chủng vi nấm nội sinh trên môi trường PDA, ở 25°C



Hình 3.2. Khử trùng bề mặt mẫu trước khi phân lập



Hình 3.3. Phân lập vi nấm nội sinh

Trong đó 28 chủng được phân lập từ mẫu cây Bát Giác Liên thu được tại Hà Giang, 25 chủng từ mẫu Lai Châu. Ở Hà Giang, phần lớn nấm nội sinh được phân lập từ rễ (hoặc củ) với 82% (23 chủng), tiếp theo là lá với gần 11% (3 chủng) và thân 7% (2 chủng). Ngược lại, từ các mẫu ở Lai Châu, chỉ có bốn chủng được tìm thấy ở rễ (hoặc củ) (14%) trong khi số liệu ở lá và thân lần lượt là mười một và mười (44% và 40%). Tổng cộng, tỷ lệ phân lập cao nhất là từ rễ, chiếm 50,94%, trong khi lá và thân với 26,42% và 22,64% (Bảng 3.3). Với vi nấm nội sinh được phân lập từ củ ký hiệu (C), vi nấm nội sinh được phân lập từ rễ ký hiệu (R). Để thuận tiện cho việc nhận biết và quản lý, nhóm quy ước chuyển ký hiệu (C) thành ký hiệu (R) và ký hiệu (R) thành ký hiệu (.1R), ví dụ: HGN3C → HGN3R; HGN3R → HGN3.1R (chi tiết giải trình tại phụ lục A).

Bảng 3.3. Kết quả phân lập vi nấm nội sinh trên cây BGL theo khu vực lấy mẫu

Khu vực thu mẫu	Loài cây BGL	Kí hiệu vi nấm nội sinh	Số lượng vi nấm	Tỉ lệ (%)		
				Lá	Thân	Rễ (Củ)
Hà Giang	<i>Dysosma difformis</i>	HGN	28	11%	7%	82%
Lai Châu	<i>Dysosma difformis</i>	LCN	25	44%	40%	14%

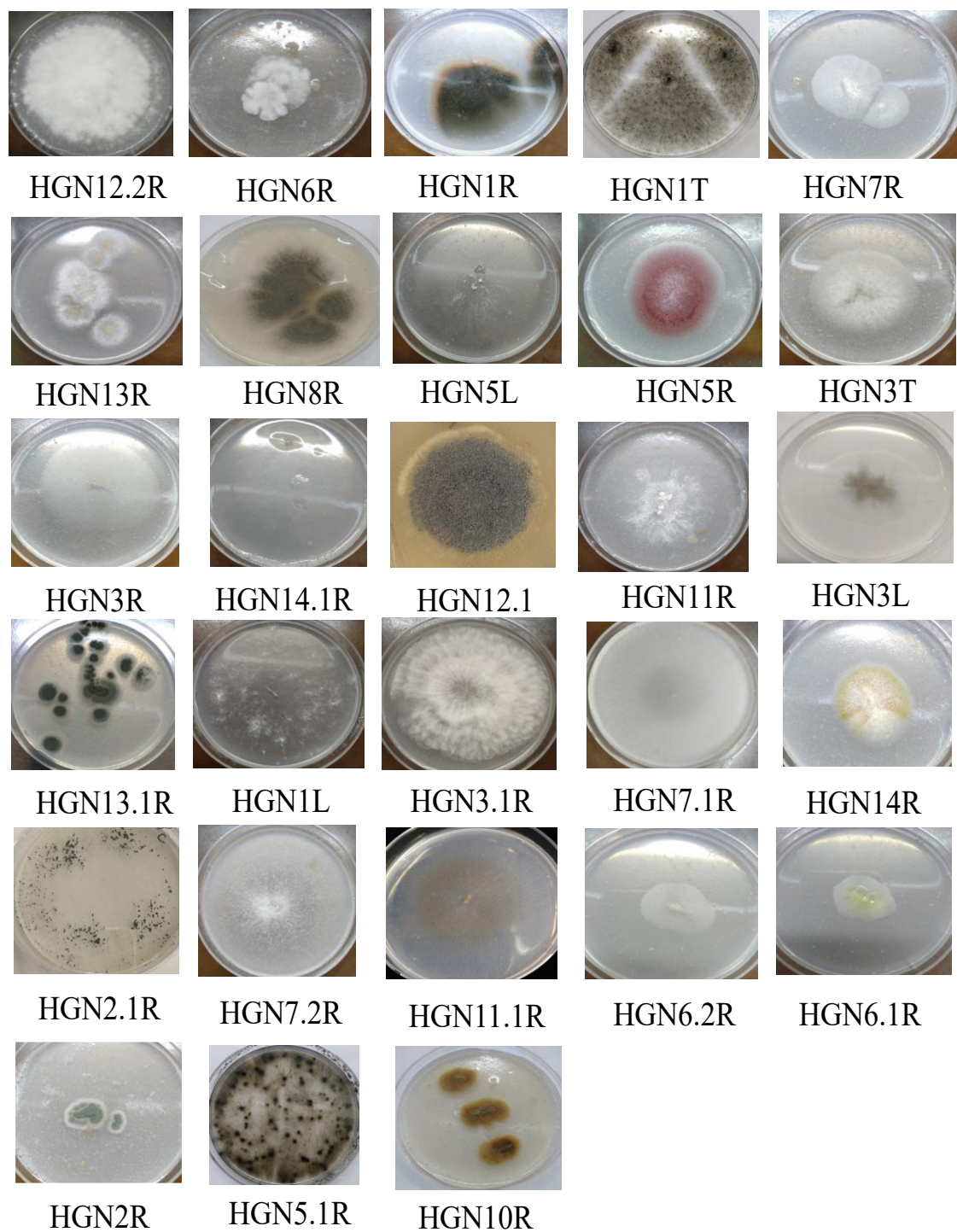
Cả năm mươi ba chủng phân lập đều được xác định bằng quan sát hình thái được nêu chi tiết ở (Bảng 3.4, Hình 3.4, Hình 3.5). Sau khi quan sát các đặc điểm hình thái, các chủng nấm đã được định danh loài bằng phương pháp giải trình tự gen ITS.

Bảng 3.4. Mô tả hình thái của nấm nội sinh phân lập từ các mô khác nhau của cây BGL (*Dysosmis difformis*) tại Hà Giang và Lai Châu

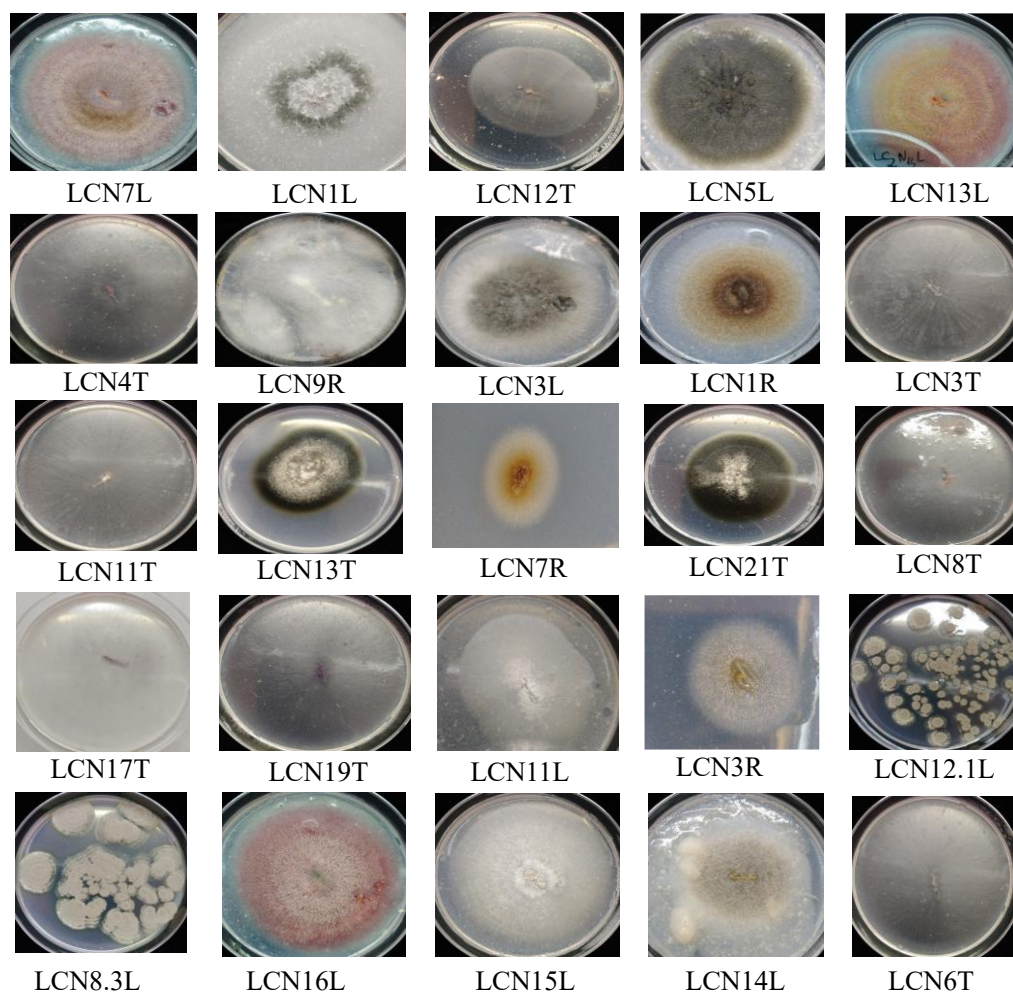
STT	Tên chủng	Vị trí mô phân lập	Đặc điểm hình thái		
			Khuẩn lạc	Sợi dinh dưỡng	Sợi cơ chất
1	HGN6.1R	Rễ	Không cân đối, mép liền	Trắng vàng	Vàng nhạt
2	HGN6.2R	Rễ	Cân đối, mép liền	Trắng sữa, sợi lỉ như nhung	Trắng
3	HGN13R	Rễ	Cân đối, long bông	Trắng, tâm vàng	Vàng nhạt
4	LCN9R	Rễ	Trắng tinh, sợi dài mảnh	Trắng sữa	Trắng sữa
5	LCN21T	Thân	Cân đối, mép liền	Xanh đậm	Xanh lá cây
6	HGN1R	Rễ	Sợi ngắn không cân đối	Xanh rêu đậm, viền cam	Xanh lá cây, cam
7	LCN7L	Lá	Cân đối, sợi dài với các vòng tròn đồng tâm	Đỏ, trắng, vàng	Vàng hồng
8	HGN8R	Rễ	Không cân đối, mép răng cưa với các vòng đồng tâm	Xanh lá cây	Vàng nhạt
9	LCN1R	Rễ	Cân đối, sợi dài mảnh với các vòng tròn đồng tâm	Vàng nâu	Vàng
10	HGN11.1R	Rễ	Cân đối, sợi nấm lan toả	Vàng nhạt	Vàng nhạt
11	LCN3L	Lá	Cân đối, sợi nấm dài	Tâm xanh lá, viền trắng	Trắng xanh lá cây
12	LCN19T	Thân	Tròn, sợi nấm mỏng dài, tâm màu tím nhạt	Xám, tím nhạt	Xám, tím nhạt
13	LCN8.3L	Lá	Tròn đều cân đối	Bột mịn như phấn màu xám	Xám
14	HGN7.1R	Rễ	Cân đối, sợi lỉ mặt thạch, xếp nếp kín đĩa	Trắng sữa	Trắng sữa
15	HGN7R	Rễ	Cân đối, mép liền	Trắng xốp	Trắng
16	HGN5L	Lá	Cân đối, bụi phấn bắn ra như tia nắng	Trắng sữa	Trắng sữa

STT	Tên chủng	Vị trí mô phân lập	Đặc điểm hình thái		
			Khuẩn lạc	Sợi dinh dưỡng	Sợi cơ chất
17	LCN1L	Lá	Không đều, không có viền, tâm dạng bột, viền xanh	Trắng xanh	Trắng xanh
18	LCN3T	Thân	Tròn, sợi nấm ngắn từ tâm tỏa ra như mặt trời.	Trắng sữa	Trắng sữa
19	LCN1T	Thân	Không cân đối	Xám nhạt	Xám
20	LCN8T	Thân	Cân đối, sợi nấm ngắn mịn	Trắng sữa	Trắng sữa
21	HGN2.1R	Rễ	Không đều, không có viền	Xanh lá cây, dạng bột	Xanh lá cây
22	HGN3R	Rễ	Cân đối, mép liền	Trắng trong suốt	Trắng sữa
23	HGN7.2R	Rễ	Cân đối, sợi nấm dài.	Trắng	Trắng
24	LCN16L	Lá	Cân đối, sợi nấm dài, có các vòng đồng tâm	Trắng đỏ	Hồng đậm
25	HGN14R	Rễ	Cân đối, mép liền	Trắng vàng	Vàng nhạt
26	HGN5R	Rễ	Cân đối, mép liền	Trắng đỏ, sợi dài bông	Hồng
27	LCN7R	Rễ	Cân đối, mép liền	Trắng vàng	Vàng nhạt
28	HGN6R	Rễ	Không cân đối, viền xẻ	Trắng	Trắng
29	HGN13.1R	Rễ	Cân đối, sợi nấm ngắn mịn	Xanh lá cây	Xanh lá cây
30	HGN12.1R	Rễ	Không cân đối, không viền	Xanh lá cây, mép trắng	Vàng be
31	LCN15L	Lá	Tròn, sợi nấm có độ xốp ngắn	Trắng, vàng	Vàng nhạt
32	LCN12.1L	Lá	Viền liền, bột mịn	Ghi	Ghi
33	HGN1T	Thân	Không cân đối, không viền	Nâu đen, sợi dài	Nâu đen
34	LCN12T	Thân	Viền liền, các vành tròn đồng tâm	Trắng đục	Trắng đục
35	HGN14.1R	Rễ	Cân đối, sợi nấm sát mặt thạch	Ghi	Ghi
36	HGN3L	Lá	Cân đối, tâm màu ghi	Ghi	Ghi
37	HGN1L	Lá	Cân đối	Trắng đục	Trắng đục

STT	Tên chủng	Vị trí mô phân lập	Đặc điểm hình thái		
			Khuẩn lạc	Sợi dinh dưỡng	Sợi cơ chất
38	LCN5L	Lá	Cân đối, bóng lì, bề mặt xuất hiện giọt tiết. Viền trắng trong	Xanh đen	Xanh đen
39	HGN3T	Thân	Cân đối, mép liền	Trắng bông	Trắng
40	LCN14L	Lá	Cân đối, sợi ngắn dày xốp, lấm tẩm trắng xanh xen kẽ	Xanh lá, trắng	Xanh lá
41	LCN6T	Thân	Cân đối, sợi dài mảnh	Ghi nhạt	Ghi nhạt
42	LCN13T	Thân	Cân đối, mép liền	Xanh đen, trắng xốp	Xanh trắng
43	LCN17T	Thân	Cân đối, sợi dài mảnh	Trắng tím nhạt	Trắng tím nhạt
44	LCN4T	Thân	Cân đối, sợi mảnh sát mặt thạch, lớp lớp trong veo. Tâm tím nhạt. Bề mặt lấm tẩm hạt trắng	Trắng, tâm tím nhạt	Tím trắng
45	HGN11R	Rễ	Không cân đối, không viền	Trắng	Trắng
46	HGN12.2R	Rễ	Cân đối, bông xốp	Trắng	Trắng
47	HGN3.1R	Rễ	Cân đối, sợi nấm xếp nếp	Trắng	Trắng
48	LCN11L	Lá	Không cân đối, không viền	Trắng đục, sợi lì	Trắng
49	LCN13L	Lá	Cân đối, sợi ngắn toả đều, có các vành đồng tâm	Đỏ, vàng nhạt	Hồng vàng
50	HGN2R	Rễ	Không cân đối, mép liền	Xanh trắng	Xanh lá nhạt
51	HGN5.1R	Rễ	Hệ sợi dài	Đen	Đen
52	LCN3R	Rễ	Cân đối, sợi mảnh dài lan toả mép khuẩn lạc. Bề mặt lấm tẩm các hạt trắng như bụi phấn	Trắng đục	Trắng đục
53	HGN10R	Rễ	Không cân đối, không viền	Đen vàng	Đen



Hình 3.4. Hình thái khuẩn lạc của 28 chủng được phân lập từ cây BGL (*Dysosma difformis*) thu thập tại Hà Giang



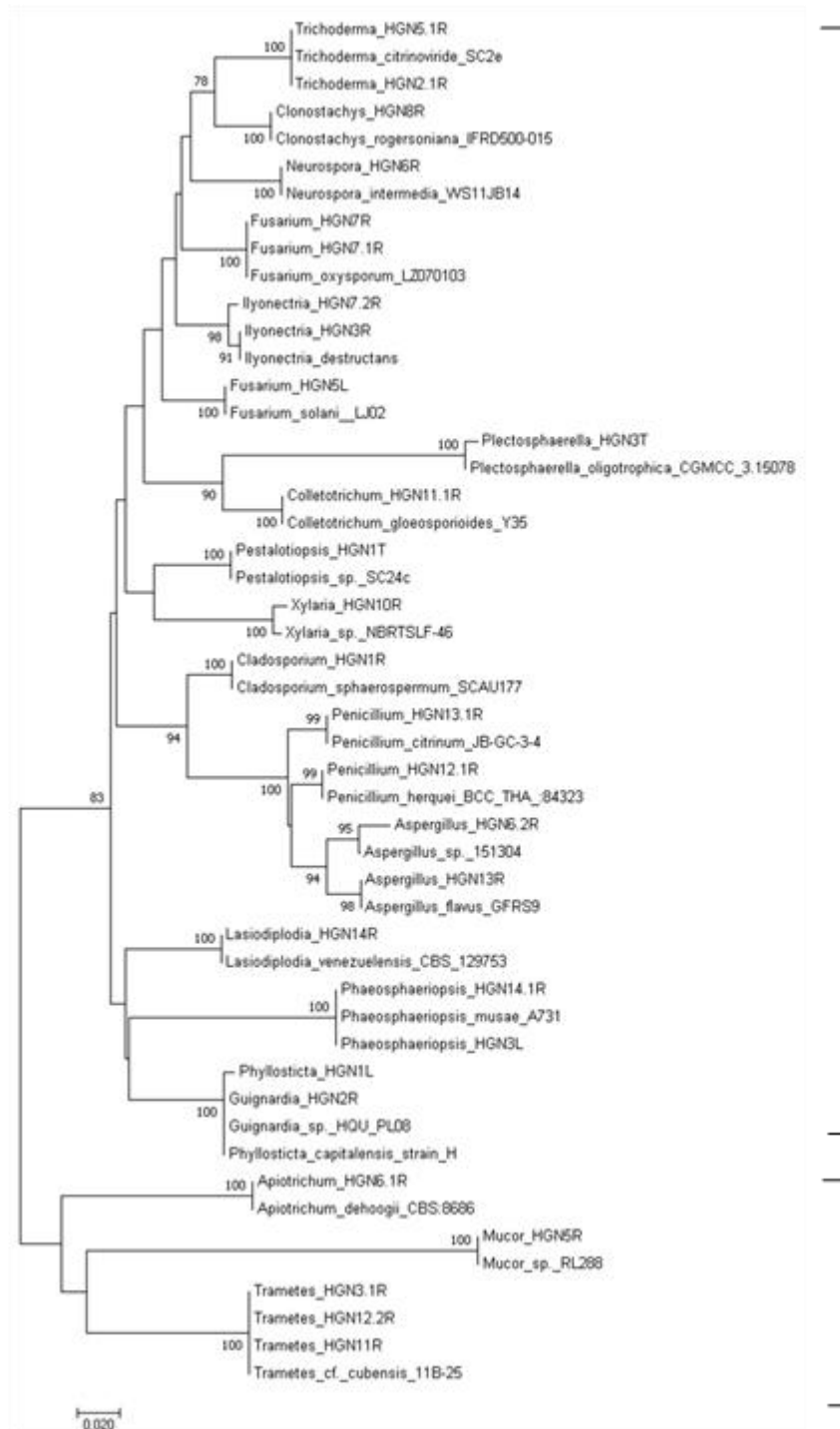
Hình 3.5. Hình thái khuẩn lạc của 25 chủng được phân lập từ cây BGL (*Dyosma difformis*) thu thập tại Lai Châu

3.1.2.2. Kết quả giải trình tự các chủng vi nấm dựa trên vùng ITS

53 chủng nấm đã được xác định thuộc 27 chi khác nhau, dựa trên kết quả phân tích trình tự các mẫu nấm (Bảng 1C, phụ lục C), trong đó hầu hết các mẫu phân lập thuộc ngành nấm *Ascomycota*, cùng với ba ngành nấm *Basidiomycota*, một ngành nấm *Mucormycota* và một ngành nấm chưa xác định. Tần suất xâm chiếm của mỗi loại nấm phân lập đã được tính toán, cho thấy *Fusarium* là chi phổ biến nhất (11,11%), tiếp theo là *Trametes* (9,26%) và *Penicillium* (7,41%). Trình tự gen của các chủng vi nấm đã được so sánh với các trình tự tương ứng trên Ngân hàng Gen (Genbank) thông qua công cụ BLAST của NCBI được thể hiện ở (Phụ lục D).

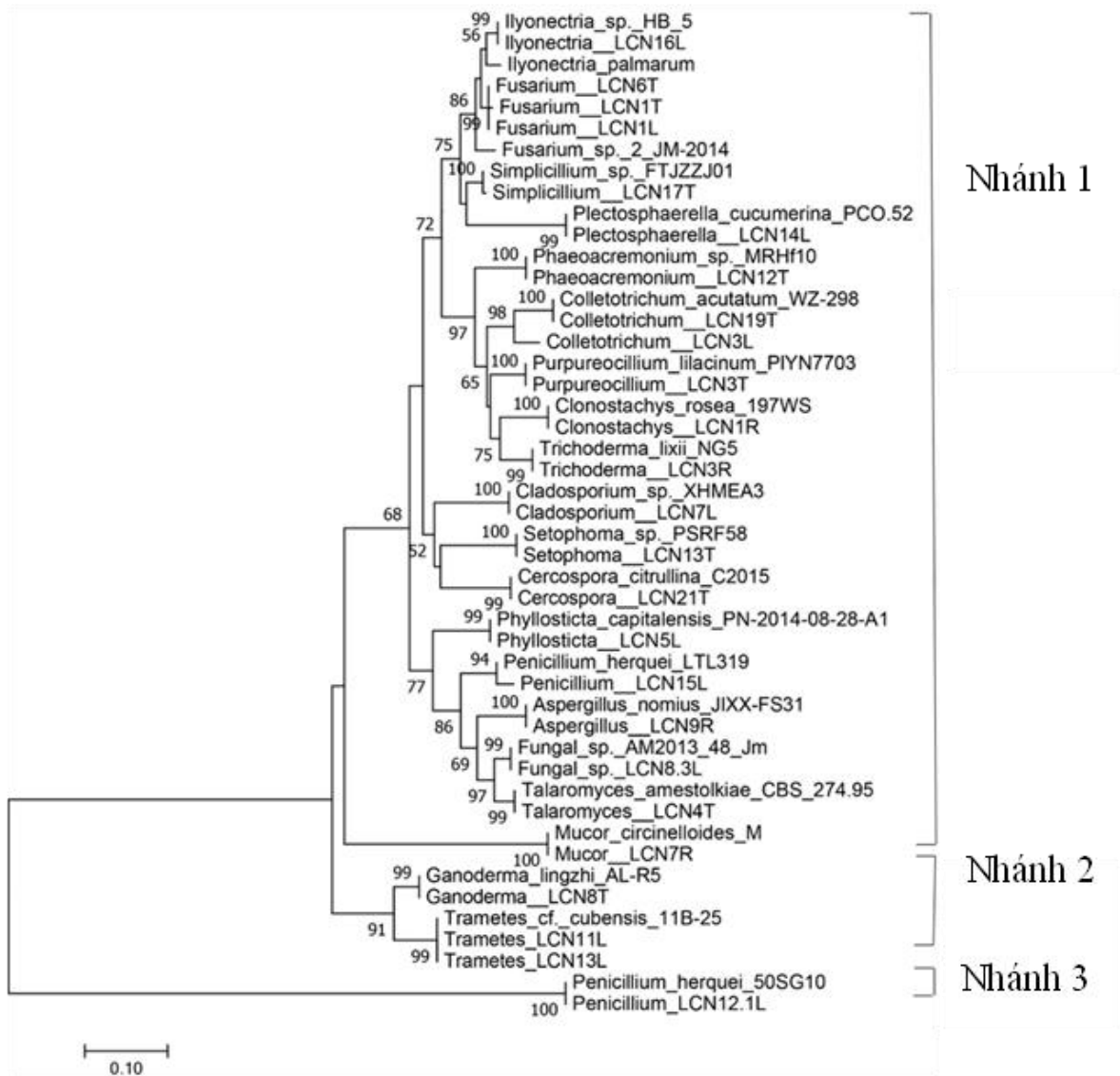
3.1.2.3. Xây dựng cây phát sinh loài vi sinh vật

Cây phát sinh loài đã được xây dựng từ dữ liệu phân tích BLAST thông qua phương pháp maximum Composite Liability.



Hình 3.6. Cây phát sinh loài của các nấm nội sinh phân lập từ mẫu cây *Dysosma difformis*_ Hà Giang.

Lịch sử tiến hóa được suy ra bằng phương pháp Neighbor-Joining. Giá trị tin cậy cho từng nhánh riêng lẻ được xác định bằng phép kiểm tra bootstrap với 1000 lần lặp lại. Giá trị bootstrap nhỏ hơn 50 không được hiển thị trên cây phát sinh loài. Khoảng cách tiến hóa được tính toán bằng phương pháp Maximum Composite Likelihood. Phân tích phát sinh loài được thực hiện trong MEGA 7.



Hình 3.7. Cây phát sinh loài của các nấm nội sinh phân lập từ mẫu cây

*Dysosma difformis*_ Lai Châu.

Cây phát sinh loài được suy ra bằng phương pháp Neighbor-Joining. Giá trị tin cậy cho từng nhánh riêng lẻ được xác định bằng phép kiểm tra bootstrap với 1000 lần lặp lại. Giá trị bootstrap nhỏ hơn 50 không được hiển thị trên cây phát sinh loài. Khoảng cách tiến hóa được tính toán bằng phương pháp Maximum Composite Likelihood. Phân tích phát sinh loài được thực hiện trong MEGA 7.

Phân tích phát sinh chủng loại sử dụng phần mềm MEGA 7 được thực hiện nhằm xác nhận danh tính và đánh giá tính đa dạng của các chủng nấm nội sinh được phân lập. Cây phát sinh loài được xây dựng từ dữ liệu trình tự DNA (Hình 3.6 và 3.7) đã phân loại thành công các chủng nấm vào các ngành và chi khác nhau. Kết quả cho thấy các chủng nấm nội sinh thu được có mức độ đa dạng rất cao, phân bố trên cả ba ngành nấm lớn là *Ascomycota*, *Basidiomycota*, và *Mucoromycota*. Các chủng nấm từ Hà Giang (Hình 3.6) được phân chia thành hai nhánh chính (nhánh 1 và nhánh 2).

Nhánh 1 bao gồm phần lớn các chi thuộc ngành *Ascomycota* (như *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Colletotrichum*, *Aspergillus*), trong khi Nhánh 2 chủ yếu bao gồm các chi thuộc ngành *Basidiomycota* (*Trametes*) và *Mucoromycota* (*Mucor*). Các chủng nấm từ Lai Châu (Hình 3.7) cho thấy cấu trúc phân bố tương tự. Nhánh 1 chủ yếu là các chi *Ascomycota*, nhánh 2 là các chi *Mucoromycota* và *Basidiomycota*. Đặc biệt, chủng *Penicillium herquei* 50SG10 (LCN12.1L) thuộc ngành *Ascomycota* lại nằm trong một cụm riêng biệt (Nhánh 3). Giá trị bootstrap nhỏ hơn 50 không được hiển thị trên cây phát sinh chủng loại cho thấy tính chính xác cao của việc gán tên chi/loài cho các chủng nấm phân lập, phục vụ mục đích phân loại để tiến hành các nghiên cứu chức năng tiếp theo.

3.1.2.4. Phân tích chỉ số đa dạng VSV

Khi phân tích các chỉ số đa dạng, bức tranh nấm nội sinh phân bố thông qua các chỉ số đa dạng khác nhau đã được làm rõ. Cụ thể, chỉ số Shannon cho thấy tính đa dạng cao nhất ở rễ ($H' = 2,673$), tiếp theo là thân ($H' = 2,162$) và lá ($H' = 2,054$). Tương tự như vậy, tính đa dạng loài cao nhất ở rễ ($Dmg = 4,551$; $Dmn = 3,079$) và thân ($Dmg = 4,024$; $Dmn = 3,175$) và thấp nhất ở lá ($Dmg = 3,41$; $Dmn = 2,405$). Tuy nhiên, chỉ số đa dạng Simpson cho thấy quần thể nấm nội sinh có nhiều nhất ở lá ($1-D = 0,911$), tiếp theo là thân ($1-D = 0,897$) và rễ ($1-D = 0,867$) (Bảng 3.5). Cuối cùng, chỉ số tương tự là cao nhất ($S = 0,538$) đối với so sánh lá so với rễ, điều này cho thấy số lượng các loài nấm nội sinh được phân bố ở lá và rễ cao hơn so với lá và thân (0,286) hoặc thân và rễ (0,148) (Bảng 3.6). Ngoài ra, chỉ số Sorensen là 0,615 cho thấy mức độ tương đồng trung bình về thành phần loài giữa hai địa điểm, Hà Giang và Lai Châu (Bảng 3.7). Đây là báo cáo đầu tiên về sự đa dạng của nấm nội sinh được phân lập từ *D. difformis* tại Việt Nam, mở ra một hướng đi tiềm năng để sàng lọc các chủng nấm nội sinh có khả năng sản xuất các hợp chất thứ cấp quan trọng.

Bảng 3.5. Các chỉ số đa dạng đặc trưng của nấm nội sinh phân lập từ các mô của *D. difformis*.

Chỉ số đa dạng	Rễ	Lá	Thân
Chỉ số ưu thế Simpson (D)	0,133	0,089	0,103
Chỉ số đa dạng Simpson (1-D)	0,867	0,911	0,897
Chỉ số đa dạng Shannon (H')	2,673	2,054	2,162
Chỉ số độ giàu Margalef (Dmg)	4,551	3,410	4,024
Chỉ số độ giàu Menhinnick (Dmn)	3,079	2,405	3,175
Chỉ số ưu thế Carmago (Cm)	0,325	0,416	0,315
Chỉ số độ đồng đều Pielou (P)	0,964	0,892	0,902

Bảng 3.6. Chỉ số tương tự Sorenson cho nấm sợi sinh của *D. difformis*.

Chỉ số tương tự Sorenson (S)	Rễ	Lá	Thân
Rễ	1,000	0,538	0,148
Lá	0,538	1,000	0,286
Thân	0,148	0,286	1,000

Bảng 3.7. Các chỉ số đa dạng đặc trưng cho vị trí lấy mẫu của các loài nấm nội sinh phân lập từ *D. difformis*.

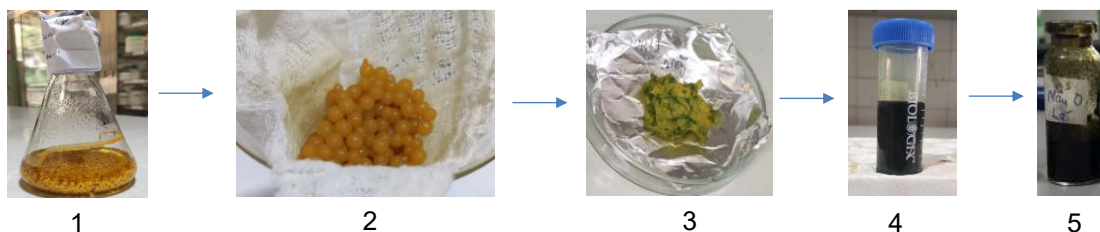
Chỉ số đa dạng	Ha Giang	Lai Chau
Chỉ số ưu thế Simpson (D)	0,064	0,059
Chỉ số đa dạng Simpson (1-D)	0,936	0,941
Chỉ số đa dạng Shannon (H')	2,849	2,921
Chỉ số độ giàu Margalef (Dmg)	5,402	5,903
Chỉ số độ giàu Menhinnick (Dmn)	3,591	4,000
Chỉ số ưu thế Carmago (Cm)	0,279	0,250
Chỉ số độ đồng đều Pielou (P)	0,968	0,975
Chỉ số tương tự Sorenson (S)	0,615	0,615

3.1.3. Sàng lọc và tuyển chọn chủng *Penicillium herquei* HGN12.1R có khả năng sinh hoạt chất podophyllotoxin và dẫn xuất

3.1.3.1. Chiết xuất nấm

Trong nghiên cứu này, các chủng nấm được nuôi lắc trong 100 mL môi trường PDA, pH 7 với tốc độ 150 vòng/phút, 25 ± 2 °C trong 5 ngày. Sau khi kết thúc nuôi cấy, sinh khối nấm và dịch lên men được thu bằng phương pháp lọc. Khối lượng sinh khối tươi (SKT): $23,12 \pm 0,11$ g, sinh khối khô (SKK): $0,86 \pm 0,06$ g. Tiếp theo, SKK được ngâm trong 100 ml dung môi methanol để tiến hành chiết rút các chất có hoạt tính. Các bước chiết xuất được thực hiện theo phương pháp của [16]. Kết quả thu

được chiết xuất nấm thô với khối lượng xấp xỉ 0,03 g. Chiết xuất này được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo về khả năng sinh hoạt chất podophyllotoxin và dẫn xuất.



Hình 3.8. Lên men và chiết xuất nấm (1: lên men; 2: lọc thu sinh khối nấm tươi; 3: sinh khối khô; 4: dịch chiết methanol tổng; 5: chiết xuất nấm)

3.1.3.2. Đánh giá khả năng gây độc tế bào của các chiết xuất nấm nội sinh

Hoạt tính gây độc tế bào *in vitro* của chiết xuất nấm đã được khảo sát trên ba dòng tế bào ung thư gồm SK-LU1, HL 60 và Hep2. Để so sánh, các nhà nghiên cứu đã sử dụng chiết xuất *D. difformis* và các đối chứng dương như PTOX và ellipticine. Kết quả chỉ ra rằng 28 chiết xuất có hoạt tính gây độc tế bào trên tế bào SK-LU-1, với giá trị IC_{50} nằm trong khoảng từ 0,036 đến 80,23 $\mu\text{g/ml}$. Đáng chú ý, có 21 chiết xuất thể hiện độc tính tế bào mạnh với IC_{50} từ 0,036 đến 18,75 $\mu\text{g/ml}$. (Bảng 3.8).

Nhằm đánh giá sâu hơn tiềm năng chống ung thư, hai mươi một chiết xuất có hoạt tính mạnh trên SK-LU-1 này tiếp tục được thử hoạt tính trên HL-60 (Bệnh bạch cầu cấp tính ở người) và HepG2 (ung thư biểu mô tế bào gan ở người). Tuy nhiên, trong số 21 chiết xuất được thử nghiệm chỉ có sáu chiết xuất nấm cho thấy hoạt động gây độc tế bào rất mạnh đáng kể trên cả HL-60 và HepG2 với IC_{50} từ 0,073 đến 0,31 $\mu\text{g/ml}$ và từ 1,60 đến 10,84 $\mu\text{g/ml}$, tương ứng (Bảng 3.9). Các chiết xuất này thuộc về các chi *Penicillium* (hai chủng), *Trametes*, *Purpureocillium*, *Aspergillus*, và *Ganoderma*. Các chiết xuất còn lại (15 chiết xuất) đã không cho thấy hoạt tính gây độc tế bào đáng kể trên các dòng tế bào HL-60 và HepG2 (dữ liệu chi tiết về 15 chiết xuất này không được hiển thị trong tài liệu).

Bảng 3.8. Hoạt tính gây độc tế bào IC₅₀ của 53 chiết xuất nấm gây độc trên dòng tế bào SK-LU-1

STT	Chiết xuất nấm	Hoạt tính gây độc tế bào IC ₅₀ (µg/ml)	STT	Chiết xuất nấm	Hoạt tính gây độc tế bào IC ₅₀ (µg/ml)
1	HGN6.1R	>100	29	HGN13.1R	4,030 ± 0,600
2	HGN6.2R	80,230 ± 2,420	30	HGN12.1R	1,190 ± 0,110
3	HGN13R	0,036 ± 0,001	31	LCN15L	80,220 ± 1,740
4	LCN9R	0,163 ± 0,012	32	LCN12.1L	0,195 ± 0,027
5	LCN21T	1,770 ± 0,150	33	HGN1T	>100
6	HGN1R	75,29 ± 2,580	34	LCN12T	2,230 ± 0,290
7	LCN7L	6,440 ± 0,410	35	HGN14.1R	>100
8	HGN8.1R	3,030 ± 0,300	36	HGN3L	>100
9	LCN1R	>100	37	HGN1L	>100
10	HGN11.1R	>100	38	LCN5L	>100
11	LCN3L	>100	39	HGN3T	>100
12	LCN19T	5,580 ± 0,450	40	LCN14L	>100
13	LCN8.3L	>100	41	LCN3T	2,040 ± 0,190
14	HGN7.1R	>100	42	LCN13T	28,660 ± 1,500
15	HGN7R	>100	43	LCN17T	3,900 ± 0,260
16	HGN5L	>100	44	LCN4T	>100
17	LCN1L	1,370 ± 0,140	45	HGN11R	63,320 ± 6,410
18	LCN6T	>100	46	HGN12.2R	2,060 ± 0,310
19	LCN1T	18,750 ± 1,110	47	HGN3.1R	9,590 ± 0,150
20	LCN8T	2,490 ± 0,220	48	LCN11L	0,110 ± 0,036
21	HGN2.1R	0,550 ± 0,050	49	LCN13L	>100
22	HGN3R	>100	50	HGN2R	0,069 ± 0,004
23	HGN7.2R	>100	51	HGN5.1R	76,670 ± 2,680
24	LCN16T	>100	52	LCN3R	72,010 ± 6,430
25	HGN14R	>100	53	HGN10R	>100
26	HGN5R	>100	54	<i>D. difformis</i> extract	0,160 ± 0,020
27	LCN7R	>100	55	Podophyllotoxin	0,054 ± 0,006
28	HGN6R	2,090 ± 0,120	56	Ellipticine	0,430 ± 0,040

Podophyllotoxin, Ellipticine được sử dụng làm đối chứng dương

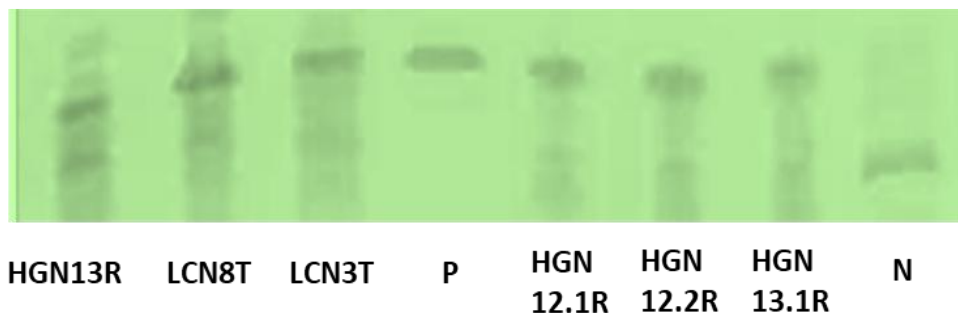
Bảng 3.9. Hoạt tính gây độc tế bào IC₅₀ của các chiết xuất nấm trên hai dòng tế bào ung thư HL-60 và HepG2

STT	Chiết xuất nấm	Chi phân loại	Hoạt tính gây độc tế bào IC ₅₀ (µg/ml)	
			HL-60	HepG2
1	HGN12.1R	<i>Penicillium</i>	0,013 ± 0,004	0,071 ± 0,011
2	HGN12.2R	<i>Trametes</i>	0,056 ± 0,009	0,200 ± 0,030
3	HGN13R	<i>Aspergillus</i>	0,310 ± 0,030	1,600 ± 0,150
4	HGN13.1R	<i>Penicillium</i>	0,073 ± 0,006	10,840 ± 1,190
5	LCN3T	<i>Purpureocillium</i>	0,028 ± 0,005	0,013 ± 0,003
6	LCN8T	<i>Ganoderma</i>	0,046 ± 0,007	2,020 ± 0,160
7	<i>D. difformis</i> extract	-	0,840 ± 0,0800	1,110 ± 0,150
8	Podophyllotoxin	-	0,008 ± 0,001	0,180 ± 0,020
9	Ellipticine	-	0,280 ± 0,030	0,370 ± 0,040

Podophyllotoxin, Ellipticine được sử dụng làm đối chứng dương

3.1.3.3. Phát hiện podophyllotoxin trong chiết xuất nấm nội sinh bằng phương pháp TLC (sắc ký bản mỏng) và HPLC (sắc ký lỏng hiệu suất cao)

Dựa trên kết quả sàng lọc, sáu chiết xuất nấm đã được xác định có hoạt tính gây độc tế bào rất mạnh trên cả ba dòng tế bào ung thư, nhóm nghiên cứu đã tiến hành phân tích sự hiện diện của PTOX.



Hình 3.9. Phân tích TLC của chiết xuất nấm nội sinh

HGN13R, LCN8T, LCN3T, HGN12.1R, HGN12.2R và HGN13.1R; podophyllotoxin được sử dụng làm chuẩn, đối chứng dương (P); môi trường không có nấm được sử dụng làm đối chứng âm (N)

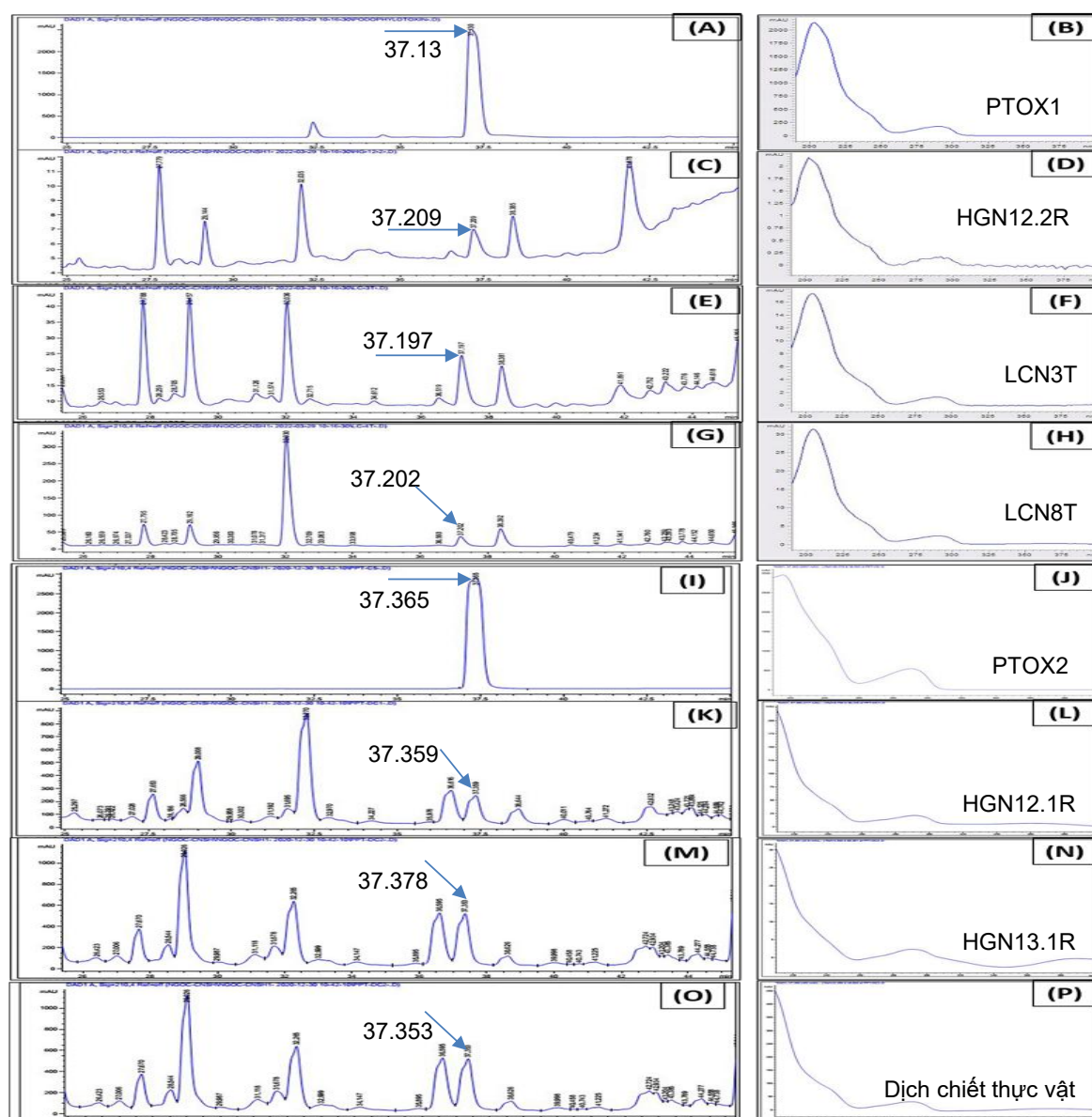
Kết quả phân tích sắc ký lớp mỏng (TLC) cho thấy sự hiện diện của PTOX trong sáu chiết xuất nấm: HGN13R, LCN8T, LCN3T, HGN12.1R, HGN12.2R và HGN13.1R. Điều này được xác nhận khi so sánh với PTOX chuẩn (đối chứng dương) và môi trường không chứa nấm (đối chứng âm) (Hình 3.9). Do đó, các chủng nấm này sẽ tiếp tục được chọn để nghiên cứu thêm.

Sáu chiết xuất nấm và dịch chiết Bát Giác Liên đã được thử nghiệm để tìm sự hiện diện của PTOX bằng cách sử dụng phân tích HPLC, thời gian lưu của chất chuẩn PTOX (Sigma) đã được sử dụng để so sánh.

Trong lần phân tích HPLC đầu tiên, các pic sắc ký của chiết xuất HGN13R, HGN12.2R, LCN3T và LCN8T cho thấy đỉnh có thời gian lưu (Rt) tương ứng là 37.164, 37.209, 37.197 và 37.202 phút tương tự như của chất chuẩn (Rt = 37.130 phút). Trong lần phân tích HPLC thứ hai, các chiết xuất từ HGN12.1R, HGN13.1R, chiết xuất thực vật cho thấy thời gian lưu lần lượt là 37,359; 37,378; 37,353 cũng có thời gian lưu gần với PTOX chuẩn (Rt = 37.365 phút) (Bảng 3.10).

Bảng 3.10. Dữ liệu HPLC để xác định PTOX

Tên hợp chất	Thời gian lưu (Rt) (phút)
Podophyllotoxin ¹ (Tiêu chuẩn)	37.13
HGN13R	37.164
HGN12.2R	37.209
LCN3T	37.197
LCN8T	37.202
Podophyllotoxin ² (Tiêu chuẩn)	37.365
HGN12.1R	37.359
HGN13.1R	37.378
Chiết xuất thực vật (Chiết xuất <i>D.difformis</i>)	37.353



Hình 3.10. Xác định PTOX bằng HPLC-DAD

Quan sát phổ UV của các chiết xuất HGN13R, HGN12.2R, LCN3T, LCN8T cho thấy các pic thu được rõ ràng và có thể tách chúng khỏi các loại hợp chất khác. Ngoài ra, việc so sánh phổ UV của các pic sắc ký đồ HPLC nói trên với phổ UV của PTOX chuẩn cho thấy sự trùng khớp, điều này xác nhận sự hiện diện của PTOX trong dịch chiết nấm (Hình 3.10) và (Hình 1E, phụ lục E). Tương tự, phổ UV của dịch chiết HGN12.1R, HGN13.1R và dịch chiết thực vật thể hiện mô hình tương tự như PTOX chuẩn.

Các phân tích được thực hiện hai lần với hai PTOX chuẩn tách biệt. 1. Sắc ký đồ (A, C, E, G) và phổ UV (B, D, F, H) lần lượt của PTOX1 chuẩn (Sigma); dịch chiết HGN12.2R; dịch chiết LCN3T; dịch chiết LCN8T; 2. Sắc ký đồ (I, K, M, O) và phổ UV (J, L, N, P) lần lượt của PTOX2 chuẩn; dịch chiết HGN12.1R; dịch chiết HGN13.1R; và dịch chiết BGL.

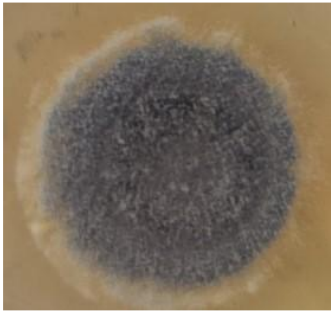
Sau quá trình sàng lọc dữ liệu, chủng *Penicillium herquei* HGN12.1R nổi bật với hoạt tính gây độc tế bào tương đối mạnh trên cả ba dòng tế bào ung thư, phổ UV trùng khớp với phổ của hợp chất PTOX chuẩn trong phân tích HPLC. Điều đó cung cấp bằng chứng mạnh mẽ về sự hiện diện của hợp chất hoạt tính mục tiêu và *Penicillium herquei* HGN12.1R được chọn để khai thác các hoạt chất sinh học trong các nghiên cứu tiếp theo.

3.1.4. Đặc điểm sinh học của chủng *Penicillium herquei* HGN12.1R đã tuyển chọn

3.1.4.1. Đặc điểm hình thái, định danh chủng tuyển chọn

Đặc điểm hình thái như hệ sợi, bào tử, cuống bào tử và vách ngăn là những yếu tố quan trọng trong việc phân loại vi nấm theo phương pháp truyền thống. Chủng nấm HGN12.1R, sau khi nuôi cấy trên môi trường PDA ở 25°C trong 5 ngày, đã được quan sát và ghi nhận các đặc điểm sau: khuẩn lạc có màu xanh rêu, viền trắng, dạng tròn không đều. Bề mặt sợi nấm khí sinh mịn, ngắn, phân nhánh, mọc dày đặc sát mặt thạch. Khi quan sát dưới kính hiển vi quang học, chủng nấm này cho thấy cuống sinh bào tử thể bình có nhiều tầng. Bào tử khi còn non có hình cầu, nhưng khi già đi sẽ bị xé rách và tạo thành các chuỗi dài (Bảng 3.11).

Bảng 3.11. Đặc điểm hình thái chủng HGN12.1R

Đặc điểm hình thái đại thể	Đặc điểm hình thái vi thể
 - Màu xanh rêu, tròn không đều, đường kính 6-8 mm - Bề mặt sợi khuẩn ti khí sinh mịn như bụi phấn, tâm hơi lồi, viền liền trắng đục. - Không tiết sắc tố hoà tan	 - Bào tử được sản xuất với số lượng lớn, tạo thành các cột có cấu trúc dạng "chổi" đặc trưng của <i>Penicillium</i> - Cuống sinh bào tử phân nhánh. Bề mặt cuống ráp. Có tế bào sinh sản thể bình nhiều tầng. - Bào tử lúc non hình cầu, xé rách tạo dạng chuỗi bào tử dài khi già.

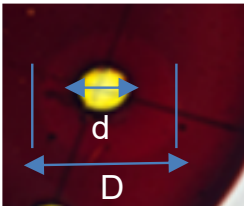
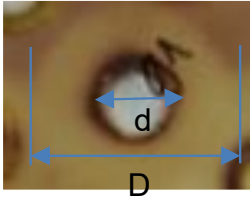
Dựa trên những đặc điểm hình thái đại thể và vi thể này, việc nhận dạng sơ bộ theo các khóa phân loại [126], [127] cho thấy chủng HGN12.1R thuộc chi *Penicillium*. Kết hợp phân tích và so sánh trình tự gen vùng ITS/18S rRNA của chủng

vi nấm với các trình tự trên Ngân hàng Gen thông qua công cụ BLAST của NCBI, kết quả cho thấy chủng HGN12.1R có độ tương đồng cao (99,80%) với trình tự gen của chủng *Penicillium herquei* BCC, mã số MF537646.1 (Bảng 1C, phụ lục C) đã đưa đến kết quả định danh HGN12.1R là *Penicillium herquei* HGN12.1R. Chủng *Penicillium herquei* HGN12.1R được đăng ký trên ngân hàng gen với mã số MZ462047.

3.1.4.2. Đặc điểm sinh lý, sinh hoá của chủng nấm tuyển chọn

Nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ đối với khả năng sinh trưởng của chủng nấm *Penicillium herquei* HGN12.1R. đã chỉ ra sự thay đổi rõ rệt trong tốc độ sinh trưởng của hệ sợi nấm. Hệ sợi nấm sinh trưởng tốt nhất ở 25 °C với $0,87 \pm 0,07$ g SKK/100 ml) sau 72h nuôi cấy. Tuy nhiên, khi nhiệt độ tăng, tốc độ sinh trưởng giảm dần, xuống còn $0,28 \pm 0,02$ g SKK /100 ml ở 35°C và ở 37 °C chủng nấm không phát triển.

Bảng 3.12. Đặc điểm sinh học của *Penicillium herquei* HGN12.1R

Tốc độ sinh trưởng của nấm		
Điều kiện thích hợp	pH (6-7)	Nhiệt độ (25 °C)
Đơn vị	g/100 ml	g/100 ml
Chỉ số	$0,79 \pm 0,02 \div 0,75 \pm 0,04$	$0,87 \pm 0,07$
Hoạt tính enzyme ngoại bào (D-d)mm		
 Chitinase  Cellulase		

Về ảnh hưởng của pH, chủng *P. herquei* HGN12.1R có khả năng sinh trưởng ở tất cả 6 thang pH thử nghiệm. Tốc độ sinh trưởng hệ sợi nấm cao nhất sau 72h nuôi cấy ở pH 6 ($0,79 \pm 0,02$ g SKK/100 ml) và pH 7 ($0,75 \pm 0,04$ g SKK/100 ml). Tốc độ sinh trưởng chậm nhất được ghi nhận ở pH 4 ($0,16 \pm 0,04$ g SKK/100 ml).

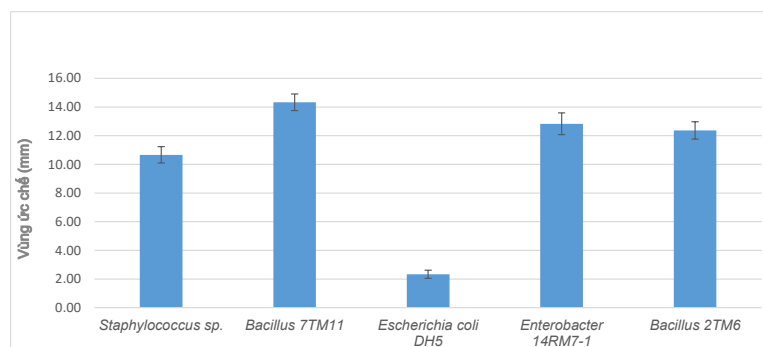
Khảo sát hoạt tính enzyme ngoại bào của chủng *P. herquei* HGN12.1R cho thấy khả năng phân giải chitinase, cellulase. Vòng phân giải trung bình đối với chitinase là $6,3 \pm 0,08$ mm và đối với cellulase là $8,5 \pm 0,05$ mm (Bảng 3.12)

3.1.4.3. Khảo sát hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của chủng nấm tuyến chọn

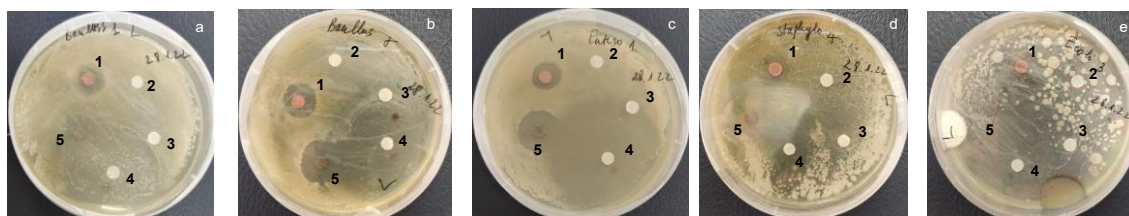
Hoạt tính kháng khuẩn *in vitro* của chiết xuất nấm HGN12.1R được khảo sát bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch đối với các chủng *Escherichia coli* DH5, *Staphylococcus* sp., *Bacillus* 7TM11, *Bacillus* 2TM6, *Enterobacter* 14RM7-1. Các chủng vi sinh vật này đại diện cho nhóm vi khuẩn Gram âm, Gram dương. Kết quả kháng khuẩn của chiết xuất nấm HGN12.1R được trình bày trong (Bảng 3.13).

Bảng 3.13. Hoạt tính kháng khuẩn của chiết xuất nấm HGN12.1R

Yếu tố khảo sát	Đường kính vùng ức chế (mm)				
	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>Bacillus</i> 7TM11	<i>Escherichia coli</i> DH5	<i>Enterobacter</i> 14RM7-1	<i>Bacillus</i> 2TM6
HGN12.1R	10,67±0,58	14,33±0,58	2,33±0,29	12,83±0,76	12,37±0,6
Methanol	-	-	-	-	-
Cefotaxime	35±0,37	33,3±0,25	31,3±0,17	26,3±0,29	31,7±0,33
Chiết xuất BGL	7,7±0,12	9,0±0,08	3,4±0,05	7,7±0,17	6,7±0,21



Hình 3.11. Biểu đồ hoạt tính kháng khuẩn của chiết xuất nấm HGN12.1R



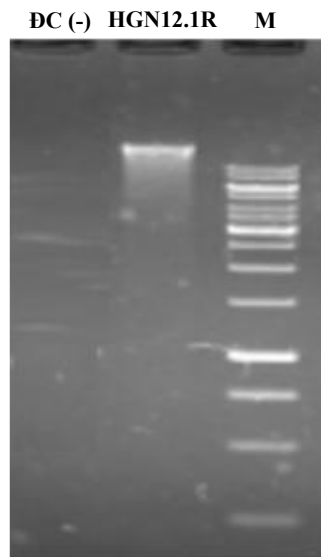
Hình 3.12. Hoạt tính kháng khuẩn trên đĩa thạch của chiết xuất nấm HGN12.1R (a: *Bacillus* 2TM6; b: *Bacillus* 7TM11; c: *Enterobacter* 14RM7-1; d: *Staphylococcus* sp; e: *Escherichia coli* DH5; 1: Chiết xuất nấm HGN12.1R; 2: Môi trường; 3: Dung môi methanol; 4: Kháng sinh Cefotaxime; 5: Chiết xuất rễ Bát Giác Liên)

Kết quả cho thấy chiết xuất nấm HGN12.1R có tác dụng ức chế các chủng vi khuẩn Gram âm và Gram dương. Vùng ức chế dao động từ 2-14 mm. Chiết xuất thể hiện hoạt tính kháng khuẩn rõ rệt trên *Bacillus* 7TM11, *Enterobacter* 14RM7-1, và *Bacillus* 2TM6, tác dụng giảm dần trên *Staphylococcus* sp., và không có hoặc rất ít tác dụng trên *Escherichia coli* DH5. Tương tự như vậy hoạt chất cao chiết từ rễ cũng cho kết quả kháng khuẩn tương đối đồng nhất với cao chiết nấm HGN12.1R.

3.2. Đặc điểm hệ gen của chủng *Penicillium herquei* HGN12.1R

3.2.1. Kết quả tách chiết DNA

DNA tổng số của chủng *Penicillium herquei* HGN12.1R đã được tách chiết. Kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1% cho thấy DNA có băng kích thước lớn và rõ ràng (Hình 3.13). Nồng độ và độ tinh sạch của DNA được trình bày trong (Bảng 3.14). Kết quả thu được DNA có nồng độ khá cao và độ tinh sạch rất tốt, tiếp tục sử dụng cho những nghiên cứu tiếp theo.



Hình 3.13. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm tách DNA tổng số
(M: Marker 1kb, Thermo Scientific)

Bảng 3.14. Nồng độ và độ tinh sạch mẫu DNA tổng số của nấm

Mẫu	Nồng độ	Độ tinh sạch
HGN12.1R	89,8 ng/μl	1,91

3.2.2. Giải trình tự và phân tích hệ gen

Bộ gen của nấm *Penicillium herquei* HGN12.1R đã được lắp ráp và chú thích (Bảng 3.15). Tổng kích thước bộ gen đạt 34.960.991 bp, với số lượng contig (kích

thước ≥ 1000 bp) là 8. Giá trị N50 của bộ gen là 6.172.464 bp và tỉ lệ GC là 46.38%. Tổng số gen dự đoán trong bộ gen là 12.871, trong đó có 12.593 gen mã hóa mRNA, 263 gen tRNA và 15 gen rRNA.

Đánh giá mức độ hoàn chỉnh của bộ gen bằng BUSCOs cho thấy bộ gen hoàn chỉnh và có một bản sao duy nhất là 98.9%, với 0.4% gen trùng lặp, 1.1% gen bị phân mảnh, và 0.6% gen bị thiếu.

Bảng 3.15. Đặc điểm hệ gen và số liệu lắp ráp hệ gen của *Penicillium herquei* HGN12.1R

<i>Genome Assembly</i>	Values
Total assembly size (Mb)	34,960,691
Number of chromosomes (≥ 1000 bp)	8
Number of chromosomes (≥ 5000 bp)	7
Number of organelles	1
Largest chromosomes (Mb)	8,398,835
GC-content (%)	46.38
N50 (Mb)	6,172,464
L50	3
Total predicted genes	12,871
Genome coverage	195.0×
<i>Completeness evaluation (%)</i>	
Completeness	98.3
Complete and single-copy BUSCOs	97.9
Complete and duplicated BUSCOs	0.4
Fragmented BUSCOs	1.1
Missing BUSCOs	0.6
<i>Repeat annotation</i>	
Unclassified (%)	0
Simple repeat (%)	0.59
Low complexity (%)	0.14
Total repeat length (bp)	254,455
<i>RNA gene annotation</i>	
mRNA	12,593
tRNA	263
rRNA	15

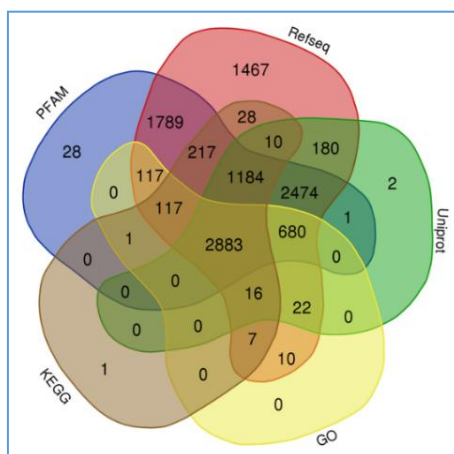
3.2.3. Kết quả chú giải hệ gen

Mục tiêu xác định vị trí và chức năng của các gen và các yếu tố di truyền khác trong hệ gen. Cung cấp thông tin chi tiết về các gen tham gia vào quá trình sinh tổng hợp PTOX.

Chú giải hệ gen chủng HGN12.1R đã được thực hiện sử dụng nhiều cơ sở dữ liệu. Kết quả chú giải cho thấy tổng số 7401 gen duy nhất được chú giải (tức là tổng số tất cả các gen xuất hiện trong ít nhất một cơ sở dữ liệu).

Cụ thể, số lượng gen được chú giải bởi các cơ sở dữ liệu riêng lẻ như sau: 7.452 gen qua Uniprot, 11.201 gen qua RefSeq, 3.852 gen qua Gene Ontology, 4.464 gen qua KEGG và 9.491 gen qua PFAM.

Biểu đồ Venn (Hình 3.14) biểu diễn sự giao nhau giữa các tập hợp gen được chú giải. Kết quả chỉ ra rằng có 2474 gen được chú giải bởi cả Refseq và Uniprot; 1789 gen bởi Refseq và PFAM; và 1467 gen chỉ được chú giải bởi Refseq. Chỉ có 2 gen được chú giải riêng bởi Uniprot và 1 gen bởi KEGG, không có gen nào chỉ được chú giải riêng bởi GO.

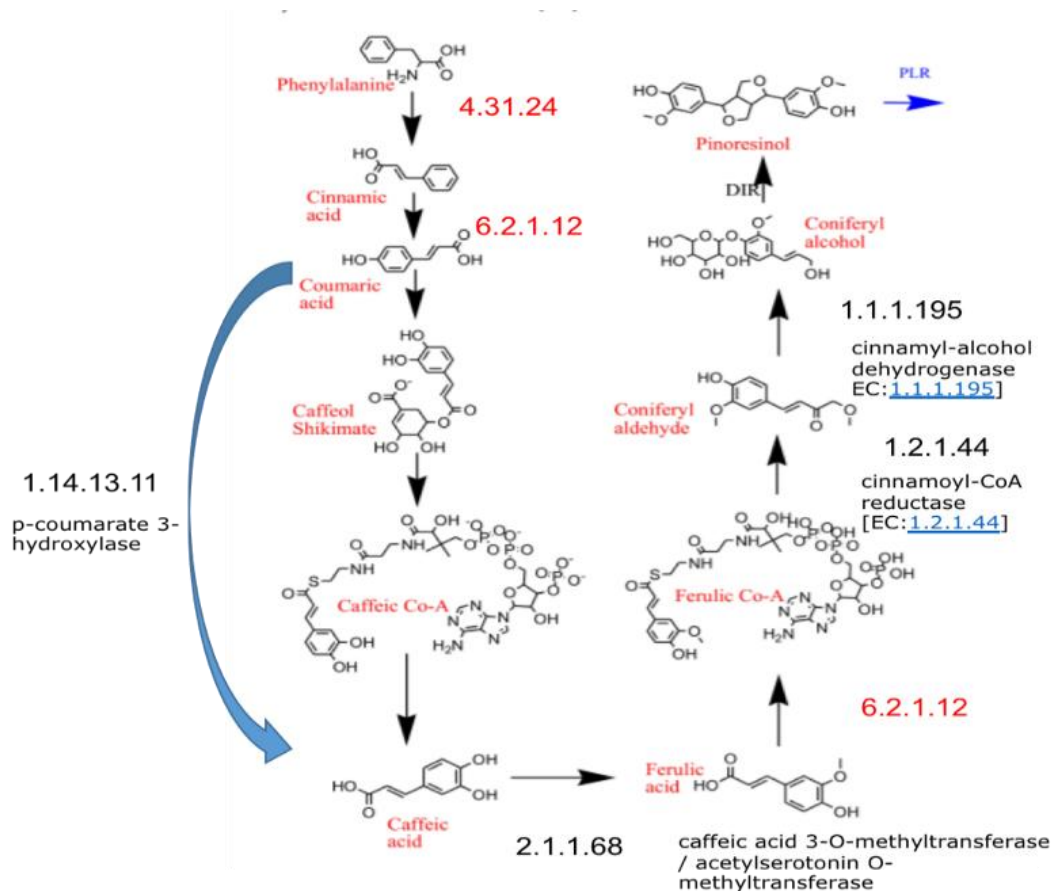


Hình 3.14. Biểu đồ Venn chú giải gen chức năng trên các CSDL RefSeq, Uniprot, Gene Ontology, Pfam và KEGG của nấm *Penicillium herquei* HGN12.1R

3.2.4. Dự đoán các nhóm gen liên quan đến sinh tổng hợp podophyllotoxin ở chủng *Penicillium herquei* HGN12.1R

Mặc dù PTOX đã được tìm thấy ở nhiều loài thực vật, con đường sinh tổng hợp của nó vẫn chưa được khám phá một cách đầy đủ. Theo [148] có ít nhất 26 gen liên quan đến 69 bước phản ứng tổng hợp PTOX bắt đầu từ D-erythrose-4-phosphate đến PTOX. Tuy nhiên phần lớn các nghiên cứu đều cho thấy chỉ có 33 bước phản ứng với sự tham gia của 26 gen/enzyme được phân tích, nhận diện một cách rõ ràng.

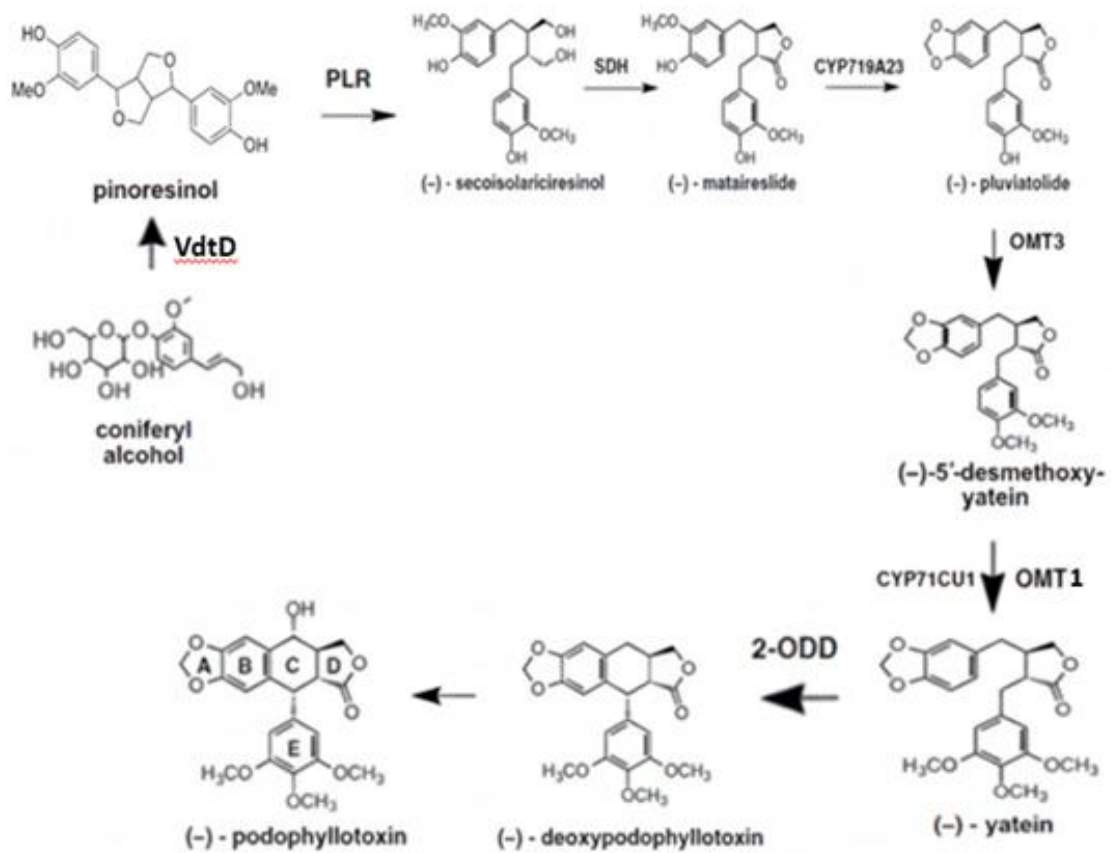
Trong giai đoạn đầu tiên chất chính là coniferyl alcohol được hình thành từ phenylalanine qua 9 bước phản ứng. Giai đoạn sau từ coniferyl alcohol trải qua một số phản ứng dimer hoá, dehydro hoá và methyl hoá để hình thành một số chất trung gian chuyển hoá quan trọng như pluviatolid và yatein. Cuối cùng từ chất trung gian yatein được chuyển hoá thành deoxypodophyllotoxin và sau cùng là PTOX [149], [150]. Trong nghiên cứu này, các enzyme liên quan tới giai đoạn đầu hình thành coniferyl alcohol (monolignol) từ phenylalanine được xác nhận bằng con đường sinh tổng hợp phenylpropanoid (KEGG) (Hình 1F, phụ lục F) và được tóm tắt bằng sơ đồ sau (Hình 3.15)



Hình 3.15. Các enzyme liên quan tới giai đoạn đầu hình thành coniferyl alcohol

Giai đoạn sau của phản ứng sinh tổng hợp PTOX được xem là quan trọng nhất bởi phần lớn các chất trung gian quan trọng, các dẫn xuất có hoạt tính tương tự như PTOX đều được hình thành ở giai đoạn này. Có ít nhất 9 gen tham gia vào quá trình chuyển hoá từ coniferyl alcohol đến PTOX bao gồm: DIR, PLR, SDH, CYP719A23, OMT3, CYP71CU1, OMT1, 2-ODD và DOP7H [86], [151] (Bảng 1H, phụ lục H). Dựa trên các gen tương đồng ở thực vật (Hình 2F, phụ lục F) như PLR, SDH, 2-ODD, CYP719A23, OMT3, CYP71CU1 và OMT1 có liên quan đến cơ chế sinh tổng hợp

PTOX [86], nghiên cứu này tiến hành tìm kiếm một số gen tương đồng tìm được ở nấm để dự đoán sự có mặt của chúng trong hệ gen nấm (Hình 3.16).



Hình 3.16. Các gen tham gia vào quá trình chuyển hoá từ coniferyl alcohol đến podophyllotoxin

Để xác định các gen chính liên quan đến con đường tổng hợp PTOX ở *Penicillium herquei* HGN12.1R, chúng tôi đã sàng lọc và tìm kiếm các gen ứng viên trong hệ gen bằng cách sử dụng tìm kiếm BLASTP (với giới hạn giá trị E là $1e-05$) với 10 gen trong thực vật và 01 gen từ nấm (gen VdtD) sử dụng làm gen tham chiếu (Phụ lục H). VdtD, một gen duy nhất được tìm thấy ở nấm, có chức năng tương tự như gen dirigent (DIR) ở thực vật. Lựa chọn các lần truy cập BLASTP có giá trị ngưỡng $E < 1e-10$ và kết quả được xác minh bằng cơ sở dữ liệu Pfam, kết quả phát hiện tổng cộng 517 gen tương đồng từ hệ gen HGN12.1R, trong đó có 91 gen SDH, 79 gen CYP71BE54, 73 gen CYP82D61, 70 gen CYP719A23, 54 gen CYP71CU1, 48 gen VdtD, 22 gen OMT3, 19 gen OMT1, 4 gen 2-ODD và 1 gen PLR. Thống kê kết quả tìm kiếm các gen tương đồng được nêu trong Bảng 3.16.

Bảng 3.16. Thống kê kết quả dự đoán các gen liên quan đến con đường sinh tổng hợp podophyllotoxin ở *Penicillium herquei* HGN12.1R giai đoạn từ coniferyl alcohol tới podophyllotoxin (E-value $<1e^{-10}$)

STT	Gen trong thực vật và nấm		Hệ gen HGN12.1R	
	Mã ký hiệu	Mô tả gen	Số lượng bản sao gen có trình tự tương đồng	% tương đồng (tối thiểu- tối đa)
1	SDH	Secoisolariciresinol dehydrogenase	91	23.7-35.6
2	CYP71BE54	Desmethyl-deoxy-podophyllotoxin synthase	79	20.1-32.6
3	CYP82D61	Demethylepipodophyllotoxin synthase	73	22.9-35.2
4	CYP719A23	Pluviatolide synthase	70	20.7-33.9
5	CPY719A24	Pluviatolide synthase	66	20.2-30.9
6	CYP71CU1	Desmethylepicatechin synthase	54	20.3-31.2
7	VdtD*	Inactive carboxylesterase-like protein VdtD	48	23.2-38.9
8	OMT3	Pluviatolide O-methyltransferase	19	22.0-32.1
9	OMT1	Desmethyl-epicatechin O-methyltransferase	12	25.7-31.9
10	2-ODD	Deoxypodophyllotoxin synthase	4	26.9
11	PLR	Bifunctional pinoresinol-lariciresinol reductase	1	26.7

3.3. Xác định điều kiện thích hợp cho sản sinh podophyllotoxin và các dẫn xuất từ *Penicillium herquei* HGN12.1R bằng công nghệ lên men

3.3.1. Ảnh hưởng của môi trường

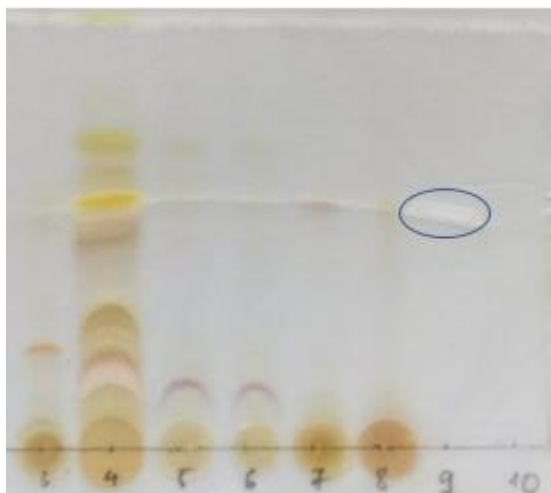
Quá trình lên men được tiếp giống đầu vào là 5%, tuổi giống từ 48-60h, nhiệt độ 25 °C trên môi trường PDA. Quan sát sự sinh trưởng của nấm cho thấy trong 2-3 ngày đầu, các chủng nấm ở giai đoạn pha log và sinh trưởng tăng dần. Bắt đầu từ ngày thứ 4, các hạt pelet nấm xuất hiện với tốc độ tăng vọt, ban đầu tròn nhỏ li ti, sau kích thước tăng dần. Trên các môi trường khác nhau, màu sắc dịch và kích thước hạt nấm cũng khác nhau.

Kết quả nêu trong Bảng 3.17 chỉ ra khi thay đổi thành phần môi trường, so với đối chứng PGA, hàm lượng sinh khối nấm thay đổi rõ rệt. Sinh khối tăng mạnh ở môi trường PDA. Chủng nấm này cho thấy sự thích nghi tốt với nguồn đường dextrose, dẫn đến việc khi điều chỉnh thành phần đường trong môi trường (so với đối chứng), sinh trưởng đã tăng đáng kể từ $9,45 \pm 0,08$ g/l lên $14,09 \pm 0,06$ g/l. Hình ảnh TLC cũng cho thấy quá trình lên men sinh tổng hợp PTOX và các dẫn xuất khả quan với đa dạng băng vạch so với chất chuẩn PTOX (Hình 3.17).

Chúng tôi đã lựa chọn môi trường lên men PDA cho các nghiên cứu tiếp theo. Các hình ảnh sinh khối tươi (Hình 1G, phụ lục G) và sinh khối khô (Hình 2G, phụ lục G) được thể hiện trong nghiên cứu này.

Bảng 3.17. Vai trò của môi trường nuôi cấy tới sinh trưởng của *Penicillium herquei* HGN12.1R

Môi trường nuôi cấy	Màu sắc dịch nuôi cấy, hình dạng sinh khối nấm	Sinh trưởng của nấm	
		SKT (g/l)	SKK (g/l)
PGA	Cam vàng, hạt nhỏ	$265,61 \pm 0,06$	$9,45 \pm 0,08$
Zhao	Xanh, hạt nhỏ li ti	$220,04 \pm 0,07$	$11,48 \pm 0,09$
PDA	Cam vàng, hạt nhỏ	$350,09 \pm 0,08$	$14,09 \pm 0,06$
YMA	Vàng, hạt to	$140,06 \pm 0,05$	$6,07 \pm 0,02$
Sabouraud broth	Vàng, hạt to	$125,32 \pm 0,07$	$5,59 \pm 0,03$
Czapek-Dox	Cam vàng, hạt nhỏ	$27,82 \pm 0,09$	$0,87 \pm 0,06$



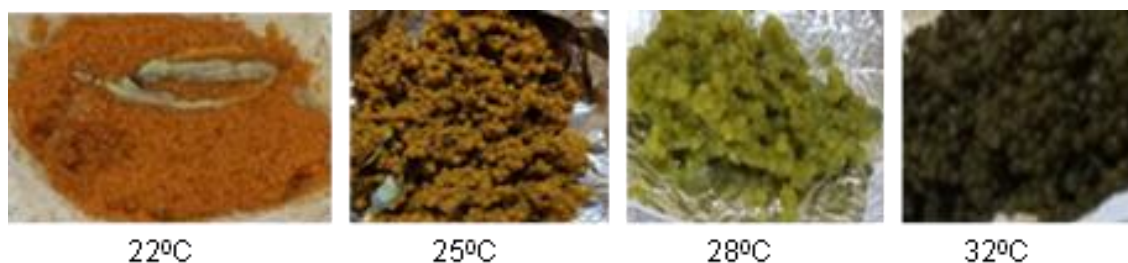
Hình 3.17. TLC xác định sự có mặt của Chất/tiền chất ở các môi trường khác nhau ảnh hưởng tới sinh trưởng của *Penicillium herquei* HGN12.1R (đường số 3: Czapek-Dox, đường số 4: PDA, đường số 5: Zhao, đường số 6: YMA, đường số 7: PGA, đường số 8: Sabouraud broth, đường số 9: Chất chuẩn PTOX, đường số 10: ĐC-)

3.3.2. Ảnh hưởng của pH và nhiệt độ

Nhiệt độ đóng vai trò quan trọng trong việc ảnh hưởng đến quá trình sinh trưởng, sinh sản và phát triển của vi nấm [152]. Quá trình lên men được tiếp giống đầu vào là 5%, tuổi giống từ 48-60h, nhiệt độ 25 °C trên môi trường PDA. Các kết quả từ Bảng 3.18 cho thấy các chủng phát triển tốt nhất ở 25 °C, đây cũng là nhiệt độ tối ưu để sản sinh PTOX và các dẫn xuất của nó.

Bảng 3.18. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng sinh trưởng của nấm HGN12.1R

Nhiệt độ	Sinh khối tươi (g/l)	Sinh khối khô (g/l)
22 °C	266,50 ± 0,15	10,06 ± 0,10
25 °C	332,37 ± 0,12	13,04 ± 0,04
28 °C	301,66 ± 0,07	12,96 ± 0,11
32 °C	270,35 ± 0,17	11,22 ± 0,01



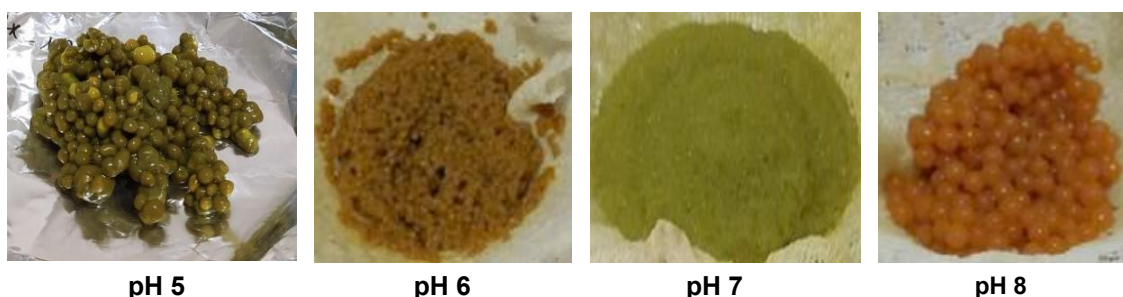
Hình 3.18. Ảnh hưởng của nhiệt độ tới sinh trưởng, màu sắc của nấm HGN12.1R

Trên cơ sở đó, môi trường được điều chỉnh pH lần lượt từ 5 đến 8, quá trình lên men được tiếp giống đầu vào là 5%, tuổi giống từ 48-60h, nhiệt độ 25 °C trên môi

trường PDA kết quả cho thấy pH thích hợp cho chủng HGN12.1R là 7,0 và hàm lượng sinh khối khô đạt $13,76 \pm 0,05$ g/l. Đây cũng là pH tốt nhất cho sinh tổng hợp chất/tiền chất PTOX của *Penicillium herquei* HGN12.1R (Bảng 3.19)

Bảng 3.19. Ảnh hưởng của pH đến khả năng sinh trưởng của *Penicillium herquei* HGN12.1R

pH	Sinh khối tươi (g/l)	Sinh khối khô (g/l)
pH 5	$253,58 \pm 0,05$	$10,08 \pm 0,01$
pH 6	$298,74 \pm 0,12$	$12,34 \pm 0,19$
pH 7	$340,36 \pm 0,08$	$13,76 \pm 0,05$
pH 8	$300,55 \pm 0,05$	$12,52 \pm 0,15$



Hình 3.19. Ảnh hưởng của pH tới sinh trưởng, màu sắc của nấm HGN12.1R

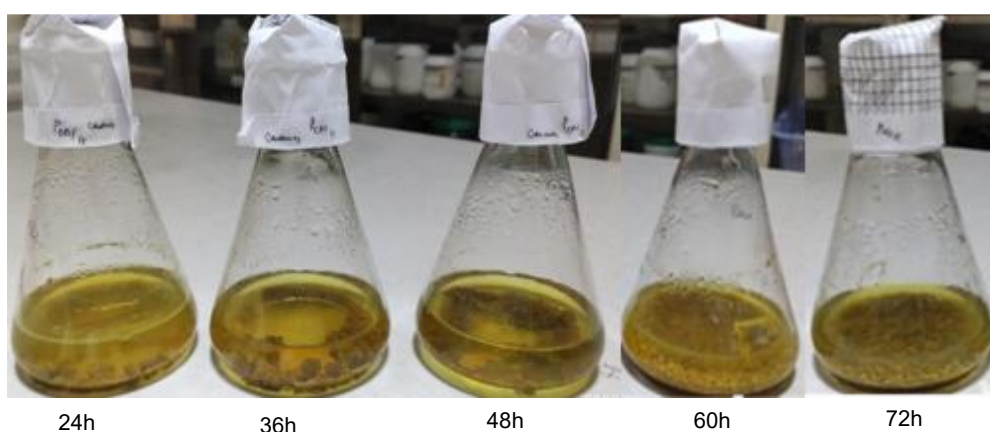
3.3.3. Ảnh hưởng của thời gian nhân giống và tỷ lệ giống

Tốc độ sinh trưởng của nấm trong môi trường dịch thể phụ thuộc nhiều vào thời gian nhân giống và tỷ lệ giống gốc được cấy vào. Các yếu tố này tác động trực tiếp đến mật độ và kích thước của nấm, từ đó ảnh hưởng đến tốc độ sinh trưởng tổng thể. Trong thí nghiệm này nấm được định kỳ thu ở các mốc 24, 36, 48, 60 và 72 giờ trước khi chuyển vào môi trường nuôi cấy.

Bảng 3.20. Ảnh hưởng của thời gian nhân giống đến khả năng sinh trưởng của *Penicillium herquei* HGN12.1R

Chỉ tiêu theo dõi	24 h	36 h	48 h	60 h	72 h
SKT (g/l)	$119,48 \pm 0,05$	$195,95 \pm 0,12$	$290,08 \pm 0,04$	$318,93 \pm 0,06$	$239,23 \pm 0,10$
SKK (g/l)	$4,45 \pm 0,07$	$6,90 \pm 0,03$	$10,03 \pm 0,06$	$12,95 \pm 0,08$	$8,09 \pm 0,10$

Kết quả ở (Bảng 3.20) cho thấy chủng *Penicillium herquei* HGN 12.1R có thời gian nhân giống thích hợp ở thời điểm 48-60 giờ, nếu ngắn hơn hoặc dài hơn đều ảnh hưởng tới khả năng sinh trưởng của các chủng nấm, Trước 48 giờ, sinh khối tạo thành chưa nhiều, vì nấm vừa qua giai đoạn thích nghi với môi trường, nếu chuyển vào bình lên men thì giống phải mất một khoảng thời gian thích nghi, bên cạnh đó lượng sinh khối quá ít có thể làm giảm hiệu suất lên men, tăng nguy cơ tạp nhiễm. Sau 72 giờ nuôi cấy, các tế bào vi nấm đã phát triển gần hết pha logarit và chuẩn bị bắt đầu pha cân bằng, lúc này chuyển giống vào môi trường lên men, giống sẽ không phát triển mạnh, vì vậy việc tích lũy sinh khối và PTOX sẽ kém. Vì vậy, giống ở giai đoạn 48-60 giờ đã phát triển và tạo sinh khối nhiều, khi chuyển sang môi trường lên men giống sẽ tiếp tục phát triển mạnh tạo điều kiện cho sinh tổng hợp PTOX tốt hơn.



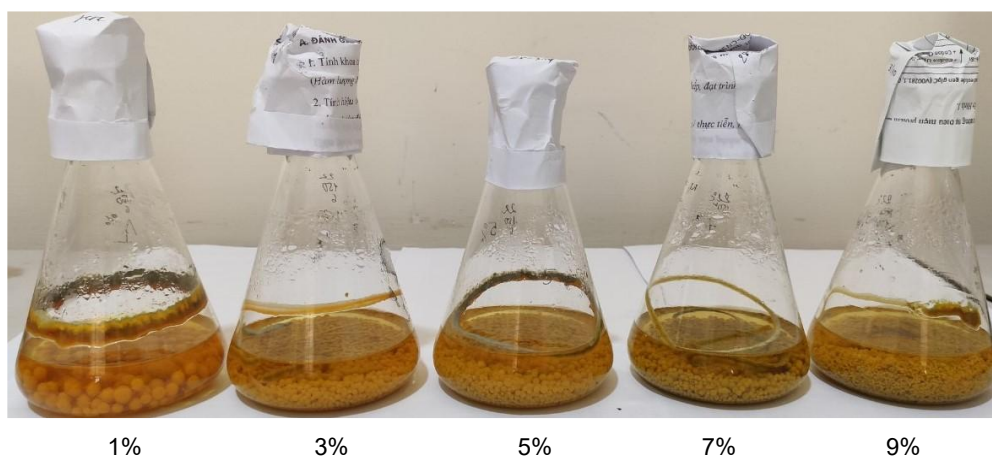
Hình 3.20. Lượng sinh khối nấm hình thành ở các thời gian nhân giống khác nhau của chủng *Penicillium herquei* HGN12.1R

Bên cạnh đó, tỷ lệ giống gốc cấy vào môi trường dịch thể luôn là một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến tốc độ sinh trưởng của giống, tới mật độ và kích thước của hạt nấm. Trong nghiên cứu này, tỷ lệ giống được cấy tính theo tỷ lệ với môi trường nuôi cấy, các mức độ giống cấy cho môi trường bao gồm: 1%; 3%, 5%, 7%, 9% giống cấp 1 so với môi trường nuôi cấy.

Bảng 3.21. Ảnh hưởng của tỷ lệ giống đến khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp của *Penicillium herquei* HGN12.1R

Chỉ tiêu theo dõi	1%	3%	5%	7%	9%
SKT (g/l)	200,52 ± 0,06	244,45 ± 0,07	335,07 ± 0,09	261,1 ± 0,08	174,1 ± 0,09
SKK (g/l)	7,45 ± 0,07	8,05 ± 0,08	13,12 ± 0,08	14,53 ± 0,04	8,55 ± 0,10

Từ kết quả ở (Bảng 3.21) cho thấy, tỷ lệ giống thích hợp nhất là 5% khi đó hàm lượng sinh khối khô của nấm lớn nhất, khi nâng tỷ lệ giống lên 7% thì hàm lượng sinh khối khô của nấm cũng chỉ cho sự tích lũy sinh khối tương đương, bên cạnh đó về mặt kinh tế thì 5% vừa tiết kiệm lại hiệu quả. Khi lên men ở quy mô lớn hơn thì % nhân giống có thể cao hơn và cần có bước khảo sát thêm.



Hình 3.21. Ảnh hưởng % nhân giống tới khả năng sinh trưởng của chủng *Penicillium herquei* HGN12.1R

3.3.4. Ảnh hưởng của độ thông khí đến khả năng sinh trưởng của các chủng nấm

Trong nghiên cứu này chúng tôi khảo sát số vòng lắc lần lượt là 100, 120, 150, 200 vòng/phút của dòng nấm trên PDA lỏng, pH 7, nhiệt độ 25 °C, thời gian 5 ngày, tuổi giống 48-60h, tỷ lệ tiếp giống 5%, kết thúc quá trình lên men lấy mẫu ra cân và sấy khô sinh khối đến trọng lượng không đổi. Kết quả thu được cho thấy ở (Bảng 3.22), sinh khối nấm tạo thành tăng dần khi tốc độ lắc tăng dần từ 100-150 vòng/phút, khi đó các hạt pillet đồng đều, Sau đó khi lên đến 200 vòng/phút thì lượng sinh khối thu được tiếp tục tăng nhưng chênh không đáng kể so với tốc độ lắc ở 150 vòng/phút cho lượng sinh khối khô $14,02 \pm 0,03$ g/l.

Bảng 3.22. Ảnh hưởng của tốc độ lắc đến khả năng sinh trưởng của *Penicillium herquei* HGN12.1R

Chỉ tiêu theo dõi	Tốc độ lắc (vòng/phút)			
	100	120	150	200
Sinh khối tươi (g/l)	$216,85 \pm 0,08$	$309,45 \pm 0,11$	$345,37 \pm 0,08$	$350,23 \pm 0,07$
Sinh khối khô (g/l)	$8,93 \pm 0,11$	$12,75 \pm 0,06$	$14,02 \pm 0,03$	$14,18 \pm 0,09$

Song song với đó, thể tích môi trường nuôi/ thể tích bình được khảo sát cụ thể là 5; 10; 15; 20; 25 và 30 % (v/v) để xác định được điều kiện cung cấp hàm lượng oxy hòa tan, tốc độ thông thoáng cho nấm phát triển và sản xuất các hợp chất thứ cấp có

giá trị kinh tế cao. Từ kết quả (Bảng 3.23) cho thấy % thể tích dịch lên men ảnh hưởng đáng kể tới sự sinh trưởng của nấm, với 5-15% lượng sinh khối tăng dần tuy nhiên khi thể tích 20% thì sinh trưởng của nấm đạt cực đại, khi tăng lượng dịch lên 25%, 30% thì tốc độ sinh trưởng của nấm gần như không thay đổi.

Bảng 3.23. Ảnh hưởng của thể tích môi trường nuôi/thể tích bình đến khả năng sinh trưởng của *Penicillium herquei* HGN12.1R

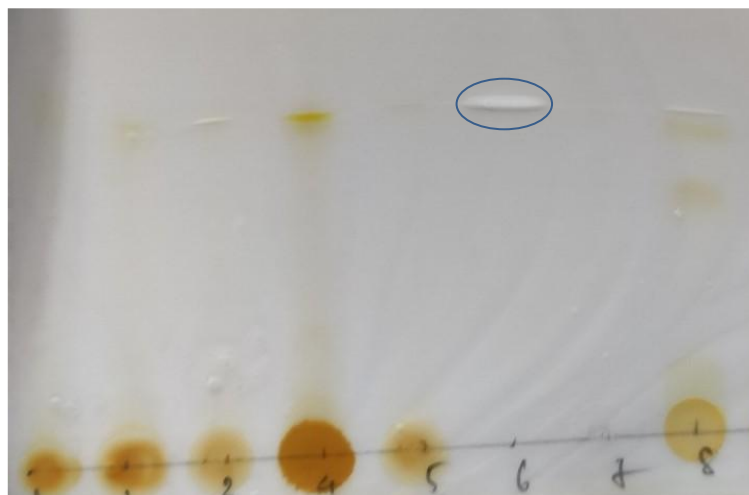
Chỉ tiêu theo dõi	Thể tích môi trường nuôi/ thể tích bình % (v/v)					
	5	10	15	20	25	30
Sinh khối tươi (g/l)	289,37 ± 0,07	309,42 ± 0,10	332,40 ± 0,07	341,23 ± 0,07	346,24 ± 0,02	339,55 ± 0,07
Sinh khối khô (g/l)	7,92 ± 0,05	11,74 ± 0,04	12,02 ± 0,07	14,36 ± 0,08	14,78 ± 0,07	14,48 ± 0,10

3.3.5. Ảnh hưởng nguồn cacbon, nitơ, muối khoáng tới sinh trưởng của *Penicillium herquei* HGN12.1R

Trong nghiên cứu này, sau khi lựa chọn được môi trường lên men ở trên, chúng tôi thay đổi nguồn cacbon (Tinh bột, dextrose, D-maltose, sucrose, mannitol, inositol) và nitơ (Cao nấm men (CNM), Cao thịt, cao thịt bò, pepton, NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), nguồn muối khoáng ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 và KCl) với hàm lượng tương tự và đánh giá sự ảnh hưởng của chúng tới sinh trưởng của hệ sợi nấm. Kết quả được thể hiện ở các bảng sau đây.

Bảng 3.24. Ảnh hưởng của nguồn cacbon tới sinh trưởng của *Penicillium herquei* HGN12.1R

Chỉ tiêu theo dõi	Ảnh hưởng của nguồn cacbon (g/l)					
	Tinh bột	Dextrose	D-maltose	Sucrose	Mannitol	Inositol
Sinh khối tươi (g/l)	302,23 ± 0,05	352,89 ± 0,03	270,17 ± 0,09	280,08 ± 0,13	265,43 ± 0,08	268,15 ± 0,07
Sinh khối khô (g/l)	13,68 ± 0,07	15,45 ± 0,04	12,12 ± 0,11	12,46 ± 0,09	11,89 ± 0,06	11,95 ± 0,12

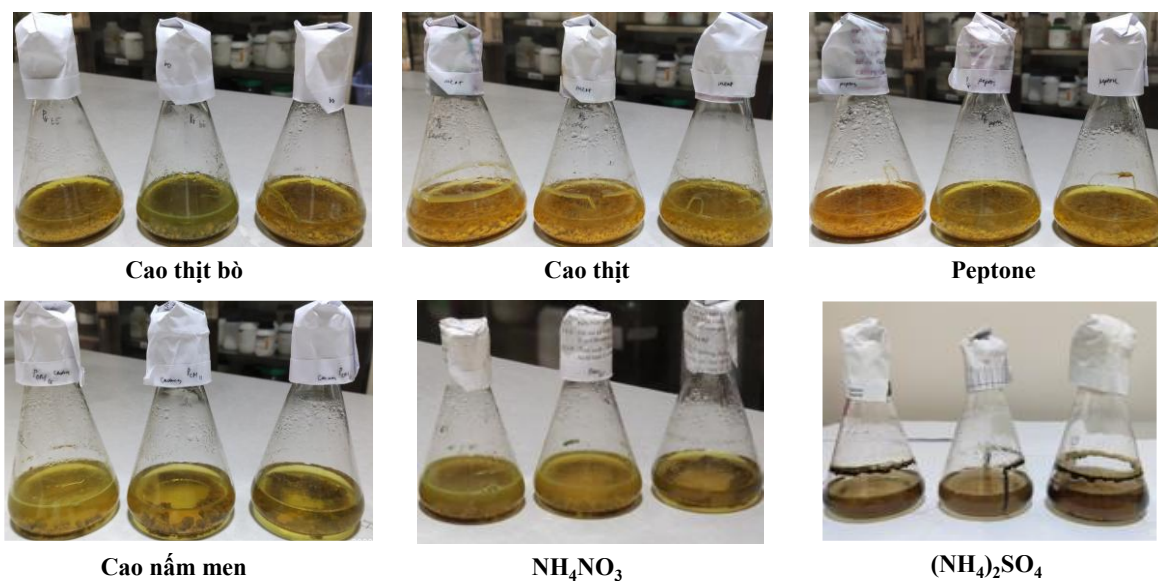


Hình 3.22. Sắc ký lớp mỏng (TLC) của chiết xuất nấm trên các môi trường có nguồn đường khác nhau (Đường số 1: Inositol, đường số 2: Mannitol, đường số 3: Tinh bột tan, đường số 4: Sucrose, đường số 5: D-maltose, đường số 6: Chất chuẩn-PTOX, đường số 7: ĐC (-), đường số 8: Dextrose)

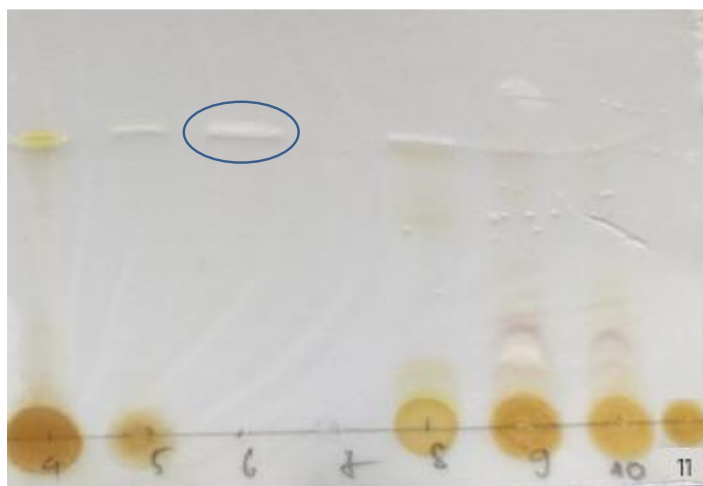
Carbon là một thành phần thiết yếu cấu tạo nên các loại đường như monosaccharide, disaccharide và polysaccharide, đóng vai trò là nguồn năng lượng chính cho sự sinh trưởng của tế bào [153]. Từ Bảng 3.24 cho thấy, chủng nấm lên men tốt trên cả 6 nguồn đường thay thế, tuy nhiên với nguồn đường là dextrose hệ sợi nấm phát triển tốt hơn, sinh khối khô đạt $15,45 \pm 0,04$ g/l cao nhất, sau đó đến tinh bột, 04 nguồn đường còn lại hệ sợi nấm sinh trưởng mỏng hơn và tương đối như nhau. Các kết quả định tính trên bản TLC cũng cho kết quả tương ứng, so với chất chuẩn PTOX ở đường số 6 thì nguồn đường dextrose cho vạch rõ ràng, đậm nét và cùng nhiều sản phẩm phụ có thể là các dẫn xuất của PTOX. Do đó, nguồn dextrose được lựa chọn làm nguồn đường thích hợp nhất cho nấm *Penicillium herquei* HGN12.1R.

Bảng 3.25. Ảnh hưởng của nguồn nitơ tới sinh trưởng của *Penicillium herquei* HGN12.1R

Chỉ tiêu theo dõi	Ảnh hưởng của nguồn nitơ (g/l)					
	CNM	Cao thịt	Cao thịt bò	Pepton	NH ₄ NO ₃	(NH ₄) ₂ SO ₄
Sinh khối tươi (g/l)	223,15 ± 0,05	340,11 ± 0,03	345,05 ± 0,09	305,52 ± 0,10	150,23 ± 0,17	121,49 ± 0,08
Sinh khối khô (g/l)	9,86 ± 0,07	15,21 ± 0,09	15,35 ± 0,05	13,55 ± 0,06	6,95 ± 0,04	5,78 ± 0,10



Hình 3.23. Ảnh hưởng của các nguồn nitơ khác nhau tới sinh trưởng của chủng *Penicillium herquei* HGN12.1R



Hình 3.24. Sắc ký lớp mỏng (TLC) của chiết xuất nấm trên các nguồn nitơ khác nhau (Đường số 4: CNM, đường số 5: Cao thịt, đường số 6: Chất chuẩn-PTOX, đường số 7: ĐC (-), đường số 8: Cao thịt bò, đường số 9: Pepton, đường số 10: NH_4NO_3 , đường số 11: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)

Nitơ đóng vai trò cốt yếu, cung cấp nguyên liệu cho tế bào nấm để tổng hợp các amino acid, protein và chitin- thành phần chính của của thành tế bào sợi nấm. Nấm có khả năng sử dụng đa dạng các nguồn nitơ, bao gồm cả nitơ vô cơ và hữu cơ. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng nguồn nitơ hữu cơ và vô cơ tạo ra sự khác biệt đáng kể trong việc hỗ trợ phát triển của hệ sợi nấm [154]. Đáng chú ý, hầu hết các loài nấm đều tận dụng tốt các nguồn nitơ phức tạp như cao nấm men và peptone (cao chiết xuất từ thịt bò). Peptone được ghi nhận là nguồn nitơ tối ưu cho sinh trưởng của nấm

nhộng trùng hạ thảo [155]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, kết quả cũng cho thấy nguồn nitơ hữu cơ thích hợp với sinh trưởng và sinh tổng hợp Chất/tiền chất PTOX của chủng nấm. Thay thế nguồn CNM bằng 1 trong 3 loại cao thịt, cao thịt bò và pepton đều cho kết quả tốt.

Muối khoáng là một phần quan trọng của tế bào, chiếm khoảng 2-5% khối lượng khô. Chúng tồn tại dưới dạng các muối như sunfat, phosphat, cacbonat, và clorua, nhưng trong tế bào lại chủ yếu ở dạng các ion. Các ion này luôn duy trì một tỷ lệ cân bằng để đảm bảo độ pH và áp suất thẩm thấu ổn định, tạo điều kiện thích hợp cho sự sống của vi sinh vật. Trong nghiên cứu này chúng tôi lựa chọn bổ sung 0,25g/l cho mỗi nguồn khoáng theo [141]

MgSO₄. 7H₂OK₂HPO₄

KCl

Hình 3.25. Ảnh hưởng của nguồn muối khoáng tới sinh trưởng của *Penicillium herquei* HGN12.1R

Bảng 3.26. Ảnh hưởng của nguồn muối khoáng tới sinh trưởng của *Penicillium herquei* HGN12.1R

Chỉ tiêu theo dõi	Ảnh hưởng của nguồn muối khoáng (g/l)		
	MgSO ₄ . 7H ₂ O	K ₂ HPO ₄	KCl
Sinh khối tươi (g/l)	330,16 ± 0,05	287 ± 0,06	273 ± 0,15
Sinh khối khô (g/l)	15,05 ± 0,05	13,66 ± 0,04	12,89 ± 0,08

Từ số liệu trên cho thấy chủng *Penicillium herquei* HGN12.1R thích hợp với nguồn đường dextrose, nguồn nitơ hữu cơ như cao thịt bò (có thể thay thế cao thịt hoặc pepton) và nguồn muối khoáng MgSO₄. 7H₂O.

3.3.6. Ảnh hưởng của tiền chất đến sinh trưởng của các chủng nấm

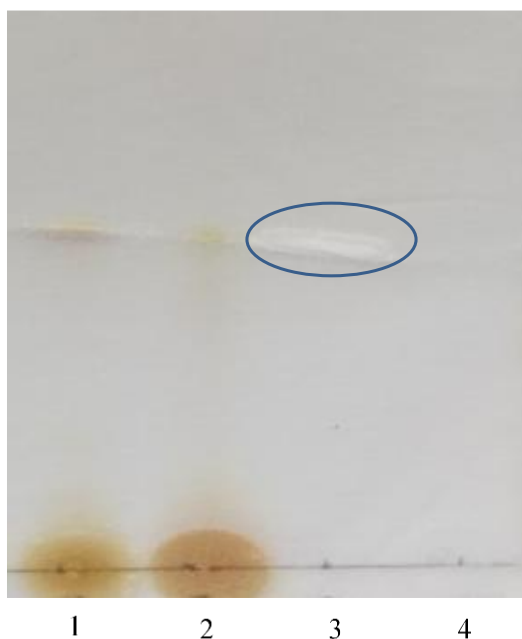
Trong nghiên cứu của [156] đã nghiên cứu ảnh hưởng của tiền chất Phenylalanine và chiết xuất thực vật lên sinh trưởng và sinh tổng hợp PTOX của 1 chủng nấm nội sinh *F. proliferatum* TQN5T. Theo đó hàm lượng PTOX và sinh khối nấm tăng đáng kể so với môi trường lên men ban đầu. Trong nghiên cứu này, chiết

xuất BGL hoặc Phenylalanine được bổ sung với hàm lượng 10 µg/ml sau 3 ngày nuôi cấy nấm. Kết thúc thời gian lên men hàm lượng sinh khối nấm được kiểm tra và xác định sự sản sinh PTOX bằng phương pháp TLC. Kết quả được nêu ở (Bảng 3.27) và (Hình 3.26).

Bảng 3.27. Ảnh hưởng của tiền chất tới sinh trưởng của *Penicillium herquei* HGN12.1R

Chỉ tiêu theo dõi	Ảnh hưởng của tiền chất (µg/ml)	
	Phenylalanine	Chiết xuất BGL
Sinh khối khô (g/l)	14,96 ± 0,05	15,58 ± 0,14
Sinh khối tươi (g/l)	339,31 ± 0,07	356,86 ± 0,09

So sánh tác dụng làm tăng sinh trưởng của 2 tiền chất trên, chúng tôi thấy rằng Cả hai tiền chất đều cho thấy tác dụng tích cực lên tốc độ sinh trưởng của chủng nấm trong quá trình lên men. Mặc dù vậy, chiết xuất BGL vẫn cho hiệu quả hơn. Tuy nhiên, chiết xuất BGL không phải lúc nào cũng sẵn, hơn nữa loài thực vật này hiện đang nằm trong sách đỏ đang cần được bảo tồn. Vì vậy việc bổ sung tiền chất kích thích tăng trưởng và sinh tổng hợp PTOX ưu tiên với lựa chọn Phenylalanine.



Hình 3.26. Sắc ký lớp mỏng (TLC) ảnh hưởng của tiền chất tới lên men chủng *Penicillium herquei* HGN12.1R (Đường số 1: Chiết xuất thực vật, đường số 2: Phenylalanine, đường số 3: Chất chuẩn-PTOX, đường số 4: ĐC (-))

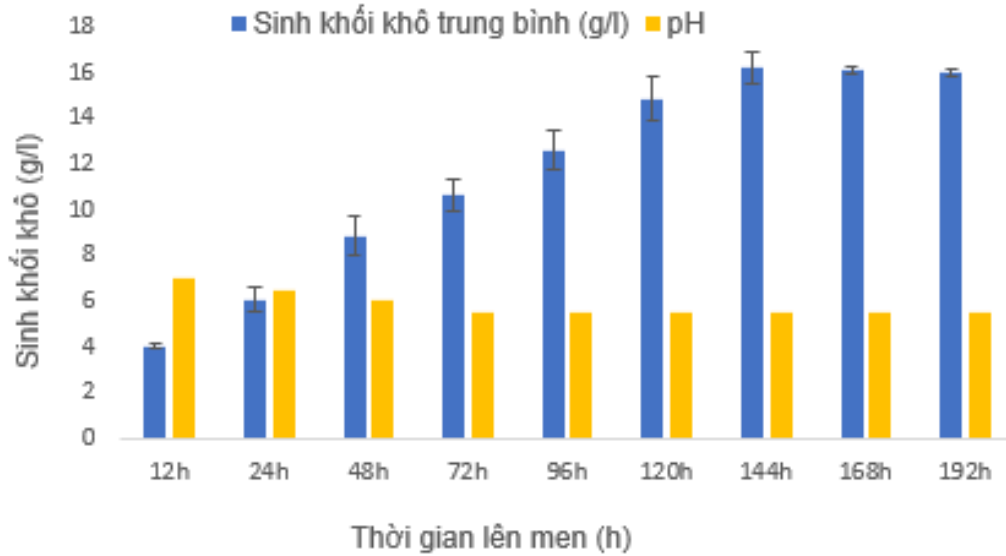
3.4. Lên men, thu hồi, xác định cấu trúc và đánh giá hoạt tính sinh học của các hợp chất từ *Penicillium herquei* HGN12.1R

3.4.1. Động thái quá trình lên men

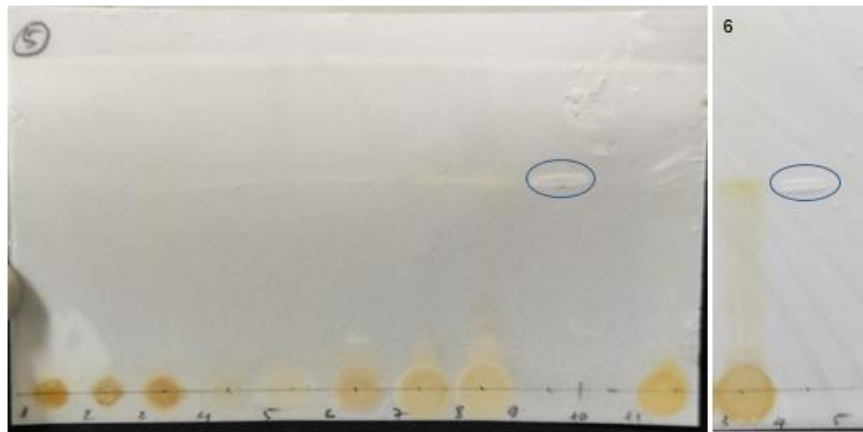
Sau quá trình nhân giống 5% vào môi trường lên men bằng bơm nhu động. Điều kiện lên men ban đầu: pH 7,0; nhiệt độ 25 °C; tốc độ khuấy 120 vòng/phút; tốc độ thổi khí 1vvm. Theo dõi quá trình lên men và xác định các thông số sinh khối tươi, sinh khối khô, sự thay đổi pH và sự sản sinh Chất/tiền chất PTOX. Kết quả cho thấy, sinh khối nấm tăng từ 12h – 120h và đạt đỉnh điểm tại mốc 144h. Phương pháp TLC cho thấy sau 72h lên men chủng nấm bắt đầu sinh PTOX và ở thời điểm 144h-168h sự tích lũy PTOX được cho là tối ưu khi chiết xuất nấm có màu gần tương tự với mẫu chuẩn PTOX, lượng sinh khối ở thời điểm này cũng đạt ngưỡng ổn định, sau 168h sinh khối nấm ổn định và kết quả TLC không cho thấy có sự thay đổi ở 192h. Chỉ số pH của môi trường giảm dần trong 48h đầu và tới 72h đạt pH= 5,5 sau đó duy trì ổn định.

Bảng 3.28. Động thái lên men của chủng *Penicillium herquei* HGN12.1R trên thiết bị lên men 5-10 lít/mẻ.

Thời gian lên men (giờ)	pH	Sinh khối tươi (g/l)	Sinh khối khô (g/l)
12h	7,0	91,09 ± 1,83	4,05 ± 0,12
24h	6,5	130,14 ± 1,47	6,03 ± 0,53
48h	6,0	199,35 ± 1,24	8,85 ± 0,86
72h	5,5	222,27 ± 1,14	10,65 ± 0,73
96h	5,5	284,05 ± 1,64	12,60 ± 0,84
120h	5,5	310,08 ± 1,35	14,80 ± 0,94
144h	5,5	365,36 ± 1,60	16,19 ± 0,73
168h	5,5	366,45 ± 0,54	16,05 ± 0,10
192h	5,5	365,98 ± 1,14	15,99 ± 0,17

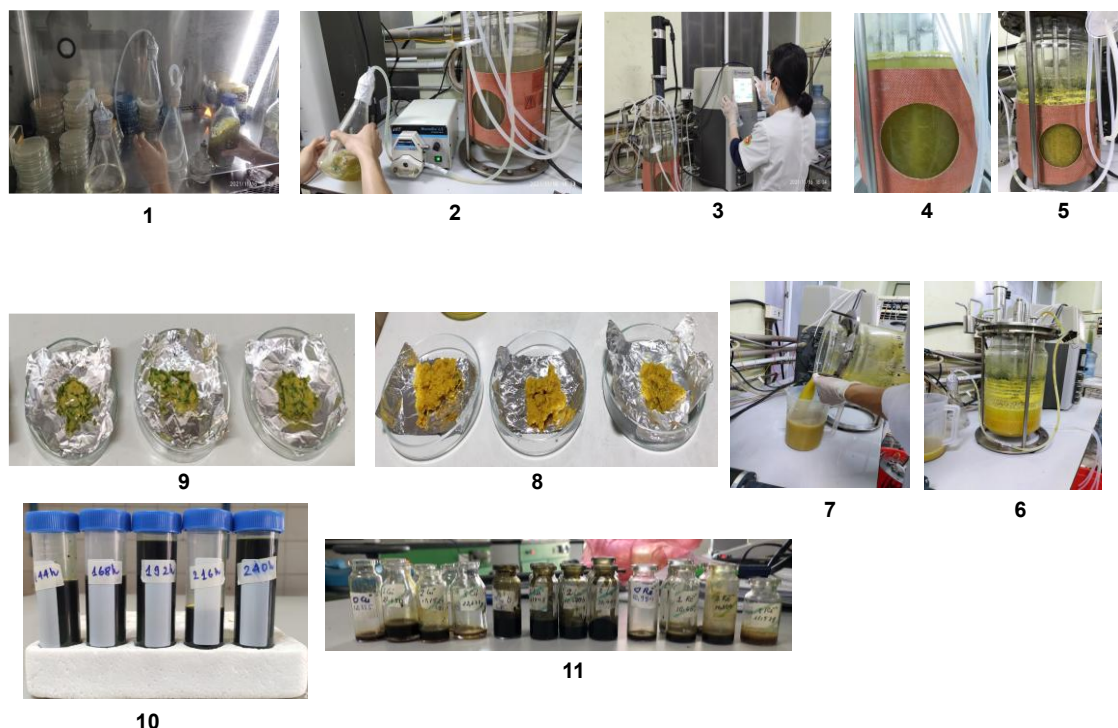


Hình 3.27. Biểu đồ động thái lên men *Penicillium herquei* HGN12.1R



Hình 3.28. Sắc ký lớp mỏng (TLC) của chiết xuất nấm theo thời gian lên men trên hệ thống 5-10 lít/mẻ (Bản 5: đường số 1-8: tương ứng 12h -168h, đường số 9: PTOX, đường số 10: ĐC (-), đường số 11: cao chiết BGL; Bản 6: đường số 3: 192h, đường số 4: PTOX, đường số 5: ĐC (-))

Dựa trên kết quả cho thấy lượng hoạt chất tích lũy tương đương nhau ở thời điểm 144h và 168h, chúng tôi đã quyết định chọn 144h là thời gian lên men tối ưu. Lựa chọn này giúp tiết kiệm đáng kể điện năng, thời gian và công sức lao động mà vẫn đảm bảo hiệu quả sản xuất.

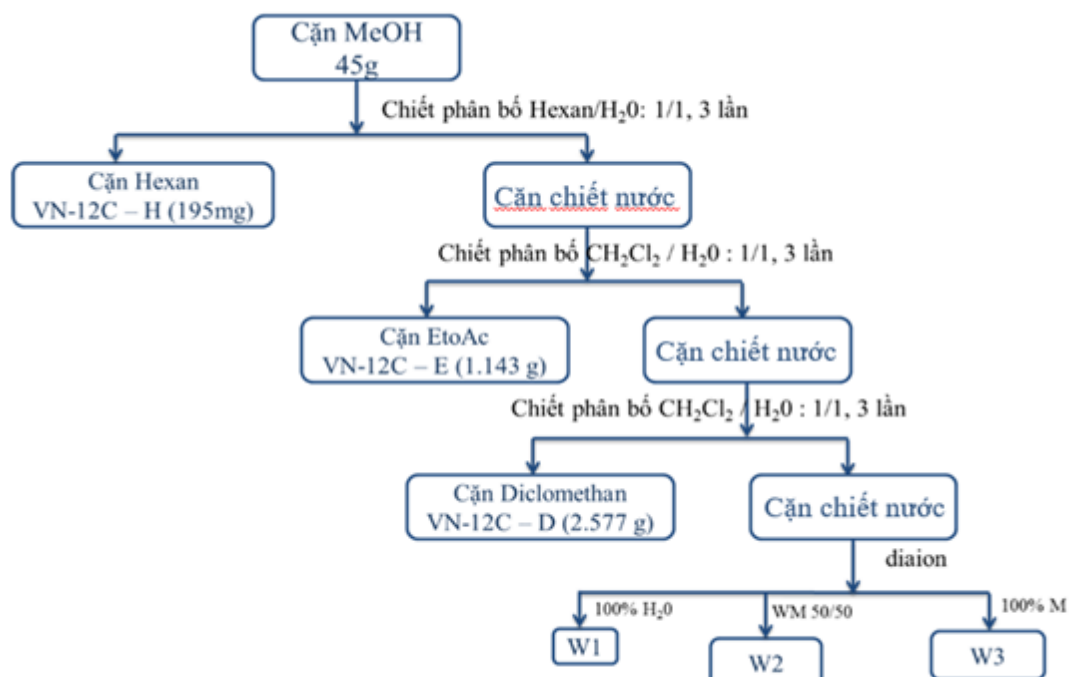


Hình 3.29. Các công đoạn lên men, thu hồi sản phẩm và chiết xuất nấm *Penicillium herquei* HGN12.1R

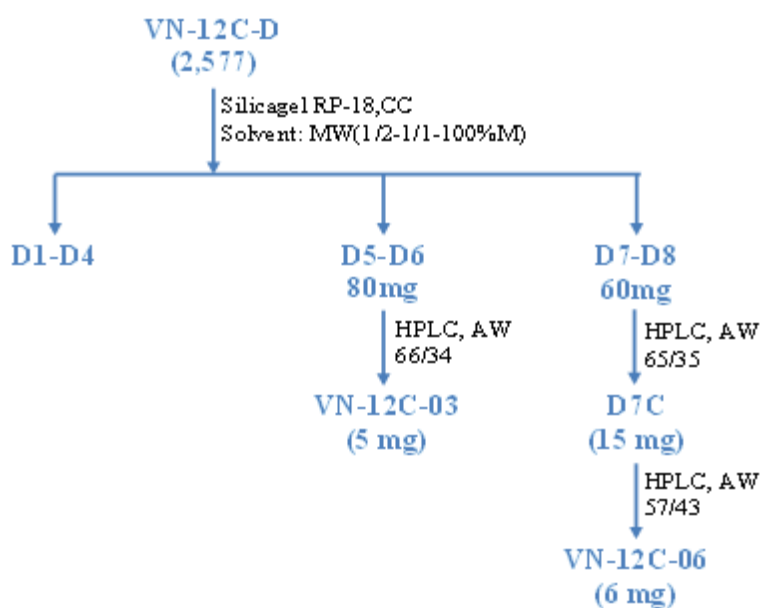
(1: Vào mẫu; 2: Tiếp giống; 3: Điều chỉnh các thông số lên men; 4 và 5: Thời gian lên men 12-24h và 144-168h; 6,7: Thu hồi; 8,9: Sinh khối nấm sấy khô; 10: Chiết methanol; 11: Cao chiết)

3.4.2. Tách chiết, tinh sạch và xác định cấu trúc các hợp chất

Sử dụng 45 g chiết xuất methanol khô từ *Penicillium herquei* HGN12.1R (ký hiệu: VN12C) được phân bố đều trong nước (500 ml) và chiết phân lớp lần lượt với các dung môi hữu cơ n-hexane, ethyl acetate và methylene chloride (3×500 ml cho mỗi dung môi) để thu được các chiết xuất tương ứng (195 mg, 1,143 g và 2,577 g tương ứng) và phần dịch nước (Hình 3.30). Phân đoạn methylene chloride VN-12C - D (2,577 g) được đưa qua cột silica gel pha đảo (ODS-A, YMC) với hệ dung môi rửa giải gradient MeOH-H₂O (1/2, v/v) đến 100% MeOH để thu được tám phân đoạn (ký hiệu: D1 → D8) (Hình 3.31).



Hình 3.30. Sơ đồ chiết phân lớp của mẫu VN-12C



Hình 3.31. Sơ đồ chiết phân lập hợp chất từ phân đoạn VN-12C-D

Các phân đoạn D5 và D6 cho thấy các vết tương tự trên bản TLC và được kết hợp cùng nhau chạy HPLC (Agilent 1260 Infinity II) với hệ dung môi rửa giải đẳng dòng acetonitrile-H₂O (66/34, v/v) thu được hợp chất VN12C - 03 (5 mg).

Các phân đoạn D7 và D8 được kết hợp dựa trên kết quả TLC và được chạy HPLC hệ dung môi rửa giải acetonitrile- H₂O 65/35 (v/v) để thu được phân đoạn D7C. Từ phân đoạn D7C được tiếp tục chạy HPLC hệ dung môi rửa giải acetonitrile- H₂O 57/43 (v/v) để thu được hợp chất VN-12C - 06 (6 mg).

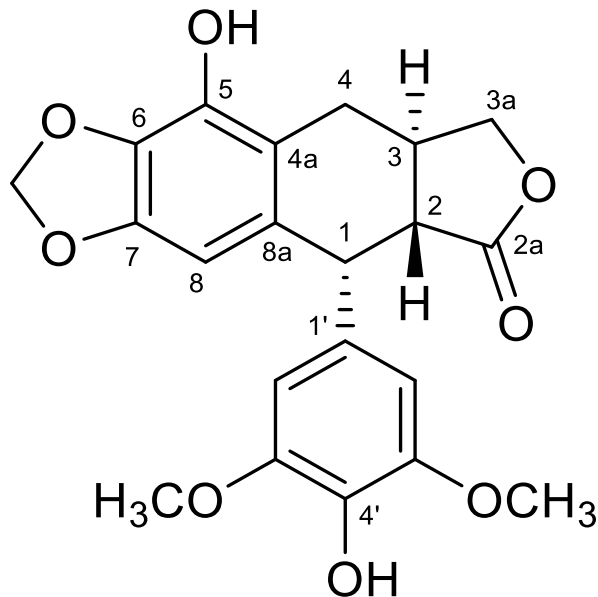
Các hợp chất được đo trên máy quang phổ FT-NMR AVANCE NEO 600 (Bruker, Đức), Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam xác định hợp chất tinh khiết VN-12C-03, VN-12C-06 tương tự như PTOX.

Phân dịch nước được tiến hành sắc ký cột diaion HP-20 thu được 3 phần kí hiệu là W1, W2, W3. Tuy nhiên, sử dụng các phương pháp sắc ký kết hợp như TLC, CC, HPLC đối với các phân đoạn dịch nước cũng như các phân đoạn khác không thu được hợp chất sạch.

3.4.2.1. Xác định cấu trúc phân tử của hợp chất VN-12C-03

Chúng tôi đã phân lập thành công hợp chất VN-12C-03 dưới dạng bột trắng. Để xác định cấu trúc của nó, chúng tôi sử dụng các kỹ thuật phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR), bao gồm ^1H NMR, ^{13}C NMR và các phổ hai chiều như HSQC, HMBC (Hình 1I, 2I, 3I, phụ lục I).

Dựa trên kết quả phân tích phổ và đối chiếu với các tài liệu tham khảo, chúng tôi xác định VN-12C-03 chính là α -Peltatin, một dẫn xuất đã biết của hợp chất mục tiêu PTOX. Hợp chất này có công thức phân tử là $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_8$ và khối lượng phân tử là 400 g/mol.

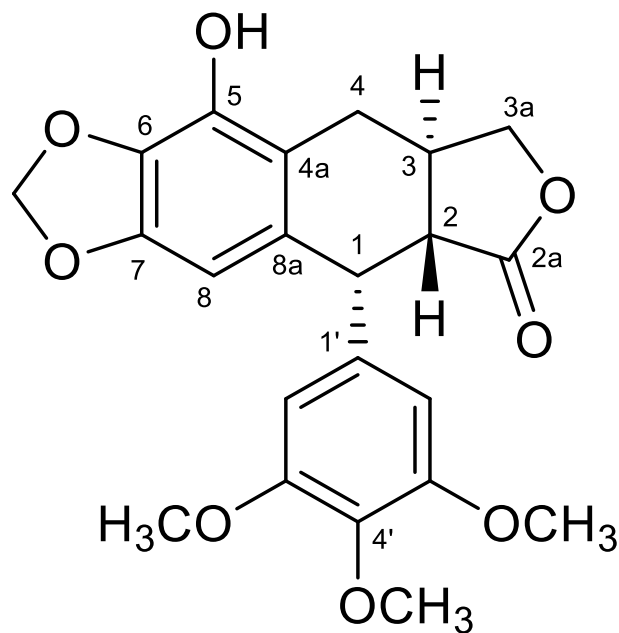


Hình 3.32. Cấu trúc phân tử của hợp chất VN-12C-03

3.4.2.2. Xác định cấu trúc phân tử của hợp chất VN-12C-06

Hợp chất VN-12C-06 được thu nhận dưới dạng bột màu trắng. Để làm sáng tỏ cấu trúc phân tử của nó, chúng tôi đã tiến hành các phân tích phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR), bao gồm phổ ^1H và ^{13}C NMR cùng với các thí nghiệm tương tác 2 chiều như HSQC và HMBC (Hình 4I, 5I, 6I, phụ lục I).

Các dữ liệu phổ này đã được so sánh cẩn thận với phổ của các lignans đã biết, đặc biệt là β -Peltatin. Từ các phân tích sâu và đối chiếu với tài liệu tham khảo, hợp chất VN-12C-06 đã được xác nhận là β -Peltatin, với công thức phân tử $C_{22}H_{22}O_8$ và khối lượng phân tử 414 g/mol. Việc xác định β -Peltatin là quan trọng, bởi hợp chất này cũng là một dẫn xuất của PTOX, một thành phần mục tiêu trong nghiên cứu này.



Hình 3.33. Cấu trúc phân tử của hợp chất VN-12C-06

3.4.3. Đánh giá hoạt tính sinh học của các hợp chất

3.4.3.1. Kết quả đánh giá hoạt tính chống oxy hóa theo phương pháp loại gốc tự do DPPH

Mẫu thử được pha stock trong DMSO ở nồng độ 2 mg/ml. Sau đó được pha thành dải nồng độ thử mẫu như sau: 0,8; 4; 20 và 100 μ g/ml với nước cất khử ion. DPPH pha trong methanol (100%) nồng độ 0,25 μ M. Hút 1ml mẫu nghiên cứu đã pha ở các nồng độ vào ống thủy tinh. Mỗi nồng độ thử chất được lặp lại 3 lần. Thêm 1ml dung dịch DPPH đã chuẩn bị ở trên vào các ống đã có sẵn mẫu nghiên cứu. Ống đối chứng, không có mẫu thử chỉ có 1ml nước và 1ml DPPH. Ủ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Các kết quả về giá trị EC_{50} (nồng độ mẫu thử cần thiết để ức chế 50% gốc tự do DPPH) của các phân đoạn chiết được trình bày ở (Bảng 3.29).

Bảng 3.29. Giá trị EC₅₀ của các chất phân lập từ chủng HGN12.1R

Nồng độ (µg/ml)	% oxi hóa gốc tự do DPPH		
	VN12C.03	VN12C.06	Resvetrol
100	76,98±0.05	69,13±0.07	70,61±0.005
20	70,19±1.05	68,42±0.05	68,96±0.015
4	38,24±0.05	12,61±0.25	67,43±0.025
0,8	14,29±0.35	7,88±0.12	66,60±0.008
EC ₅₀	6,44±0,41	18,75±1,11	0,054±0,006

Khả năng trung hòa gốc tự do DPPH của mẫu thử thể hiện qua việc làm giảm màu DPPH, được xác định bằng phép đo độ hấp thụ quang ở bước sóng 517 nm trên máy đọc ELISA. Thí nghiệm được tiến hành với các nồng độ chất thử thay đổi từ 0,8; 4; 20 và 100 µg/ml. Resvetrol (hợp chất polyphenol) chiết xuất từ quả Nho được sử dụng làm đối chứng cho thí nghiệm. Nhìn chung, đối với tất cả các phân đoạn (VN12C.03, VN12C.06) và Resveratrol, phần trăm ức chế gốc tự do DPPH tăng lên khi nồng độ tăng lên. Điều này là phù hợp với cơ chế hoạt động của các chất chống oxy hóa, khi nồng độ cao hơn sẽ có nhiều phân tử hơn để trung hòa gốc tự do.

3.4.3.2. Kết quả thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào

Kết quả gây độc với dòng tế bào SK-LU-1: Ung thư phổi ở người (human lung carcinoma) được trình bày ở (Bảng 3.30). Bảng trình bày phần trăm ức chế tế bào trung bình (TB) và sai số tương ứng ở các nồng độ khác nhau (20; 4; 0,8; 0,16; 0,032 µg/ml) cho từng mẫu nghiên cứu. Kết quả cho thấy các mẫu nghiên cứu đã thể hiện hoạt tính gây độc tế bào SK-LU-1 với giá trị IC₅₀ từ 0,04 -18,61 µg/mL. Chất đối chứng dương Ellipticine hoạt động ổn định trong thí nghiệm. Nhìn chung, phần trăm ức chế có xu hướng giảm khi nồng độ giảm.

Bảng 3.30. Khả năng gây độc tế bào của mẫu nghiên cứu

Nồng độ (µg/mL)	Cao chiết		Nồng độ (µg/mL)	Ellipticine	
	TB	Sai số		TB	Sai số
20	55,10	1,43	10	95,27	2,14
4	53,46	0,32	2	76,18	1,10
0,8	51,67	1,17	0,4	49,16	1,08
0,16	49,45	0,09	0,08	22,42	0,98
0,032	17,05	1,78			
IC ₅₀	0,21±0,02		IC ₅₀	0,45±0,02	
Nồng độ (µg/ml)	Phần trăm ức chế (%)				
	VN12C-03		VN12C-06		
	TB	Sai số	TB	Sai số	
20	52,25	1,71	54,62	1,32	
4	19,95	0,40	48,51	12,62	
0.8	7,76	1,17	45,69	0,76	
0,16	4,23	0,48	11,41	1,10	
0,032	3,02	0,27	5,15	0,55	
IC ₅₀	18,61±1,10		5,99±0,44		

Chương 4. THẢO LUẬN

4.1. Phân lập, định danh, sàng lọc và nghiên cứu đặc điểm sinh học của chủng nấm nội sinh *Penicillium herquei* HGN12.1R từ cây Bát Giác Liên sản sinh PTOX và các dẫn xuất.

Trong nhiều thập kỷ qua, nấm nội sinh đã trở thành một nguồn tài nguyên hứa hẹn cho việc khám phá các hợp chất có hoạt tính sinh học mới, đặc biệt là các loại thuốc điều trị có nguồn gốc từ thực vật. Khả năng tổng hợp các hợp chất gần giống với các chất chuyển hóa của vật chủ khiến chúng trở thành nguồn nguyên liệu thô quan trọng cho ngành công nghiệp dược phẩm [157], [158]. Do đó, việc nghiên cứu sự đa dạng của các loài nấm liên quan đến cây thuốc là một cách tiếp cận tuyệt vời để khám phá các nguồn vi sinh vật mới có khả năng sản xuất các hợp chất có giá trị y học từ rễ cây *Dysosma difformis* [1], việc khảo sát nấm nội sinh cư trú trong loài thực vật này trở nên đặc biệt quan trọng.

Ở nghiên cứu hiện tại, chúng tôi đã phân lập được 53 chủng nấm nội sinh từ *D. difformis* tại hai địa điểm Hà Giang và Lai Châu. Các chủng này được định danh dựa trên quan sát hình thái và giải trình tự gen rDNA vùng ITS, sau đó xây dựng cây phát sinh loài bằng phần mềm MEGA 7 để mô tả mối quan hệ phân loại.

Kết quả định danh ban đầu đã ghi nhận sự hiện diện của hai chi *Apiiochitrum* và *Ganoderma* thuộc ngành *Basidiomycota* trên cây thân thảo – đây là những phát hiện mới lạ đối với loài thực vật này. Đặc biệt, chúng tôi phân loại *Mucor* sp. vào ngành *Mucoromycota* thay vì *Zygomycota* như mô tả của Tan và cộng sự [13] phù hợp với hệ thống phân loại gần đây nhất đã xếp các loài nấm *Zygomycota* vào các ngành *Zoopagomycota*, *Mucoromycota* và *Glomeromycota* [159]. Kết quả phân tích phát sinh loài đã chứng minh sự thích nghi chuyên biệt của các loài nấm với từng loại mô và môi trường sống. Điều này hoàn toàn nhất quán với nghiên cứu của Gupta và cộng sự, khi họ chỉ ra rằng địa điểm thu thập, kích thước mẫu (đoạn mô cây), và vị trí của nấm nội sinh trong mô thực vật đều là những yếu tố then chốt định hình quần xã nấm nội sinh [160]. Điều thú vị là các chủng *Fusarium* được phân lập trong lá và rễ nằm ở các nhánh khác nhau, điều này có thể đưa ra giả thuyết là do sự thích nghi của vi sinh vật nội sinh với các mô khác nhau. Sự khác biệt trong cấu trúc của cây phát sinh loài giữa hai địa điểm thu thập cũng chỉ ra rằng các môi trường sống khác nhau có thể ảnh hưởng đến sự tiến hóa di truyền và đa dạng của các loài VSV nội sinh sống trong *D. difformis*.

Để có cái nhìn toàn diện về quần xã nấm nội sinh và xác định các nguồn tiềm năng sản sinh hợp chất thứ cấp, việc đánh giá các chỉ số đa dạng sinh học là cần thiết. Các mô hoặc địa điểm có độ đa dạng vi nấm nội sinh cao có thể chứa nhiều loài nấm độc đáo với khả năng sản xuất các hợp chất có giá trị dược liệu [161]. Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra sự đa dạng cao của nấm nội sinh liên quan đến *Catharanthus roseus* với chỉ số đa dạng Shannon và Simpson cũng như chỉ số giàu có Menhinick đối với vỏ cây lần lượt là 1,47; 0,85 và 1,89 [162]. Katoch và cộng sự đã báo cáo các chỉ số đa dạng của quần thể nấm nội sinh được phân lập từ *Monarda citriodora*, cho thấy sự đa dạng cao và sự phong phú về loài trong lá với chỉ số phong phú Shannon, Simpson, Margalef và Menhinick lần lượt là 2,89; 0,944; 5,882 và 4,243 [132].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi cũng đã đánh giá các chỉ số đa dạng sinh học của cộng đồng nấm nội sinh liên quan đến *D. difformis* thông qua bảy chỉ số khác nhau. Kết quả cho thấy tính đa dạng của các chủng phân lập tương tự như quần thể nấm nội sinh trong mô của *D. difformis* ở Hà Giang và Lai Châu. Cụ thể, 27 chủng (50,94%) được phân lập từ rễ, 12 chủng (22,64%) từ thân cây và 14 chủng (26,42%) từ lá. Khi xem xét các chỉ số đa dạng theo mô thực vật, rễ cây cho thấy chỉ số đa dạng Shannon (H) cao nhất (2,673), tiếp theo là lá (2,162) và thân (2,056) được nêu trong Bảng 3.5. Tương tự, chỉ số giàu Margalef (Dmn) cũng cao nhất ở rễ (3,70), lá (3,41) và thân (3,175). So với các nghiên cứu trước đây, kết quả của chúng tôi cho thấy các giá trị cao đối với chỉ số đa dạng Simpson, chỉ số đa dạng Shannon, chỉ số giàu Margalef và chỉ số giàu Menhinick, khẳng định tính đa dạng cao của nấm nội sinh liên quan đến *D. difformis*. Giá trị cao của chỉ số đồng đều Pielou và giá trị thấp của chỉ số thống trị Camargo và chỉ số đa dạng Shannon cho thấy các mô hình khác nhau về tính đặc hiệu mô. Mặc dù chỉ số Simpson chỉ thể hiện sự thống trị của một số loài, chỉ số Shannon được đánh giá cao hơn vì xem xét cả tính phong phú và tính đồng đều của loài [161], [163]. Hệ số tương đồng của Sorensen, với giá trị thấp và giá trị trung bình, biểu thị mức độ tương đồng thấp và trung bình trong thành phần loài đối với các mô và vị trí khác nhau, tương ứng. Những kết quả này ngụ ý rằng: (i) Nội sinh thể hiện sự hấp dẫn khác nhau đối với các mô khác nhau; và (ii) Sự khác biệt ở khu vực thu thập thực vật có thể dẫn đến sự khác biệt trong cộng đồng vi sinh vật. Điều này phù hợp với kết luận của Gupta và cộng sự về ảnh hưởng của vị trí thu thập và vị trí của nấm nội sinh trong mô thực vật đến cộng đồng nấm nội sinh [160]. Đây là báo cáo đầu tiên về sự đa dạng của nấm nội sinh cư trú trên *D. difformis* tại Việt Nam, mang lại giá trị to lớn về đa dạng sinh học và tiềm năng dược liệu từ nguồn gen địa

phương. Nghiên cứu này cung cấp cái nhìn toàn diện hơn về hệ vi sinh vật của cây chủ, khác biệt với các nghiên cứu trước đây vốn chỉ tập trung vào một hoặc hai chủng nấm cụ thể, chẳng hạn như *F. solani* được phân lập từ *Podophyllum hexandrum* sản xuất PTOX tại Ấn Độ bởi Nadeem [14] hay *A. fumigatus* được phân lập từ *Juniperus communis* sản xuất DPTOX tại Đức bởi S. Kusari [15].

Từ đó, chúng tôi tập trung khám phá tiềm năng của các chủng nấm này để sản xuất các hợp chất có hoạt tính sinh học. Cụ thể, chúng tôi đã sàng lọc hoạt tính của chúng với mục tiêu tìm ra chủng ưu việt nhất có khả năng sản sinh PTOX và các hợp chất tương tự cây chủ. Theo Tan và Zou nghiên cứu, từ một cây duy nhất phân lập được hàng trăm loài VNNS và trong số đó, ít nhất một loài thường biểu hiện tính đặc hiệu với vật chủ [38]. Thử nghiệm độc tính tế bào cho thấy hoạt tính mạnh mẽ của sáu chủng phân lập bao gồm *Penicillium* sp. (HGN 12.1R), *Penicillium* sp. (HGN 13.1R), *Trametes* sp., *Purpureocillium* sp., *Aspergillus* sp. và *Ganoderma* sp. chống lại cả ba dòng tế bào ung thư (SK-LU-1, HL-60 và HepG2). Hoạt tính gây độc tế bào trên dòng tế bào SK-LU-1 của 53 chiết xuất nấm được trình bày trong Bảng 3.8, trong đó 28 chiết xuất cho thấy hoạt tính từ 0,036 đến 80,23 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Đặc biệt, chủng HGN12.1R thể hiện hoạt tính gây độc tế bào tương đối mạnh mẽ trên SK-LU-1. Khi thử nghiệm sâu hơn trên HL-60 và HepG2 thì HGN12.1R tiếp tục cho thấy hoạt tính mạnh đồng thời trên HL-60 với IC_{50} là $0,013 \pm 0,004 \mu\text{g}/\text{mL}$ và $0,071 \pm 0,011 \mu\text{g}/\text{mL}$ trên HepG2 được nêu trong Bảng 3.9, điều đó khẳng định độc tính cao của HGN12.1R trên cả ba dòng tế bào ung thư. Nghiên cứu này chưa từng được báo cáo rộng rãi trong các nghiên cứu trước đây về nấm nội sinh, khẳng định tiềm năng lớn trong việc sàng lọc các chủng nấm có độc tính cao đối với tế bào ung thư để nghiên cứu sâu hơn về các hợp chất hoạt tính sinh học và cơ chế hoạt động của chúng. So sánh với các nghiên cứu khác, dịch chiết của chúng tôi cho thấy hoạt tính tương đương hoặc mạnh hơn một số hợp chất/dịch chiết đã được báo cáo: ví dụ, cyclo (L-[4-hydroxyprolinyl]-L-leucine) và cyclo (L-Phe-trans-4-hydroxy-L-Pro) từ *Streptomyces griseus* với IC_{50} lần lượt là 115,7 và $>200 \mu\text{g}/\text{mL}$ trên tế bào HL-60 [164]. Dịch chiết CH_2Cl_2 của *Artemisia turanica* với IC_{50} là $104 \mu\text{g}/\text{mL}$ [165] hoặc dịch chiết methanol của nấm Chaga *Inonotus obliquus* thể hiện độc tính tế bào vừa phải đối với HL-60, LU-1, SW480 và HepG2 với các giá trị lần lượt là $32,2 \mu\text{g}/\text{mL}$, $38,0 \mu\text{g}/\text{mL}$, $41,3 \mu\text{g}/\text{mL}$ và $51,3 \mu\text{g}/\text{mL}$ [166]. Rahaman và cộng sự đã báo cáo hoạt tính gây độc tế bào của 80 loài VNNS phân lập từ cây ngập mặn *Sundarbans* trên tế bào MCF-7 và SK-LU-1, trong đó chỉ có *Talaromyces harzianum* (HFSF-1) có khả năng ức chế sự phát triển

tế bào hiệu quả trên cả hai dòng tế bào ($IC_{50} < 20 \mu\text{g/mL}$). *Talaromyces* sp. và *Aspergillus oryzae* cho thấy tác dụng độc hại đáng kể trên tế bào MCF-7 ($IC_{50} < 20 \mu\text{g/mL}$) trong khi *Penicillium chrysogenum* chỉ cho thấy hoạt tính tốt trên tế bào SK-LU-1 [167].

Để xác nhận sự hiện diện của PTOX trong các chiết xuất nấm có khả năng gây độc tế bào cao, chúng tôi đã tiến hành phân tích bằng sắc ký lớp mỏng (TLC) và sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). Kết quả phân tích TLC cho thấy sự hiện diện của PTOX trong các chiết xuất HGN13R, LCN8T, LCN3T, HGN12.1R, HGN12.2R và HGN13.1R được nêu ở Hình 3.9. Điều này được khẳng định bằng việc so sánh với PTOX chuẩn và môi trường không có nấm (đối chứng âm). Phân tích HPLC-DAD ở Hình 3.10 và Bảng 3.10 cung cấp bằng chứng định tính mạnh mẽ hơn. Trong lần phân tích HPLC đầu tiên, các pic sắc ký của chiết xuất HGN13R (thời gian lưu $R_t = 37,164$ phút), HGN12.2R ($R_t = 37,209$ phút), LCN3T ($R_t = 37,197$ phút) và LCN8T ($R_t = 37,202$ phút) tương ứng với thời gian lưu của chất chuẩn PTOX1 ($R_t = 37,13$ phút). Trong lần phân tích HPLC thứ hai, các chiết xuất từ HGN12.1R ($R_t = 37,359$ phút), HGN13.1R ($R_t = 37,378$ phút) và dịch chiết thực vật ($R_t = 37,353$ phút) cũng có thời gian lưu gần với PTOX2 chuẩn ($R_t = 37,365$ phút). Hơn nữa, quan sát phổ UV của các pic sắc ký HPLC này và so sánh chúng với phổ UV của PTOX chuẩn cho thấy sự trùng khớp, điều này càng củng cố sự hiện diện của PTOX trong dịch chiết nấm. Mặc dù sắc ký đồ và phổ UV của HGN12.1R, HGN13.1R và dịch chiết thực vật thể hiện mô hình tương tự PTOX chuẩn nhưng chưa hoàn toàn rõ ràng, điều này có thể do sự phức tạp của các chất chuyển hóa khác cùng tồn tại trong chiết xuất, mở ra cơ hội tiềm năng để tìm ra nhiều hợp chất thứ cấp quan trọng khác được nêu trong Hình 3.10. Những kết quả này phù hợp với kết quả TLC và khẳng định thêm rằng chiết xuất nấm có chứa PTOX.

Từ các dữ liệu sàng lọc, chủng nấm *Penicillium herquei* HGN12.1R nổi lên như một ứng viên đầy tiềm năng để khai thác các hợp chất có nguồn gốc từ thực vật chủ. Dựa trên hoạt tính gây độc tế bào mạnh mẽ nhất đối với cả ba dòng tế bào ung thư cùng với phổ UV trùng khớp với phổ của hợp chất PTOX chuẩn trong phân tích HPLC, HGN12.1R không chỉ mở ra cơ hội lớn để tìm kiếm các hợp chất thứ cấp khác ngoài PTOX mà còn mang lại giá trị ứng dụng cao.

Nghiên cứu của chúng tôi cũng cố thêm cho những phát hiện trước đây, khi các chi nấm nội sinh như *Aspergillus*, *Penicillium*, và *Trametes* đều được chứng minh

có khả năng sản xuất PTOX. Đáng chú ý, *Penicillium* phân lập từ *Dysosma veitchii* và *Trametes hirsuta* cũng đã được ghi nhận sản xuất hợp chất này [168]. Đáng chú ý, *Penicillium* phân lập từ *Dysosma veitchii* đã được ghi nhận sản xuất hợp chất này [169]. Puri và cộng sự đã phân lập và mô tả đặc điểm của *Trametes hirsuta* có khả năng sản xuất PTOX [49]. Ngoài ra, trong nghiên cứu của chúng tôi lần đầu tiên cho thấy sự hiện diện của PTOX đã được phát hiện trong *Ganoderma* sp., điều này có thể là kết quả của sự cộng sinh với *D. difformis*. Đặc biệt, nghiên cứu này lần đầu tiên ghi nhận sự hiện diện của PTOX trong nấm *Ganoderma* sp., có thể là kết quả của mối quan hệ cộng sinh với *D. difformis*. Đây là một phát hiện quan trọng, vì *Ganoderma lucidum* (nấm Linh chi) vốn là một loại nấm dược liệu nổi tiếng đã được sử dụng để điều trị nhiều bệnh khác nhau như ung thư và tiểu đường [170], [171], khả năng sản xuất PTOX của nó sẽ mở ra một tiềm năng ứng dụng mới. Tương tự, đây cũng là báo cáo đầu tiên về khả năng sản xuất PTOX ở *Purpureocillium lilacinum*, một loài nấm đã được nghiên cứu kỹ lưỡng về hoạt tính sinh học và thành phần hóa học [172] nhưng chưa từng ghi nhận khả năng này.

Tóm lại, những kết quả này đã củng cố mạnh mẽ giả thuyết cho rằng nấm nội sinh có thể sản xuất các hợp chất có nguồn gốc từ thực vật chủ. Các nghiên cứu sâu hơn về định lượng PTOX và các gen liên quan đến quá trình sinh tổng hợp hợp chất này ở nấm nội sinh sẽ giúp mở đường cho việc sản xuất PTOX ở quy mô lớn, tạo ra những ứng dụng tiềm năng trong y học và dược phẩm.

Nghiên cứu đặc điểm sinh học của *Penicillium herquei* HGN12.1R cho thấy, về đặc điểm hình thái đại thể có khuẩn lạc màu xanh rêu, tròn đều, đường kính 6-8 mm, bề mặt sợi khuẩn tơ mịn như bụi phấn. Ở cấp độ vi thể, quan sát cho thấy bào tử được sản xuất với số lượng lớn tạo thành cấu trúc chổi đặc trưng của chi *Penicillium*, bào tử hình bầu dục, phân nhánh nhiều) được nêu trong Bảng 3.11, các đặc điểm này cũng phù hợp với mô tả về chi *Penicillium* [127], [126]. Để xác nhận định danh này, trình tự rDNA của vùng ITS đã được giải trình tự và so sánh với cơ sở dữ liệu gen. Kết quả cho thấy chủng nấm này có độ tương đồng cao (99,80%) với trình tự gen của *Penicillium herquei* culture BCC (mã số MF537646.1), từ đó khẳng định việc định danh là *Penicillium herquei* HGN12.1R (Bảng 1C, phụ lục C). Phát hiện này đặc biệt có ý nghĩa khi xét đến tiềm năng sinh học của chi *Penicillium*. Các nghiên cứu trước đây đã chứng minh chi này là một nguồn sản xuất PTOX và nhiều hợp chất chuyển

hóa thứ cấp có cấu trúc mới cùng hoạt tính sinh học đã được phân lập từ các chủng nấm thuộc chi này [173].

Nghiên cứu về ảnh hưởng của nhiệt độ và pH đến khả năng sinh trưởng của chủng *Penicillium herquei* HGN12.1R cho thấy những đặc điểm sinh lý quan trọng được nêu trong Bảng 3.12. Hệ sợi nấm sinh trưởng tốt nhất ở nhiệt độ 25 °C, đạt $0,87 \pm 0,07$ g SKK/100 ml. Mật độ nấm giảm đáng kể khi nhiệt độ tăng lên 35 °C và 37 °C, tại đó nấm không phát triển. Điều này chỉ ra rằng 25 °C là nhiệt độ tối ưu cho sự phát triển của chủng. Về ảnh hưởng của pH, chủng *P. herquei* HGN12.1R có khả năng sinh trưởng ở tất cả 6 thang pH thử nghiệm. Tốc độ sinh trưởng hệ sợi nấm cao nhất ở pH 6 ($0,79 \pm 0,02$ g SKK/100 ml) và pH 7 ($0,75 \pm 0,04$ g SKK/100 ml). Tốc độ sinh trưởng chậm nhất được ghi nhận ở pH 4 ($0,16 \pm 0,04$ g SKK/100 ml). Kết quả cho thấy chủng nấm sinh trưởng tốt ở môi trường pH trung bình và hơi kiềm, sinh trưởng chậm lại khi môi trường có tính axit tăng, điều này cũng cho thấy nấm tồn tại được ở hầu hết các vùng thổ nhưỡng khác nhau tại Việt Nam.

Khảo sát hoạt tính enzyme ngoại bào của chủng *P. herquei* HGN12.1R cho thấy khả năng phân giải chitin và cellulose. Vòng phân giải trung bình đối với chitinase là $6,3 \pm 0,08$ mm và đối với cellulase là $8,5 \pm 0,05$ mm (Bảng 3.12). Hoạt tính của các enzyme này gợi ý về vai trò của chủng nấm trong việc phân giải các thành phần cấu trúc của thực vật (ví dụ: chitin trong thành tế bào nấm hoặc côn trùng, cellulose trong thành tế bào thực vật), từ đó hỗ trợ quá trình xâm nhiễm và thiết lập mối quan hệ nội sinh với vật chủ. Hoạt tính enzyme ngoại bào cũng có thể đóng vai trò trong việc cạnh tranh sinh học hoặc thích nghi với môi trường sống.

Về hoạt tính kháng khuẩn, chiết xuất methanol của chủng *Penicillium herquei* HGN12.1R được khảo sát bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch đối với các chủng vi khuẩn Gram âm (*Escherichia coli* DH5, *Enterobacter* 14RM7-1) và Gram dương (*Staphylococcus* sp., *Bacillus* 7TM11, *Bacillus* 2TM6). Kết quả cho thấy chiết xuất HGN12.1R có hoạt tính kháng khuẩn rõ rệt trên các chủng Gram dương như *Bacillus* 7TM11 (đường kính vòng ức chế $14,33 \pm 0,58$ mm) và *Bacillus* 2TM6 ($12,37 \pm 0,6$ mm). Đối với vi khuẩn Gram âm, hoạt tính ức chế cũng được ghi nhận trên *Enterobacter* 14RM7-1 ($12,83 \pm 0,76$ mm), trong khi hoạt tính trên *Staphylococcus* sp. ($10,67 \pm 0,58$ mm) và *Escherichia coli* DH5 ($2,33 \pm 0,29$ mm) giảm dần hoặc rất ít. Điều này chỉ ra rằng chiết xuất nấm nội sinh HGN12.1R từ *Dysosma difformis* có khả năng ức chế cả vi khuẩn Gram âm và Gram dương, nhưng với mức độ khác nhau,

phù hợp với nhận định về sự khác biệt cấu trúc tế bào của vi khuẩn Gram dương so với vi khuẩn Gram âm ảnh hưởng đến độ nhạy với kháng sinh [174]. Khi so sánh với kháng sinh đối chứng Cefotaxime, hoạt tính của HGN12.1R thấp hơn đáng kể trên *Bacillus* 7TM11 ($33,13 \pm 0,24$ mm) và *Enterobacter* 14RM7-1 ($26,33 \pm 0,29$ mm), nhưng vẫn thể hiện tiềm năng. Các nghiên cứu trước đây cũng đã báo cáo hoạt tính kháng khuẩn của nấm nội sinh: *A. fumigatus* sản xuất deoxypodophyllotoxin và có hoạt tính kháng khuẩn [15], [133]. Shobha và nhóm nghiên cứu đã xác định dịch chiết của *F. oxysporum* và *Aspergillus* spp. thể hiện hoạt tính kháng khuẩn đầy hứa hẹn với vùng ức chế *Bacillus cereus* tương ứng với 1,2 cm và 0,8 cm [175]. Như vậy *Penicillium herquei* HGN12.1R sở hữu cả hai hoạt tính chống ung thư và kháng khuẩn, kết quả cho thấy sự tương đồng với các nghiên cứu khác khi một chủng nấm có thể sở hữu cả hai đặc tính này, ví dụ như nấm nội sinh *Dysosma versipellis* [13]. Những kết quả nhận được mở ra hướng nghiên cứu sàng lọc các phân tử có hoạt tính sinh học mới. Điều này ủng hộ mạnh mẽ giả thuyết về sự tương tác sinh lý, dinh dưỡng và di truyền giữa cộng đồng nội sinh vật và vật chủ [111], cho thấy sự đồng tiến hóa giữa thực vật và nấm nội sinh của chúng. Điều này có thể bao gồm việc trao đổi vật liệu di truyền thông qua chuyển gen ngang và chia sẻ các con đường tổng hợp chất chuyển hóa thứ cấp [110]. Khám phá này ủng hộ giả thuyết rằng nấm nội sinh và cây ký chủ trải qua quá trình cộng sinh lâu dài chia sẻ con đường trao đổi chất, dẫn đến khả năng vi sinh vật tạo ra các hợp chất tương tự như cây ký chủ và một trong những ưu điểm của việc sản xuất các hợp chất tự nhiên từ vi sinh vật là chúng có thể dễ dàng được sản xuất trên quy mô lớn trong môi trường lên men nhân tạo [176].

4.2. Nghiên cứu đặc điểm và chú giải hệ gen của chủng nấm nội sinh *Penicillium herquei* HGN12.1R

Trong các hệ sinh thái tự nhiên, vi sinh vật nội sinh và vật chủ của chúng cùng tồn tại trong các mối quan hệ di truyền và sinh thái phức tạp. Các nghiên cứu trước đây đã mô tả các con đường sinh tổng hợp của PTOX và xác định các gen và protein liên quan đến quá trình này ở thực vật [149], [177]. Các nghiên cứu khác báo cáo rằng, ở *Podophyllum hexandrum*, ít nhất tám gen (DIR, PLR, SDH, CYP719A13, OMT3, CYP71CU1, OMT1 và 2-ODD) được cho là đóng vai trò quan trọng trong việc chuyển đổi coniferyl alcohol thành deoxypodophyllotoxin và etoposide của nó [86], [178]. Tuy nhiên, các cơ chế sinh hóa và phân tử chi phối quá trình sản xuất

PTOX của nấm vẫn chưa được khám phá nhiều, đặc biệt là đối với vi nấm nội sinh như *Penicillium herquei*. Gần đây, nhiều công cụ và phương pháp khác nhau đã được sử dụng để xác định, chú thích và so sánh bộ gen vi sinh vật, chẳng hạn như phân tích trình tự khoảng cách phiên mã nội bộ (ITS), giải trình tự bộ gen, hệ gen so sánh, mảng vi mô, giải trình tự thế hệ tiếp theo, metagenomics và metatranscriptomics [179], [180]. Các công cụ này cho phép phát hiện bộ gen nấm cũng như hiểu được mối liên hệ chặt chẽ giữa nấm nội sinh và vật chủ của chúng. Nhìn chung, các lignans chủ yếu được tìm thấy trong thực vật bao gồm deoxypodophyllotoxin, yatein, PTOX, nemerosin, guayadequiol, matairesinol, peltatin và podophyllotoxone [181].

Penicillium herquei, một thành viên của chi *Penicillium*, được biết đến với khả năng sản xuất đa dạng các chất chuyển hóa thứ cấp như dẫn xuất phenalenone, polyene mạch dài, dẫn xuất acetaminophen và dẫn xuất triene phenalenone [94], [95], [96] [97], [98]. Tuy nhiên, có rất ít nghiên cứu tập trung vào giải trình tự bộ gen, khai thác và tìm kiếm các gen liên quan đến quá trình sinh tổng hợp các hợp chất hoạt tính sinh học ở *Penicillium herquei*. Nghiên cứu của chúng tôi là một trong số ít nghiên cứu đã giải trình tự và chú thích toàn bộ bộ gen của chủng *Penicillium herquei* HGN12.1R thuộc chi *Penicillium* với chất lượng cao. Trình tự hệ gen của chủng HGN12.1R được giải toàn bộ và đọc trình tự đoạn dài trên hệ máy PacBio Sequel ở độ sâu bao phủ là 195,0×. Sau khi tập hợp dữ liệu giải trình tự denovo, chúng tôi đã xác định được toàn bộ bộ gen của *Penicillium herquei* HGN12.1R với kích thước xấp xỉ 34,96 Mb với hàm lượng GC là 46,38%. Kích thước này lớn hơn so với các chủng được báo cáo khác trong cùng chi *Penicillium*, chẳng hạn như *P. chrysogenum* KF-25 (29,92 Mb) [182], *P. chrysogenum* NCPC10086 (32,2 Mb) [183], *Penicillium chrysogenum* HKF-25 (31,48 Mb) [184], *P. oxalicum* I1R1 (30,8 Mb) [105]. Theo tìm hiểu của chúng tôi, chỉ có một bộ gen của loài *P. herquei* (40,24 Mb) [185] đã được lắp ráp và chú thích và bộ gen này lớn hơn bộ gen của chúng tôi. Sự khác biệt về kích thước bộ gen này có thể là do sự khác biệt trong công nghệ giải trình tự, ảnh hưởng lớn đến kích thước bộ gen và số lượng contig được tạo ra sau khi lắp ráp [186]. Hệ gen của chủng HGN12.1R đã được lắp ráp với độ hoàn chỉnh đạt 98,3%, với 12.871 gen dự đoán. Tổng số 7.401 gen đã được chú giải chức năng thông qua các cơ sở dữ liệu như RefSeq, Uniprot, Gene Ontology và Pfam. Chúng tôi đã tìm thấy hệ gen HGN12.1R chứa 1 gen tương đồng với PLR (26,7% tương đồng) và 91 gen tương đồng với SDH (23,7-35,6% tương đồng). Sự hiện diện của các gen này cung cấp bằng chứng di truyền thuyết phục, cho thấy nấm có khả năng thực hiện các phản ứng khử

và oxy hóa quan trọng để chuyển hóa pinoresinol thành các tiền chất như secoisolariciresinol và matairesinol, từ đó tạo ra PTOX. Sự khác biệt này có thể là do sự khác biệt trong quá trình sinh tổng hợp PTOX giữa thực vật và nấm. Cũng có thể có các bước chuyển hóa trung gian chưa được xác định trong con đường sinh tổng hợp của nấm vẫn chưa được làm sáng tỏ. Chúng tôi tìm thấy 10 gen tương đồng với OMT1, 4 gen với OMT3 và 79 gen với CYP82D61. Sự đa dạng về số lượng gen này cho thấy nấm có khả năng thực hiện nhiều phản ứng hydroxyl hóa và methyl hóa, từ đó tạo ra nhiều sản phẩm trung gian và các dẫn xuất khác nhau của PTOX. Hệ gen này có đầy đủ các gen cần thiết cho quá trình sinh tổng hợp protein và có thể được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo về sinh học phân tử và ứng dụng công nghệ sinh học. Hệ gen chủng *P. herquei* HGN12.1R đã được ký gửi tại GenBank mã số GCA_039634405.1.

Để chú giải hệ gen, biểu đồ Venn (Hình 3.14) là một công cụ trực quan mạnh mẽ, cho phép chúng ta đánh giá mức độ tin cậy và sự đa dạng của các chú giải bằng cách so sánh kết quả từ nhiều cơ sở dữ liệu khác nhau RefSeq Nonredundant (Nr), Uniprot, Gene Ontology, Pfam và KEGG. Tổng số gen được chú giải duy nhất là 7401 gen, chiếm một tỷ lệ đáng kể trong tổng số 12.871 gen dự đoán của chủng *Penicillium herquei* HGN12.1R. Phân tích sự chồng lấn giữa các vòng tròn trong biểu đồ Venn cho thấy các vùng giao thoa thể hiện mức độ tin cậy của chú giải. Một gen được chú giải bởi nhiều cơ sở dữ liệu sẽ có độ tin cậy cao hơn. Vùng giao thoa giữa RefSeq và Uniprot với số lượng gen được chú giải là 2474, cho thấy một lượng lớn gen có chuỗi protein được xác nhận trong cả hai cơ sở dữ liệu chính này, củng cố thêm tính chính xác trong việc xác định danh tính của gen. Vùng giao thoa giữa RefSeq và Pfam có 1789 gen nằm trong vùng giao thoa này. Điều này có nghĩa là các gen này không chỉ có chuỗi protein được xác định mà còn chứa các domain chức năng đã biết. Vùng giao thoa giữa RefSeq, Uniprot và Pfam với 1467 gen được chú giải bởi cả ba cơ sở dữ liệu này. Đây là những gen có chú giải có độ tin cậy cao nhất, với thông tin về chuỗi, domain chức năng và danh tính được xác nhận từ nhiều nguồn.

Các gen chỉ được chú giải bởi một cơ sở dữ liệu như KEGG với 9.491 gen, điều này cho thấy nấm *P. herquei* HGN12.1R có nhiều gen tham gia vào các con đường trao đổi chất nhưng chuỗi protein hoặc domain của chúng có thể chưa được nghiên cứu rộng rãi hoặc có tính độc đáo. Hay như Pfam, số lượng lớn gen được chú giải cũng rất đáng chú ý. Điều này chỉ ra rằng nhiều gen của nấm có các domain chức

năng đã biết nhưng chuỗi protein tổng thể của chúng có thể không có sự tương đồng cao với các protein hoàn chỉnh đã được chú thích trong Uniprot hay RefSeq. Như vậy biểu đồ Venn không chỉ là một hình ảnh đơn thuần mà là bằng chứng cho thấy quá trình chú giải hệ gen của *P. herquei* HGN12.1R đã được thực hiện một cách toàn diện và chặt chẽ. Các vùng giao thoa cung cấp các chú giải có độ tin cậy cao, trong khi các vùng không giao thoa cho thấy sự đa dạng của các gen, từ các gen có chức năng đã được xác định rõ ràng đến các gen tham gia vào các con đường trao đổi chất đặc trưng của nấm. Kết quả này là nền tảng vững chắc để tiếp tục phân tích sâu hơn về các gen liên quan đến sinh tổng hợp PTOX.

Cho đến nay, bức tranh tổng thể về con đường sinh tổng hợp PTOX ở thực vật vẫn chưa được làm sáng tỏ một cách toàn diện. Tuy nhiên, một số bước quan trọng đã được xác định, trong đó hầu hết các tác giả tập trung vào việc khám phá các gen và enzyme chịu trách nhiệm chuyển đổi phenylalanine thành deoxypodophyllotoxin và dẫn xuất của nó [86], [177], [187]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã nhận ra 10 gen tiềm năng trong bộ gen HGN12.1R, liên quan đến quá trình sản xuất PTOX từ rượu coniferyl bằng cách chú thích và giải trình tự bộ gen nấm được nêu trong Bảng 3.16.

Trong giai đoạn đầu của quá trình sinh tổng hợp PTOX, các protein dẫn hướng (DIR) đóng vai trò chủ chốt trong việc chỉ đạo quá trình hình thành pinoresinol có chọn lọc theo vùng và lập thể từ hai phân tử archiral của rượu coniferyl [188], [189]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, protein thực vật DIR không được tìm thấy trong bộ gen HGN12.1R. Thay vào đó, chúng tôi đã phát hiện ra một loại protein khác, VdtD, có vẻ như có chức năng tương tự như DIR ở thực vật. Một nghiên cứu đã chỉ ra VdtD hoạt động như một protein chỉ thị để thúc đẩy khả năng chọn lọc lập thể ghép nối [190]. Việc phát hiện ra protein VdtD từ bộ gen HGN12.1R có thể cung cấp những hiểu biết mới về con đường tổng hợp PTOX ở nấm, cho thấy sự khác biệt đáng kể so với các con đường thực vật (Hình 3.15).

Trong các bước tiếp theo (Hình 3.16), pinoresinol trải qua quá trình chuyển đổi hai bước thành matairesinol. Đầu tiên, pinoresinol được chuyển đổi thành lariciresinol và secoisolariciresinol bởi PLR. Sau đó, SDH oxy hóa secoisolariciresinol thành matairesinol. Quá trình này đã được quan sát thấy ở nhiều loài thực vật, bao gồm *Forsythia intermedia*, *Podophyllum peltatum*, *Linum corymbulosum*, *Sinopodophyllum hexandrum* và *Isatis indigotica* [86], [191], [192].

Phân tích phiên mã đã làm sáng tỏ những khác biệt đáng kể trong quá trình sinh tổng hợp PTOX giữa thực vật và nấm, được thể hiện qua sự phân bố các gen đồng đẳng PLR và SDH. Trong khi các loài thực vật như *Schisandra chinensis* biểu hiện 4 gen PLR và 11 gen SDH, và *Anthriscus sylvestris* có 14 gen PLR và 8 gen SDH, thì chủng nấm HGN12.1R lại cho thấy một sự khác biệt rõ rệt. Cụ thể, số lượng gen SDH chiếm ưu thế với 91 gen được xác định, trong khi các gen PLR chỉ có một gen đơn có giá trị $E < e^{-10}$. Sự khác biệt này có thể là do những con đường sinh tổng hợp PTOX khác nhau giữa hai giới hoặc do sự tồn tại của các bước chuyển hóa trung gian chưa được làm sáng tỏ ở nấm.

Tương tự, các enzyme thuộc họ Cytochrome P450 (CYP) cũng đóng vai trò quan trọng trong quá trình này. Ở thực vật, CYP719A23 và CYP719A24 chịu trách nhiệm hình thành cầu nối methylenedioxy trong quá trình chuyển hóa từ matairesinol sang pluviatolide. Các enzyme như OMT3, CYP71CU1, CYP71BE54, CYP82D61, OMT1 và 2-ODD sau đó xúc tác quá trình chuyển đổi pluviatolide thành các hợp chất khác [86]. Trong chủng HGN12.1R, bốn enzyme thuộc họ CYP đã được xác định có mật độ cao nhất. Enzyme 2-ODD, có thể đóng vai trò quan trọng trong việc chuyển đổi yatein thành deoxypodophyllotoxin, tiền chất của α -peltatin và β -peltatin. Phát hiện này được củng cố bởi kết quả phân tích NMR, đã xác nhận sự hiện diện của α -peltatin và β -peltatin trong dịch chiết của nấm HGN12.1R, làm cho nghiên cứu này trở thành một trong số ít những công trình xác nhận bằng thực nghiệm cấu trúc hóa học của các hợp chất này trong nấm. Điều này cho thấy sự tương đồng về cấu trúc giữa các hợp chất được tìm thấy ở nấm và thực vật, từ đó mở ra tiềm năng lớn cho việc khai thác nấm trong sản xuất các hợp chất có giá trị này.

4.3. Xác định điều kiện thích hợp cho quá trình lên men, tách chiết, tinh sạch và xác định cấu trúc các hợp chất từ *Penicillium herquei* HGN12.1R

Quá trình lên men để thu nhận PTOX và các dẫn xuất từ vi nấm nội sinh bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố như thời gian, pH môi trường, nhiệt độ, nguồn carbon và nitơ. Việc xác định chu trình lên men tối ưu cho từng chủng vi sinh vật là vô cùng cần thiết để đạt được lượng sản phẩm chuyển hóa tối đa, bởi lẽ mỗi chủng có giai đoạn phát triển và sản sinh chất chuyển hóa riêng biệt. Điểm chung của hầu hết các chủng vi sinh vật là chúng thường sản sinh các hợp chất chuyển hóa thứ cấp vào giữa và cuối pha cân bằng của chu trình lên men.

4.3.1. Xác định điều kiện lên men thích hợp

Công nghệ lên men sử dụng VNNS được coi là cách tiếp cận tiềm năng để sản xuất các hợp chất dược phẩm như PTOX. Các nghiên cứu cũng đã chứng minh nhiều nhóm gen liên quan đến quá trình sinh tổng hợp các hoạt chất sinh học không hoạt động hoặc chưa được biểu hiện khi chủng vi nấm được nuôi cấy dưới điều kiện thí nghiệm [193]. Vì vậy, cần có những khảo sát cụ thể các yếu tố tác động đến quá trình lên men chủng *Penicillium herquei* HGN12.1R để thu nhận hoạt tính sinh học và hiệu suất lên men cao nhất. Trong nghiên cứu của chúng tôi, chủng HGN12.1R phát triển tốt nhất trên môi trường PDA với nguồn đường dextrose và cho hàm lượng sinh khối khô cao nhất $14,09 \pm 0,06$ g/l, dextrose (glucose) có vai trò then chốt là nguồn cung cấp carbon và năng lượng chính, thúc đẩy quá trình chuyển hóa để tạo ra các tiền chất như phosphoenolpyruvate (PEP) và erythrose-4-phosphate (E4P). Hai hợp chất này là điểm khởi đầu của con đường shikimate, dẫn đến việc tổng hợp phenylalanine – tiền chất khởi đầu của con đường phenylpropanoid, con đường sinh tổng hợp chính cho các ligand như PTOX. Nghiên cứu trước đây đã chỉ ra dinh dưỡng là nhân tố quan trọng ảnh hưởng đến toàn bộ quá trình sinh trưởng của giống nấm [194].

Thời gian lên men thích hợp của mỗi chủng VSV là khác nhau để sản sinh các hợp chất chuyển hóa thứ cấp, tuy nhiên phần lớn các quá trình đều diễn ra ở thời điểm giữa hoặc cuối pha cân bằng [195]. Chủng *Penicillium herquei* HGN12.1R có xu hướng tăng trưởng cả SKT và SKK trong khoảng thời gian từ 24 giờ đến 60 giờ. Sau 60 giờ, cả SKT và SKK đều bắt đầu giảm, cho thấy nấm đã bước vào giai đoạn suy giảm. Mật độ ban đầu thấp có thể dẫn đến kéo dài pha sinh trưởng log, trong khi đó nếu mật độ tế bào ban đầu cao hơn có thể nhanh chóng dẫn đến pha tử vong [121].

Kết hợp phân tích tỷ lệ giống được cấy vào môi trường là 1%, 3%, 5%, 7%, 9% cho thấy về mặt kinh tế thì 5% vừa tiết kiệm lại hiệu quả với hàm lượng SKK tăng lên $15,89 \pm 0,08$ g/l. Trong nghiên cứu của Narayanaswamy (1994) chỉ ra khi mật độ tế bào trong bình nuôi cấy quá cao hoặc quá thấp đều làm cho tế bào sinh trưởng kém [120]. Mỗi loài có nhiệt độ tối ưu để phát triển và sinh tổng hợp chất chuyển hóa khác nhau [196]. Trong nghiên cứu của chúng tôi chủng *Penicillium herquei* HGN12.1R sinh trưởng tốt nhất ở 25 °C cho lượng SKK là $13,04 \pm 0,04$. Với nhiệt độ này khá đồng nhất với các nghiên cứu của [14], [15], [16], [116] cho

thấy nhiệt độ tối ưu sinh hoạt chất PTOX của các chủng nấm nội sinh trung bình từ 26 °C - 28 °C.

Giá trị pH của môi trường lên men ảnh hưởng trực tiếp đến sự tăng trưởng và các quá trình chuyển hóa của vi nấm [197]. Trong suốt quá trình lên men, vi nấm tiêu thụ chất dinh dưỡng và sản sinh chất chuyển hóa, dẫn đến sự thay đổi pH của môi trường. Đặc biệt, việc tiết ra các axit hữu cơ, như axit oxalic, sẽ làm giảm đáng kể độ pH môi trường [198]. Chủng vi nấm *Penicillium herquei* HGN12.1R cho thấy sinh trưởng tốt trong dải pH từ 5,0 đến 8,0 và đạt $13,76 \pm 0,05$ (g/l) sinh khối khô tại pH 7. Trong các nghiên cứu của [14], [15], [16], [116] cho thấy pH của vi nấm phát triển và sinh tổng hợp PTOX hầu hết là ở điều kiện axit yếu 5.6-6.5.

Lượng oxy hòa tan trong môi trường nuôi cấy lỏng là yếu tố then chốt cho sự phát triển của nấm. Trong quá trình lên men, nấm liên tục tiêu thụ cả oxy và dinh dưỡng, làm cho nồng độ oxy hòa tan có xu hướng giảm. Để khắc phục điều này và tăng cường hiệu suất lên men, việc điều chỉnh tốc độ lắc và thể tích dịch lên men phù hợp là rất quan trọng. Những yếu tố này giúp oxy hòa tan tốt hơn vào môi trường, đảm bảo đủ lượng oxy cho quá trình trao đổi chất của nấm. Nghiên cứu trước đây chỉ ra chủng vi nấm *Aspergillus fumigatus* Fresenius sản sinh PTOX dưới điều kiện lắc 200 vòng/ phút, thể tích dịch nuôi 20% [15]. Chủng *Fusarium solani* được lắc ở 100 vòng/ phút, thể tích dịch nuôi 40% sản sinh PTOX [14]. Nấm *Phellinus linteus* tăng trưởng tốt nhất ở 150 vòng/ phút, ở 200 vòng/ phút mật độ nấm giảm [117]. Nghiên cứu chủng *Penicillium herquei* HGN12.1R khi lắc ở 150 vòng/ phút và thể tích dịch nuôi 20% cho thấy sinh trưởng tốt nhất, kết quả này cho thấy cũng phù hợp với các nghiên cứu của các tác giả trước đó.

Sự thay đổi nồng độ các nguồn carbon và nitơ - những thành phần dinh dưỡng thiết yếu trong quá trình lên men - đã được chứng minh là có tác động trực tiếp đến sinh khối và hàm lượng kháng sinh của các chủng nấm [199]. Trong báo cáo của Lê Thị Minh Thành và cộng sự khi bổ sung 1% đường glucose; 1% cao nấm men; 0.5 % pepton; 0.5% tryton trong môi trường lên men chủng *Penicillium reticulisporum* tsp41 sinh tổng hợp Huperzin A cao nhất 0,0341 mg/L dịch lên men [29]. Một nghiên cứu chi tiết của Gogoi và cộng sự đã chỉ ra ảnh hưởng của nguồn carbon và nitơ đến quá trình sinh tổng hợp sinh khối và các chất chuyển hóa thứ cấp của chủng vi nấm *Fusarium* sp. DF2 [118]. Chủng vi nấm này tạo ra lượng sinh khối và chất chuyển hóa cao nhất trong môi trường lên men có bổ sung 0,1% dextrose. Lượng

sinh khối và chất chuyển hóa giảm đáng kể khi lên men trong môi trường chứa tinh bột, lactose và mannitol. Khi khảo sát ảnh hưởng của nguồn nitơ, dịch chiết nấm men làm gia tăng hàm lượng chất chuyển hóa thứ cấp trong khi dịch chiết bò, pepton và $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ chỉ làm tăng sinh khối nhưng không hiệu quả cho sản sinh các hoạt chất sinh học [118].

Nghiên cứu của chúng tôi chỉ ra, chủng *Penicillium herquei* HGN12.1R thích nghi nhất với nguồn đường dextrose, nguồn nitơ sử dụng đa dạng. Phân tích này cho thấy rằng trong khi các nguồn nitơ vô cơ như ammonium sulfate có thể hiệu quả cho việc tăng sinh khối và tổng hợp các enzyme cơ bản, thì các nguồn nitơ hữu cơ phức tạp có thể cung cấp các yếu tố kích thích hoặc các tiền chất sẵn có, giúp "bật" các cụm gen liên quan đến sinh tổng hợp các chất chuyển hóa thứ cấp như PTOX một cách hiệu quả hơn. Dữ liệu chúng tôi thu được cho thấy $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ là nguồn khoáng phù hợp nhất với lượng sinh khối khô đạt $15,05 \pm 0,05$ g/l.

Nghiên cứu ảnh hưởng của nguồn cơ chất cảm ứng tới sinh trưởng và khả năng kích hoạt sản sinh các sản phẩm trao đổi chất thứ cấp đúng hướng, một số nghiên cứu gần đây đã chứng minh tầm quan trọng của việc tối ưu hóa quá trình lên men cùng với việc sử dụng các nguồn cơ chất cảm ứng để tối đa hóa việc sản xuất các hợp chất có lợi ích kinh tế từ nấm nội sinh. Việc bổ sung các hợp chất như chất kích thích, tiền chất hoặc chiết xuất được coi là một phương pháp đơn giản, hiệu quả để kích thích sản xuất các hợp chất mong muốn [145], [158], [200]. Theo Yan và cộng sự báo cáo nghiên cứu làm tăng khả năng sinh tổng hợp Huperzin A, nhóm tác giả đã bổ sung vào môi trường lên men một số chất cảm ứng HSE (dịch chiết thực vật *H. serata* - tách chiết từ lá thạch tùng răng cưa), L-Lysine và acid acetic với các nồng độ lên men khác nhau. Kết quả cho thấy L-Lysine và HSE đã kích thích khả năng sinh Huperzin A và hệ sợi nấm [122]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, chiết xuất thực vật hoặc Phenylalanine được bổ sung với hàm lượng 10 $\mu\text{g/ml}$ đã làm tăng khả năng sinh trưởng trong lên men của chủng nấm nghiên cứu. Phenylalanine được xem là lựa chọn hiệu quả trong nghiên cứu này vì tính bền vững.

4.3.2. Lên men và tách chiết, tinh sạch và xác định cấu trúc các hợp chất từ *Penicillium herquei* HGN12.1R

Sản xuất các chất chuyển hóa tự nhiên từ quá trình lên men nấm nội sinh mang lại nhiều lợi thế rõ rệt. Phương pháp này có thể thực hiện trong môi trường đơn giản và chi phí thấp. Hơn nữa, nó giúp tiết kiệm thời gian và giảm thiểu nguy cơ ô nhiễm,

tạo điều kiện thuận lợi cho việc sản xuất ở quy mô công nghiệp [201] [157]. Ví dụ, taxol, camptothecin, PTOX và vinca alkaloid đã được sản xuất thành công bằng cách lên men nấm nội sinh [36], [116], [157]. Tuy nhiên, không thể phủ nhận rằng một số hạn chế nhất định của quá trình lên men đã cản trở việc sản xuất thương mại các hợp chất tự nhiên trong nấm nội sinh, chẳng hạn như sản lượng các chất chuyển hóa mong muốn thấp do nuôi cấy trong môi trường vô trùng, khó khăn trong việc tối ưu hóa môi trường nuôi cấy khi mở rộng quy mô, và sự phức tạp của quy trình tinh chế các hợp chất [125], [201], [202]. Một số chiến lược đã được thực hiện để cải thiện sản lượng các chất chuyển hóa mong muốn, bao gồm các kỹ thuật biến đổi gen, tối ưu hóa môi trường nuôi cấy và bổ sung elicitor [144], [201], [202].

Nghiên cứu động thái quá trình lên men trên hệ thống 5-10 lít/mẻ đã cung cấp một bức tranh toàn diện về mối liên hệ giữa các yếu tố sinh lý của chủng nấm và quá trình sinh tổng hợp PTOX, giúp xác định thời điểm thu hoạch tối ưu một cách khoa học và chính xác.

Quá trình lên men thể hiện một sự chuyển dịch trao đổi chất rõ rệt. Trong giai đoạn đầu, từ 12 giờ đến 72 giờ, nấm tập trung vào trao đổi chất sơ cấp (primary metabolism), ưu tiên tiêu thụ nguồn đường dextrose để tăng trưởng sinh khối. Điều này được minh chứng bằng sự gia tăng mạnh mẽ của sinh khối tươi và khô, từ 91,09 g/l và 4,05 g/l ở 12 giờ lên đến 222,27 g/l và 10,65 g/l ở 72 giờ. Trong giai đoạn này, hoạt động trao đổi chất mạnh mẽ cũng dẫn đến sự sụt giảm pH môi trường, từ 7,0 xuống 5,5, do sự sản sinh các axit hữu cơ.

Sau 72 giờ, nấm chuyển sang giai đoạn ổn định, nơi tốc độ tăng trưởng sinh khối chậm lại và đạt đỉnh điểm tại 144 giờ với sinh khối khô là $16,19 \pm 0,73$ g/l. Sự ổn định của sinh khối và pH ở mức 5,5 cho thấy nấm đã chuyển hướng năng lượng sang trao đổi chất thứ cấp (secondary metabolism). Đây chính là thời điểm các gen liên quan đến sinh tổng hợp PTOX (như VdtD, PLR, SDH, OMT, CYP) có khả năng được biểu hiện mạnh mẽ và hoạt động tích cực để tổng hợp các hợp chất chuyên biệt. Phân tích TLC đã củng cố mạnh mẽ mối liên hệ này, khi cho thấy sự tích lũy PTOX bắt đầu từ 72 giờ và đạt đỉnh trong khoảng thời gian từ 144 giờ đến 168 giờ. Kết quả này cho thấy việc tối ưu hóa điều kiện lên men không chỉ giúp nấm tăng trưởng tốt mà còn tạo ra các tín hiệu môi trường (như sự thay đổi nồng độ chất dinh dưỡng và pH ổn định) để kích hoạt quá trình sinh tổng hợp PTOX. Do đó, thời điểm 144 giờ được xác định là tối ưu nhất cho việc thu hoạch, vì tại đây nấm không chỉ đạt sinh

khối tối đa mà còn tích lũy hàm lượng PTOX dồi dào. Nghiên cứu lên men chủng *Fusarium* sp. LĐL 4.4 sản sinh Huperzin A, ở thời điểm 108h là thích hợp để thu hồi lên men, giá trị pH cũng thay đổi tương tự *Penicillium herquei* HGN12.1R [29]. Hàm lượng PTOX và sinh khối khô liên quan đến *Fusarium solani* báo cáo vào 192-240h của lên men là thời điểm thích hợp để thu hồi PTOX [48].

Sau khi đã xác định được thời điểm thu hoạch tối ưu là 144 giờ, sinh khối nấm *Penicillium herquei* HGN12.1R đã được thu hồi và tiếp tục trải qua quy trình chiết tách, tinh sạch để phân lập và xác định cấu trúc các hợp chất chuyên biệt, bao gồm VN-12C-03 và VN-12C-06. Dựa trên Các tín hiệu phổ ^1H và ^{13}C NMR, các hợp chất này được xác định là α -peltatin, β -peltatin với công thức phân tử lần lượt là $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_8$ (400 g/mol), $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_8$ (414 g/mol). Đây là một trong số ít nghiên cứu xác nhận bằng thực nghiệm cấu trúc hóa học của α -peltatin và β -peltatin trong nấm bằng cách sử dụng phân tích NMR.

Hợp chất VN-12C-03 thu được có dạng bột màu trắng. Trên phổ ^1H NMR xuất hiện tín hiệu đơn của 3 proton thơm tại δ 6.13 (1H, s, H-8) và 6.36 (2H, s, H-2' và H-6'), cùng với tín hiệu của 2 nhóm methoxy tại δ 3.74 (6H, s, 3',5'- OCH_3). Phân tích phổ cộng hưởng từ ^{13}C NMR và phổ 2 chiều HSQC cho thấy sự xuất hiện tín hiệu của 21 nguyên tử carbon, trong đó có các tín hiệu của một vòng benzene thế 5 vị trí [δ 119.8 (C-4a), 138.7 (C-5), 134.1 (C-6), 148.2 (C-7), 103.1 (C-8), 132.5 (C-8a)], một vòng benzene thế các vị trí 1,3,4,5 [δ 132.8 (C-1'), 108.9 (C-2' và C-6'), 148.0 (C-3' và C-5'), và 135.0 (C-4')], một nhóm carbonyl tại δ 177.6 (C-2a), 3 nhóm oxymethylene tại δ 73.6 (C-3a), 27.0 (C-4), và 101.9 (OCH_2O), cùng với 3 nhóm methine tại δ 44.6 (C-1), 48.2 (C-2), và 33.4 (C-3). Các tín hiệu phổ ^1H và ^{13}C NMR này cho gợi ý hợp chất VN-12C-03 có dạng khung lignans – một dạng phenolic khá phổ biến ở thực vật. Khi so sánh số liệu phổ ^1H và ^{13}C NMR của hợp chất VN-12C-03 với hợp chất lignans đã biết là α -Peltatin cho kết quả hoàn toàn tương đồng, gợi ý sự đồng nhất về cấu trúc của cả 2 hợp chất [203].

Để xác định thêm sự quy kết các vị trí và cấu trúc của hợp chất VN-12C-03, phân tích các tương tác trên phổ HMBC được thực hiện. Trên phổ HMBC, tương tác giữ δ 5.89 với C-6 và C-7 giúp xác định rõ vị trí của nhóm OCHO ở vị trí C-6/C-7. Các vị trí của vòng thơm 5 vị trí được xác định thông qua tương tác HMBC từ H-8 tới C-4a, C-5, C-6, C-7, và C-8a. Vị trí của vòng benzen thế 1,3,4,5 cũng được xác

định tại C-1 bởi các tương tác HMBC từ H-1 tới C-1', từ H-2' và H-6' tới C-1. Ngoài ra, tương tác HMBC từ H-3a đến C-2, C-2a, C-3, và C-4 giúp khẳng định sự hợp chất của vòng gamma-lactone với vòng cyclohexane của khung lignans ở vị trí C-2/C-3. Vị trí của 2 nhóm methoxy tại C-3' và 5' được khẳng định bởi tương tác HMBC từ δ 3.74 đến C3' và C-5'.

Như vậy, với các kết quả phân tích phổ và so sánh với tài liệu tham khảo, hợp chất VN-12C-03 đã được xác định là α -Peltatin, với công thức phân tử $C_{21}H_{20}O_8$, khối lượng phân tử 400 g/mol. α -Peltatin được xem là một dẫn xuất của PTOX [149].

Hợp chất VN-12C-06 thu được có dạng bột màu trắng. Trên phổ 1H NMR xuất hiện tín hiệu đơn của 3 proton thơm tại δ 6.12 (1H, s, H-8) và 6.42 (2H, s, H-2' và H-6'), cùng với tín hiệu của 3 nhóm methoxy tại δ 3.73 (9H, s, 3',4',5'-OCH₃). Phân tích phổ ^{13}C NMR và phổ HSQC cho thấy sự xuất hiện tín hiệu của 22 nguyên tử carbon, trong đó có các tín hiệu của một vòng benzene thế 5 vị trí δ 120.5 (C-4a), 139.4 (C-5), 134.6 (C-6), 148.7 (C-7), 103.2 (C-8), 132.8 (C-8a)], một vòng benzene thế các vị trí 1,3,4,5 [δ 138.7 (C-1'), 109.5 (C-2' và C-6'), 153.7 (C-3' và C-5'), và 138.9 (C-4')], một nhóm carbonyl tại δ 177.9 (C-2a), 3 nhóm oxymethylene tại δ 74.0 (C-3a), 27.8 (C-4), và 102.4 (OCH₂O), cùng với 3 nhóm methine tại δ 45.2 (C-1), 48.3 (C-2), và 34.0 (C-3). Các tín hiệu phổ 1H và ^{13}C NMR này cho gợi ý hợp chất VN-12C-06 có dạng khung lignans, tương tự với hợp chất VN-12C-03

Khi so sánh số liệu phổ 1H và ^{13}C NMR của hợp chất VN-12C-06 với hợp chất lignans đã biết là β -Peltatin cho kết quả hoàn toàn tương đồng, gợi ý sự đồng nhất về cấu trúc của cả 2 hợp chất [204].

Để xác định thêm sự quy kết các vị trí và cấu trúc của hợp chất VN-12C-06, phân tích các tương tác trên phổ HMBC được thực hiện. Tương tự như với hợp chất VN-12C-03, trên phổ HMBC, tương tác giữa δ 5.90 và 5.89 với C-6 và C-7 giúp xác định rõ vị trí của nhóm OCHO ở vị trí C-6/C-7. Các vị trí của vòng thơm thế 5 vị trí được xác định thông qua tương tác HMBC từ H-8 tới C-4a, C-5, C-6, C-7, và C-8a. Vị trí của vòng benzen thế 1,3,4,5 cũng được xác định tại C-1 bởi các tương tác HMBC từ H-1 tới C-1', từ H-2' và H-6' tới C-1. Ngoài ra, tương tác HMBC từ H-3a đến C-2, C-2a, C-3, và C-4 giúp khẳng định sự hợp chất của vòng gamma-lactone với vòng cyclohexane của khung lignans ở vị trí C-2/C-3. Vị trí của 3 nhóm methoxy tại

C-3', C-4', và C-5' được khẳng định bởi tương tác HMBC từ δ 3.73 đến C3' C-4', và C-5'.

Kết quả phân tích phổ và so sánh với tài liệu tham khảo cho thấy hợp chất VN-12C-06 được xác định là β -Peltatin, với công thức phân tử là $C_{22}H_{22}O_8$ và khối lượng phân tử 414 g/mol. β -Peltatin cũng được công nhận là một dẫn xuất của PTOX [149].

Các hợp chất này thể hiện sự tương đồng về cấu trúc với α -peltatin và β -peltatin được tìm thấy trong thực vật. Dữ liệu cấu trúc này phù hợp với các nghiên cứu trước đây trên thực vật [149], [203], [204] Trong một nghiên cứu khác, đã chiết xuất và định lượng deoxypodophyllotoxin từ *Aspergillus fumigatus* nuôi cấy bằng phương pháp LC–MS, họ đề xuất giả thuyết rằng sự chuyển gen theo chiều ngang (từ cây chủ sang nấm nội sinh) có thể liên quan đến quá trình sản xuất deoxypodophyllotoxin [15]. Theo Arroo và cộng sự cho rằng deoxypodophyllotoxin được coi là tiền chất trong quá trình tổng hợp sinh học của β -peltatin và PTOX [205].

Trong nghiên cứu của Germaine và cộng sự đã báo cáo việc sản xuất PTOX của *Fusarium oxysporum* ủng hộ cho lý thuyết rằng trong quá trình tiến hóa lâu dài của các loài nội sinh và cây chủ của chúng, các loài nội sinh đã tự thích nghi với môi trường vi mô đặc biệt của chúng bằng biến đổi di truyền, bao gồm việc hấp thụ một số DNA thực vật vào bộ gen của chính chúng [206]. Gần đây, *Penicillium herquei*, một thành viên của chi *Penicillium*, được biết đến với tiềm năng sản xuất nhiều chất chuyển hóa thứ cấp như dẫn xuất phenalenone [94], [95] .

Trong nghiên cứu này, cả α -peltatin và β -peltatin đều là dẫn xuất PTOX được tạo ra bằng cách biến đổi vòng B trong cấu trúc hợp chất PTOX. Trong một số nghiên cứu đã cho rằng chúng thể hiện hoạt động kháng vi-rút và chống khối u đáng kể [149], [150]. Do đó, phát hiện của chúng tôi cung cấp sự hỗ trợ quan trọng cho giả thuyết về con đường tổng hợp PTOX trong nấm nội sinh.

4.3.3. Đánh giá hoạt tính chống oxy hóa và hoạt tính gây độc tế bào của các hợp chất từ *Penicillium herquei* HGN12.1R

Gốc tự do DPPH, được sử dụng rộng rãi để đánh giá khả năng hoạt động của các hợp chất như chất dọn gốc tự do và cung cấp hydro, là một phương pháp nhanh chóng, đơn giản và không tốn kém để kiểm tra khả năng chống oxy hóa. Thử nghiệm DPPH dựa trên việc loại bỏ DPPH, một gốc tự do ổn định. Gốc DPPH có màu tím sẫm trong dung dịch và hấp thụ mạnh ở bước sóng khoảng 517 nm, khi đã khử và

chuyển thành DPPH-H nó chuyển sang không màu hoặc vàng nhạt [207]. Trong nghiên cứu của chúng tôi hoạt tính chống oxy hóa của hai hợp chất VN12C.03 và VN12C.06 so với chất chuẩn Resveratrol thông qua khả năng ức chế gốc tự do DPPH ở các nồng độ khác nhau và giá trị EC_{50} .

Nhìn chung, giá trị IC_{50} càng thấp thì hoạt tính chống oxy hóa càng mạnh, so với đối chứng Resveratrol hợp chất VN12C.03 có giá trị IC_{50} là $6,44 \pm 0,41$ mg/ml. Hợp chất VN12C.03 cho thấy khả năng ức chế gốc tự do DPPH, với giá trị IC_{50} là $6,44 \pm 0,41$ mg/ml. Mặc dù hoạt tính này yếu hơn so với chất chuẩn Resveratrol, nó vẫn thể hiện tiềm năng nhất định. VN12C.03 vẫn có thể được nghiên cứu để sử dụng như một chất chống oxy hóa trong các sản phẩm thực phẩm chức năng hoặc thuốc hỗ trợ, đặc biệt khi kết hợp với các chất khác để tạo ra hiệu ứng hiệp đồng [208]. VN12C.03 có thể là một ứng viên tiềm năng trong các công thức mỹ phẩm tự nhiên. Việc tìm thấy một hợp chất có hoạt tính từ nguồn nấm nội sinh là một kết quả đáng khích lệ, mở ra hướng nghiên cứu và phát triển trong tương lai.

Hợp chất VN12C.06 có giá trị $IC_{50} = 18,75 \pm 1,11$ mg/ml, đây là giá trị IC_{50} cao nhất trong số các hợp chất đã được thử nghiệm (bao gồm cả VN12C.03 và chất chuẩn Resveratrol). Giá trị IC_{50} cao này cho thấy hoạt tính chống oxy hóa của VN12C.06 là thấp. Để đạt được hiệu quả ức chế 50% gốc tự do DPPH, cần phải sử dụng một nồng độ hợp chất rất cao, điều này làm giảm đáng kể tính khả thi của việc ứng dụng hợp chất này như một chất chống oxy hóa hiệu quả. Mặc dù vậy, nghiên cứu vẫn sẽ tập trung vào các hoạt tính sinh học khác của hợp chất này. Việc nó là một dẫn xuất của PTOX cho thấy tiềm năng có các hoạt tính quan trọng như chống ung thư, kháng khuẩn và chống viêm (Gordaliza et al, 2004).

Trong nghiên cứu khả năng gây độc tế bào, cả hai hợp chất đều được thử nghiệm trên dòng tế bào ung thư phổi người SK-LU-1. Đáng chú ý, VN12C.06 cho thấy khả năng gây độc tế bào mạnh hơn đáng kể so với VN12C.03. Giá trị IC_{50} của VN12C.06 là $5,99 \pm 0,41$ μ g/ml, thấp hơn nhiều so với VN12C.03 ($18,61 \pm 0,41$ μ g/ml), điều này cho thấy VN12C.06 hiệu quả hơn trong việc ức chế 50% tế bào ung thư ở nồng độ thấp hơn. Từ đó cho thấy tiềm năng ứng dụng Phát triển thuốc chống ung thư của VN12C.06 là một phát hiện cực kỳ quan trọng. Hợp chất này, với giá trị IC_{50} thấp, có thể được xem xét làm chất chỉ đạo để phát triển các loại thuốc chống ung thư mới. Trong nghiên cứu của Oktriawan và cộng sự đã chứng minh nấm nội sinh cư trú trong cây chủ của chúng mà không có triệu chứng rõ ràng. Chúng đã được chứng minh là

nguồn dồi dào các hợp chất hoạt tính sinh học mới với cấu trúc đa dạng, 01 hợp chất mới là 5,7-dihydroxy-3(R)-methylphthalide (1), đã được phân lập từ *Xylaria brevipes* PGR1, và ba hợp chất đã biết, (–)-altenuene (2), alternariol (3) và altertoxin I (4), đã được phân lập từ *Alternaria alternata* D-8. Các hợp chất này được chứng minh có khả năng gây độc tế bào [209].

Các hợp chất VN12C.03 và VN12C.06 từ nấm nội sinh *Penicillium herquei* HGN12.1R là nguồn tiềm năng cho việc phát triển các ứng dụng dược lý. Trong khi VN12C.03 có thể được khai thác trong lĩnh vực chống oxy hóa (đặc biệt là trong mỹ phẩm và thực phẩm chức năng), thì VN12C.06 lại thể hiện tiềm năng vượt trội trong lĩnh vực chống ung thư, mở ra hướng nghiên cứu đầy hứa hẹn cho việc phát triển thuốc mới.

4.4. Những hạn chế và hướng nghiên cứu tiếp theo

Mặc dù đã thu được những kết quả ban đầu đầy hứa hẹn, nghiên cứu vẫn còn một số hạn chế cần được giải quyết để tối đa hóa tiềm năng ứng dụng của các hợp chất từ chủng nấm *Penicillium herquei* HGN12.1R. Dưới đây là những hạn chế và các hướng nghiên cứu tiếp theo được đề xuất.

Những hạn chế

- Hàm lượng PTOX và các dẫn xuất như VN12C.03 và VN12C.06 thu được thấp và từ quy mô lên men nhỏ 5-10 lít, hiện tại chưa đáp ứng được nhu cầu sản xuất thương mại.
- Các thử nghiệm hoạt tính chống oxy hóa và gây độc tế bào mới chỉ dừng lại ở mô hình *in vitro* (trên tế bào). Các đánh giá này chưa đủ để kết luận về hiệu quả thực sự và độ an toàn của hợp chất trên cơ thể sống.

Hướng nghiên cứu tiếp theo

- Cần thực hiện các nghiên cứu để tối ưu hóa môi trường nuôi cấy (thành phần dinh dưỡng, pH, nhiệt độ), điều kiện lên men và thời gian thu hoạch trên quy mô lớn hơn (ví dụ: lên men trong bioreactor) nhằm tăng đáng kể sản lượng của các hợp chất mong muốn.
- Nghiên cứu sâu hơn về cơ chế sinh tổng hợp PTOX có thể cho phép sử dụng các kỹ thuật biến đổi gen (như chỉnh sửa gen CRISPR-Cas9) hoặc bổ sung các elicitor để kích thích nấm sản xuất các chất chuyển hóa thứ cấp này với năng suất cao hơn.

- Cần mở rộng các nghiên cứu hơn như thử nghiệm *in vivo* trên động vật. Điều này sẽ giúp xác định tính hiệu quả, dược động học và độc tính toàn thân của VN12C.03 và VN12C.06.
- Đánh giá hoạt tính gây độc tế bào của VN12C.06 trên nhiều dòng tế bào ung thư khác nhau để xác định tính chọn lọc và phổ hoạt tính của nó.
- Phân tích chi tiết sự khác biệt về cấu trúc giữa VN12C.03 và VN12C.06 (như sự hiện diện của nhóm methoxy ở vị trí C4') và liên hệ với sự khác biệt về hoạt tính. Từ kết quả phân tích đó, có thể thực hiện các biến đổi hóa học đối với VN12C.03 để tạo ra các dẫn xuất mới có hoạt tính chống ung thư mạnh hơn. Ngược lại, có thể tối ưu hóa cấu trúc của VN12C.06 để tăng tính chọn lọc đối với tế bào ung thư và giảm thiểu tác dụng phụ.
- Dựa vào tiềm năng đã được xác định của 2 hợp chất, nghiên cứu có thể tập trung phát triển VN12C.03 thành sản phẩm mỹ phẩm hoặc thực phẩm chức năng chống oxy hóa, trong khi VN12C.06 có thể được nghiên cứu chuyên sâu hơn cho mục tiêu phát triển thuốc điều trị ung thư.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

1. Đã phân lập được 53 chủng vi nấm nội sinh từ 2 mẫu vật liệu *Dyosma difformis* được thu thập từ Hà Giang và Lai Châu. Từ đó đã đánh giá được tính đa dạng loài VNNS thông qua phân tích các chỉ số đa dạng Shannon, Simpson. Đã tuyển chọn được 06/53 chủng có hoạt động gây độc tế bào rất mạnh đối với 3 dòng tế bào SK-LU-1 (Ung thư phổi ở người), HL-60 (Bệnh bạch cầu cấp tính ở người) và HepG2 (Ung thư biểu mô tế bào gan ở người). Kết hợp các phương pháp phân tích TLC, HPLC xác định khả năng sinh tổng hợp PTOX đã lựa chọn được chủng HGN12.1R tiềm năng với đầy đủ các đặc điểm sinh học cho các nghiên cứu tiếp theo.
2. Đã giải trình tự và lắp ráp hệ gen chủng vi nấm *Penicillium herquei* HGN12.1R bằng công nghệ PacBio. Bộ gen chủng *Penicillium herquei* HGN12.1R có kích thước khoảng 35,0 Mb tương ứng với độ hoàn thiện 98,3%. Đã chú giải hệ gen và dự đoán các nhóm gen liên quan đến con đường sinh tổng hợp PTOX và các dẫn xuất.
3. Đã xác định điều kiện thích hợp cho sản sinh PTOX và các dẫn xuất của chủng *Penicillium herquei* HGN12.1R bằng công nghệ lên men ở quy mô phòng thí nghiệm.
4. Đã tách chiết, tinh sạch và xác định được cấu trúc của 02 hợp chất α -peltatin và β -peltatin là dẫn xuất của PTOX. Cả hai hợp chất đều thể hiện hoạt tính chống oxy hoá và hoạt tính gây độc tế bào.

KIẾN NGHỊ

- Tiếp tục nghiên cứu tối ưu điều kiện lên men và các nghiên cứu sâu hơn để tăng hiệu suất sinh tổng hợp PTOX và các dẫn xuất của chủng *Penicillium herquei* HGN12.1R.
- Đánh giá chức năng các gen dự đoán con đường sinh tổng hợp PTOX và các dẫn xuất của chủng nấm nghiên cứu.
- Nghiên cứu thử nghiệm *in vivo* hoạt tính của VN12C.03 và VN12C.06.
- Đánh giá hoạt tính gây độc tế bào của VN12C.06 trên nhiều dòng tế bào ung thư khác nhau để xác định tính chọn lọc và phổ hoạt tính của nó

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

▪ Công bố khoa học:

1. **Hoa Thi Tran**, Giang Thu Nguyen, Hong Ha Thi Nguyen, Huyen Thi Tran, Quang Hong Tran, Quang Ho Tran, Ngoc Thi Ninh, Phat Tien Do, Ha Hoang Chu & Ngoc Bich Pham (2022). “*Isolation and Cytotoxic Potency of Endophytic Fungi Associated with Dysosma difformis, a Study for the Novel Resources of Podophyllotoxin*”. Mycobiology, 50(5):389-398. DOI: 10.1080/12298093.2022.2126166.

2. **Tran Thi Hoa**, Nguyen Thu Giang, Nguyen Thi Hong Ha, Tran Thi Huyen, Do Tien Phat, Chu Hoang Ha, Pham Bich Ngoc, Tran Ho Quang (2023). “*Diversity of endophytic fungi from medicinal plants Dysosma difformis (Hemsl & E.H. Wilson) T.H. Wang collected in Ha Giang and Lai Chau*”. Vietnam Journal of Biotechnology, 21(2): 365-373. DOI:10.15625/1811-4989/18344.

3. **Trần Thị Hoa**, Nguyễn Thị Hồng Hà, Nguyễn Thu Giang, Trần Hồ Quang, Đỗ Tiến Phát, Chu Hoàng Hà, Phạm Bích Ngọc (2023). “*Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của chiết xuất vi nấm nội sinh HGN12.1R phân lập từ cây dược liệu Bát Giác Liên (Dysosma difformis (Hemsl & E.H. Wilson) T.H. Wang)*”. Báo cáo khoa học - Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc 2023. Nhà xuất bản Khoa học tự nhiên và Công nghệ: 540-544.

4. Duong Huy Nguyen, Quang Ho Tran, Lam Tung Le, Ha Hong Thi Nguyen, **Hoa Thi Tran**, Thuy Phuong Do, Anh Ngoc Ho, Quang Hong Tran, Hien Thi Nguyen Thu, Van Ngoc Bui, Hoang Ha Chu, Ngoc Bich Pham (2024). “*Genomic characterization and identification of candidate genes for putative Podophyllotoxin biosynthesis pathway in Penicillium herquei HGN12.1C*”, Microb Biotechnol, 17(9):e70007. DOI: 10.1111/1751-7915.70007.

▪ Giải pháp hữu ích:

Bằng độc quyền giải pháp hữu ích “*Chủng vi nấm Penicillium herquei HGN12.1C thuần khiết về mặt sinh học có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất Podophyllotoxin*”. Nhóm tác giả: **Trần Thị Hoa**, Nguyễn Thị Hồng Hà, Trần Thị Huyền, Trần Hồ Quang, Đỗ Tiến Phát, Phạm Bích Ngọc. Số đơn: 2-2021-00393. Số bằng: 3352 theo Quyết định số 66238/QĐ-SHTT ngày 05 tháng 09 năm 2023 của Cục sở hữu trí tuệ.

DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bui Van Thanh., Nguyen Thi Van Anh., Chu Thi Thu Ha., Do Hoang Giang., Truong Thi Lien., Ninh Khac Thanh Tung., and Nguyen Tien Dat., 2021, A New 2,3-Dioxygenated Flavanone and Other Constituents from *Dysosma difformis*, *Rec. Nat. Prod*, 1, pp. 84–91, doi: 10.25135/rnp.256.21.03.2017.
2. Dung N. T., Long M. T., Cường B. H., and Thương P. T., 2018, Flavonoid và lignan phân lập từ phần dưới mặt đất của cây bát giác liên (*Podophyllum tonkinense* Gagnep.) thu hái ở Sa Pa, Lào Cai, *Tạp chí Dược học*, 58(7), Art. no. 7.
3. Sách đỏ Việt Nam - Phần II Thực vật, Truy cập ngày 27/11/2024 từ (https://book365.vn/sach/8878_sach-do-viet-nam-phan-i-thuc-vat.html).
4. A. L. Eyberger., R. Dondapati., and J. R. Porter., 2006, Endophyte fungal isolates from *Podophyllum peltatum* produce podophyllotoxin, *J Nat Prod*, 69(8), pp. 1121–1124, doi: 10.1021/np060174f.
5. Camilo Canel., Franck E. Dayan., Markus Ganzera., Ikhlas A. Khan., Agnes Rimando., Charles L. Burandt Jr., Rita M. Moraes., 2001, High yield of podophyllotoxin from leaves of *Podophyllum peltatum* by in situ conversion of podophyllotoxin 4- O-beta-D-glucopyranoside, *Planta Med*, 67(1), pp. 97–99, doi: 10.1055/s-2001-10636.
6. Liu YQ., Tian J., Qian K., Zhao XB., Morris-Natschke SL., Yang L., Nan X., Tian X., Lee KH., 2015, Recent progress on C-4-modified podophyllotoxin analogs as potent antitumor agents, *Med Res Rev*, 35(1), pp. 1–62, doi: 10.1002/med.21319.
7. Hu S., Zhou Q., Wu WR., Duan YX., Gao ZY., Li YW., Lu Q., 2016, Anticancer effect of deoxypodophyllotoxin induces apoptosis of human prostate cancer cells, *Oncol Lett*, 12(4), pp. 2918–2923, doi: 10.3892/ol.2016.4943.
8. B. Botta., G. Delle Monache., D. Misiti, A. Vitali., and G. Zappia., 2001, Aryltetralin lignans: chemistry, pharmacology and biotransformations, *Curr Med Chem*, 8(11), pp. 1363–1381, doi: 10.2174/0929867013372292.
9. J. Berlin., N. Bedorf., C. Mollenschott., V. Wray., F. Sasse., and G. Höfle., 1988, On the podophyllotoxins of root cultures of *Linum flavum*, *Planta Med*, 54(3), pp. 204–206, doi: 10.1055/s-2006-962404.
10. U. Empt., A. W. Alfermann., N. Pras., and M. Petersen., 2000, The use of plant cell cultures for the production of podophyllotoxin and related lignans, *Journal of Applied Botany-angewandte Botanik*, 74, pp. 145–150.
11. A. Giri and M. Lakshmi Narasu., 2000, Production of podophyllotoxin from *Podophyllum hexandrum*: a potential natural product for clinically useful anticancer drugs, *Cytotechnology*, 34(1–2), pp. 17–26, doi: 10.1023/A:1008138230896.
12. M. Petersen and A. W. Alfermann., 2001, The production of cytotoxic lignans by plant cell cultures, *Appl Microbiol Biotechnol*, 55(2), pp. 135–142, doi: 10.1007/s002530000510.

13. Xiao-ming Tan., Ya-qin Zhou., Xiao-lei Zhou., Xiang-hua Xia., Ying Wei., Li-li He., Hong-zhen Tang., Li-ying Yu., 2018, Author Correction: Diversity and bioactive potential of culturable fungal endophytes of *Dysosma versipellis*; a rare medicinal plant endemic to China, *Sci Rep*, 8(1), p. 12694, doi: 10.1038/s41598-018-31009-0.
14. Mohammad Nadeem., Mauji Ram., Pravej Alam, Malik Mobeen Ahmad., Anis Mohammad., Fahad Al-Qurainy., Salim Khan and Malik Zainul Abidin2., 2012, *Fusarium solani*, P1, a new endophytic podophyllotoxin-producing fungus from roots of *Podophyllum hexandrum*, *AJMR*, 6(10), pp. 2493–2499, doi: 10.5897/AJMR11.1596.
15. S. Kusari., M. Lamshöft., and M. Spiteller., 2009, *Aspergillus fumigatus* Fresenius, an endophytic fungus from *Juniperus communis* L. Horstmann as a novel source of the anticancer pro-drug deoxypodophyllotoxin, *J Appl Microbiol*, 107(3), pp. 1019–1030, doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04285.x.
16. Z. Liang., J. Zhang., X. Zhang., J. Li., X. Zhang., and C. Zhao., 2016, Endophytic Fungus from *Sinopodophyllum emodi* (Wall.) Ying that Produces Podophyllotoxin, *J Chromatogr Sci*, 54(2), pp. 175–178, doi: 10.1093/chromsci/bmv124.
17. G. S. Y. Xianzhi., Zhang Lingqi., and Shao Hua., 2003, Select of producing podophyllotoxin endophytic fungi from *podophyllin* plant, *Natural Product Research and Development*, Accessed: Nov. 28, 2024.
18. N. T. Bân, Danh mục các loài thực vật Việt Nam, 2003, tập 2, (<http://thuvienmoitruong.ceid.gov.vn/handle/CEID/41731>).
19. Man Thanh Long, 2018, Nghiên cứu thành phần hóa học của cây bát giác liên (*dysosma difformis*), *Bộ y tế - Trường đại học dược Hà Nội*, (<https://123docz.net/document/5555339-nghien-cuu-thanh-phan-hoa-hoc-cua-cay-bat-giac-lien-dysosma-difformis.htm>)
20. D. L. Yang., P. Sun., and M. F. Li., 2016, Chilling temperature stimulates growth, gene over-expression and podophyllotoxin biosynthesis in *Podophyllum hexandrum* Royle, *Plant Physiol Biochem*, 107, pp. 197–203, doi: 10.1016/j.plaphy.2016.06.010.
21. R. Yang., X. Huang., Z. Che., Y. Zhang., and H. Xu., 2017, Application of sustainable natural resources in crop protection: Podophyllotoxin-based botanical pesticides derived from *Podophyllum hexandrum* for controlling crop-threatening insect pests, *Industrial Crops and Products*, 107, pp. 45–53, doi: 10.1016/j.indcrop.2017.05.033.
22. Võ V. C, 2012, *Từ điển cây thuốc Việt Nam*, NXB Y học.
23. W. D. MacRae., J. B. Hudson., and G. H. Towers., 1989, The antiviral action of lignans, *Planta Med*, 55(6), pp. 531–535, doi: 10.1055/s-2006-962087.
24. Zinniel DK., Lambrecht P., Harris NB., Feng Z., Kuczmarski D., Higley P., Ishimaru CA., Arunakumari A., Barletta RG., Vidaver AK., 2002, Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants, *Appl Environ Microbiol*, vol. 68, no. 5, pp. 2198–2208, doi: 10.1128/AEM.68.5.2198-2208.2002.

25. S. Firáková., M. Šturdíková., and M. Múčková., 2007, Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants, *Biologia*, 62(3), pp. 251–257, doi: 10.2478/s11756-007-0044-1.
26. R. J. Rodriguez., J. F. White Jr., A. E. Arnold., and R. S. Redman., 2009, Fungal endophytes: diversity and functional roles, *New Phytologist*, 182(2), pp. 314–330, doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x.
27. A. A. L. Gunatilaka., 2006, Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence, *J Nat Prod*, 69(3), pp. 509–526, doi: 10.1021/np058128n.
28. A. C. Bogas., F. P. N. Cruz., P. T. Lacava., and C. P. Sousa., 2022, Endophytic fungi: an overview on biotechnological and agronomic potential, *Braz. J. Biol*, 84, p. e258557, doi: <https://doi.org/10.1590/1519-6984.258557>.
29. Lê Thị Minh Thành., Đồng Văn Quyền., Nguyễn Phương Nhuệ., và cộng sự, Nghiên cứu bào chế viên nang chứa hoạt chất Huperzine A được tách chiết từ một số chủng nấm phân lập từ cây Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata*). (<https://nsti.vista.gov.vn/projects/kqnv/nguyen-cuu-bao-che-vien-nang-chua-hoat-chat-huperzine-a-duoc-tach-chiet-tu-mot-so-chung-nam-phan-lap-tu-cay-thach-tung-rang-cua-huperzia-serrata-131915.html>).
30. S T Shukla., P V Habbu., V H Kulkarni., K S Jagadish., Aprajita R Pandey., V N Sutariya., 2014, Endophytic microbes: A novel source for biologically/pharmacologically active secondary metabolites. (<https://www.semanticscholar.org/paper/Endophytic-microbes%3A-A-novel-source-for-active-Shukla->).
31. P. Schneider., M. Misiek., and D. Hoffmeister., 2008, In vivo and in vitro production options for fungal secondary metabolites, *Mol Pharm*, 5(2), pp. 234–242, doi: 10.1021/mp7001544.
32. J. Zhao., L. Zhou., J. Wang., L. Zhong., X. Liu., X. Gao., Endophytic fungi for producing bioactive compounds originally from their host plants, 2010. (<https://www.semanticscholar.org/paper/Endophytic-fungi-for-producing-bioactive-compounds-Zhao>).
33. N. G. Lewis and E. Yamamoto., 1990, Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation, *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 41, pp. 455–496, doi: 10.1146/annurev.pp.41.060190.002323.
34. M. Khaled., Z.-Z. Jiang., and L.-Y. Zhang., 2013, Deoxypodophyllotoxin: a promising therapeutic agent from herbal medicine, *J Ethnopharmacol*, 149(1), pp. 24–34, doi: 10.1016/j.jep.2013.06.021.
35. H. W. Zhang., Y. C. Song., and R. X. Tan., 2006, Biology and chemistry of endophytes, *Nat Prod Rep*, 23(5), pp. 753–771, doi: 10.1039/b609472b.
36. A. Stierle., G. Strobel., and D. Stierle., 1993, Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew, *Science*, 260(5105), pp. 214–216, doi: 10.1126/science.8097061.
37. S. H. Faeth and W. F. Fagan., 2002, Fungal Endophytes: Common Host Plant Symbionts but Uncommon Mutualists¹, *Integrative and Comparative Biology*, 42(2), pp. 360–368, , doi: 10.1093/icb/42.2.360.

38. R. X. Tan and W. X. Zou., 2001, Endophytes: a rich source of functional metabolites, *Nat Prod Rep*, 18(4), pp. 448–459, doi: 10.1039/b100918o.
39. S. Naik., R. U. Shaanker., G. Ravikanth., and S. Dayanandan., 2019, How and why do endophytes produce plant secondary metabolites?, *Symbiosis*, 78(3), pp. 193–201, doi: 10.1007/s13199-019-00614-6.
40. A. H. Aly., A. Debbab., J. Kjer., and P. Proksch., 2010, Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products, *Fungal Diversity*, 41(1), pp. 1–16, doi: 10.1007/s13225-010-0034-4.
41. V. Morales-Sánchez., M. Fe Andrés., C. E. Díaz., and A. González-Coloma., Factors Affecting the Metabolite Productions in Endophytes: Biotechnological Approaches for Production of Metabolites, *Curr Med Chem*, vol. 27, no. 11, pp. 1855–1873, 2020, doi: 10.2174/0929867326666190626154421.
42. Sebastianes FL., Cabedo N, El Aouad N., Valente AM., Lacava PT., Azevedo JL., Pizzirani-Kleiner AA., Cortes D., 2012, 3-hydroxypropionic acid as an antibacterial agent from endophytic fungi *Diaporthe phaseolorum*, *Curr Microbiol*, 65(5), pp. 622–632, doi: 10.1007/s00284-012-0206-4.
43. S. B. Rajini., M. Nandhini., A. C. Udayashankar., S. R. Niranjana., O. S. Lund., and H. S. Prakash., Diversity., 2020, Plant growth-promoting traits, and biocontrol potential of fungal endophytes of *Sorghum bicolor*, *Plant Pathology*, 69(4), pp. 642–654, doi: 10.1111/ppa.13151.
44. K. Tiwari., 2015, The Future Products: Endophytic Fungal Metabolites, *Journal of Biodiversity, Bioprospecting and Development*, 2(1), pp. 1–7, doi: 10.4172/2376-0214.1000145.
45. C. Dai., L. Tian., Y. Zhao., Y. Chen., and H. Xie., 2010, Degradation of phenanthrene by the endophytic fungus *Ceratobasidium stevensii* found in *Bischofia polycarpa*, *Biodegradation*, 21(2), pp. 245–255, doi: 10.1007/s10532-009-9297-4.
46. L. Liang., H. Jun., X. Yu., G. Li., and Z. Xin., Studies on Isolation and Identification of Endophytic Fungi Strain SC13 from *Harmaceutical Plant Sabina vulgaris* Ant.and Metabolites, 2006. (<https://www.semanticscholar.org/paper/Studies-on-Isolation-and-Identification-of-Fungi-Liang-Jun/f93fd627eb4fd9b6058d7f41cd3ff0158ecee981>)
47. Cao Li., Huang Jianxin., and Li Jianfang., 2007, Fermentation Conditions of *Sinopodophyllum hexandrum* Endophytic Fungus on Production of Podophyllotoxin, *Food and Fermentation Industries*, 33(9), p. 28.
48. Amardeep Kour., Abdul S Shawl., Suriya Rehman., Phalisteem Sultan., Parvaiz Qazi., Pankaj Suden., Ravi K. Khajuria., Verdi Verma., 2008, Isolation and identification of an endophytic strain of *Fusarium oxysporum* producing podophyllotoxin from *Juniperus recurva*, *World J Microbiol Biotechnol*, 24(7), pp. 1115–1121, doi: 10.1007/s11274-007-9582-5.
49. Satish Chandra Puri., Asiya Nazir., Raman Chawla., Rajesh Arora., S. Riya Hasan., Touseef Amna., Bilal Ahmed., Vijeshwar Verma., Shikha Singh., Ravinder Sagar., Ashok Sharm., Raj Kumar., RakeshKumar Sharma., Ghulam.,

- Nabi Qazi., 2006, The endophytic fungus *Trametes hirsuta* as a novel alternative source of podophyllotoxin and related aryl tetralin lignans, *J Biotechnol*, 122(4), pp. 494–510, doi: 10.1016/j.jbiotec.2005.10.015.
50. Xiao-ming Tan., Ya-qin Zhou., Xiao-lei Zhou., Xiang-hua Xia., Ying Wei., Li-li He., Hong-zhen Tang., Li-ying Yu., 2018, Author Correction: Diversity and bioactive potential of culturable fungal endophytes of *Dysosma versipellis*; a rare medicinal plant endemic to China, *Sci Rep*, 8(1), p. 12694, doi: 10.1038/s41598-018-31009-0.
 51. R. P. Aharwal, S. Kumar, and S. S. Sandhu, “Endophytic Mycoflora as a Source of Biotherapeutic Compounds for Disease Treatment,” *J App Pharm Sci*, vol. 6, no. 10, pp. 242–254, Oct. 2016, doi: 10.7324/JAPS.2016.601034.
 52. S. Kusari., S. Zühlke., and M. Spiteller., 2009, An endophytic fungus from *Camptotheca acuminata* that produces camptothecin and analogues, *J Nat Prod*, 72(1), pp. 2–7, doi: 10.1021/np800455b.
 53. C. Ravindran., T. Naveenan., G. R. Varatharajan., R. Rajasabapathy., and R. M. Meena., 2012, Antioxidants in mangrove plants and endophytic fungal associations, *Botanica Marina*, vol. 55, no. 3, pp. 269–279, doi: 10.1515/bot-2011-0095.
 54. H. F. Stähelin and A. von Wartburg., 1991, The chemical and biological route from podophyllotoxin glucoside to etoposide: ninth Cain memorial Award lecture, *Cancer Res*, 51(1), pp. 5–15.
 55. Xu Zhang., K.P. Rakesh., C.S. Shantharam., H.M. Manukumar., A.M. Asiri., H. M. Marwani., Hua-Li Qin., 2018, Podophyllotoxin derivatives as an excellent anticancer aspirant for future chemotherapy: A key current imminent needs, *Bioorg Med Chem*, 26(2), pp. 340–355, doi: 10.1016/j.bmc.2017.11.026.
 56. V. Podwyssotzki, “Pharmakologische Studien über Podophyllum peltatum,” *Archiv f. experiment. Pathol. u. Pharmacol*, vol. 13, no. 1, pp. 29–52, Oct. 1880, doi: 10.1007/BF01833268.
 57. J. L. Hartwell and A. W. Schrecker., 1951, Components of Podophyllin. V. The Constitution of Podophyllotoxin1, *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 73, no. 6, pp. 2909–2916, doi: 10.1021/ja01150a143.
 58. X. Yu., Z. Che., and H. Xu., 2017, Recent Advances in the Chemistry and Biology of Podophyllotoxins, *Chemistry*, 23(19), pp. 4467–4526, doi: 10.1002/chem.201602472.
 59. A. M. Găman., C. Egbuna., and M.-A. Găman., 2020, Chapter 6 - Natural bioactive lead compounds effective against haematological malignancies, in *Phytochemicals as Lead Compounds for New Drug Discovery*, pp. 95–115. doi: 10.1016/B978-0-12-817890-4.00006-8. [60]A. Koulman, A. C. Beekman, N. Pras, and W. J. Quax, “The bioconversion process of deoxypodophyllotoxin with *Linum flavum* cell cultures,” *Planta Med*, vol. 69, no. 8, pp. 739–744, Aug. 2003, doi: 10.1055/s-2003-42785.
 60. A. Koulman., A. C. Beekman., N. Pras., and W. J. Quax., 2003, The bioconversion process of deoxypodophyllotoxin with *Linum flavum* cell cultures, *Planta Med*, 69(8), pp. 739–744, doi: 10.1055/s-2003-42785.

61. Y. Kim., S.-B. Kim., Y.-J. You., and B.-Z. Ahn., 2002, Deoxypodophyllotoxin; the cytotoxic and antiangiogenic component from *Pulsatilla koreana*, *Planta Med*, 68(3), pp. 271–274, doi: 10.1055/s-2002-23140.
62. J. J. Chen., Y. L. Chang., C. M. Teng., and I. S. Chen., 2000, Anti-platelet aggregation alkaloids and lignans from *Hernandia nymphaeifolia*, *Planta Med*, 66(3), pp. 251–256, doi: 10.1055/s-2000-8562.
63. Lin CX., Lee E., Jin MH., Yook J., Quan Z., Ha K., Moon TC., Kim MJ., Kim KJ., Lee SH., Chang HW., 2006, Deoxypodophyllotoxin (DPT) inhibits eosinophil recruitment into the airway and Th2 cytokine expression in an OVA-induced lung inflammation, *Planta Med*, 72(9), pp. 786–791, doi: 10.1055/s-2006-931607.
65. Inamori Y., Kato Y., Kubo M., Baba K., Ishida T., Nomoto K., Kozawa M., 1985, The biological actions of deoxypodophyllotoxin (anthricin). I. Physiological activities and conformational analysis of deoxypodophyllotoxin, *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 33(2), pp. 704–709, doi: 10.1248/cpb.33.704.
66. Lee SH, Son MJ., Ju HK., Lin CX., Moon TC., Choi HG., Son JK., Chang HW., 2004, Dual inhibition of cyclooxygenases-2 and 5-lipoxygenase by deoxypodophyllotoxin in mouse bone marrow-derived mast cells, *Biol Pharm Bull*, 27(6), pp. 786–788, doi: 10.1248/bpb.27.786.
67. Lin CX., Son MJ., Ju HK., Moon TC., Lee E., Kim SH., Kim MJ., Son JK., Lee SH., Chang HW., 2004, Deoxypodophyllotoxin, a naturally occurring lignan, inhibits the passive cutaneous anaphylaxis reaction, *Planta Med*, 70(5), pp. 474–476, doi: 10.1055/s-2004-818981.
68. H. Choi., J. Lee., H.-J. Shin., B.-G. Lee., I. Chang., and J.-S. Hwang., 2004, Deoxypodophyllotoxin reduces skin pigmentation of brown Guinea pigs, *Planta Med*, 70(4), pp. 378–380, doi: 10.1055/s-2004-818955.
69. Hua-yang Fan., Zhuo-li Zhu., Hong-chun Xian., Hao-fan Wang., Bing-jun Chen., Ya-Jie Tang., Ya-ling Tang., Xin-hua Liang., 2021, Insight Into the Molecular Mechanism of Podophyllotoxin Derivatives as Anticancer Drugs, *Front Cell Dev Biol*, 9(709075), doi: 10.3389/fcell.2021.709075.
70. C. Canel., R. Moraes., F. Dayan., and D. Ferreira., 2000, Molecules of interest: Podophyllotoxin, (<https://www.semanticscholar.org/paper/Molecules-of-interest%3A-Podophyllotoxin-Canel-Moraes/12434ec5e2ddef0c2981bc9ebe8f12c4f61f8cc5>)
71. H. Ardalani, A. Avan, and M. Ghayour-Mobarhan, “Podophyllotoxin: a novel potential natural anticancer agent,” *Avicenna J Phytomed*, vol. 7, no. 4, pp. 285–294, 2017.
72. U. Dhar, S. Manjkhola, M. Joshi, A. Bhatt, A. K. Bisht, and M. Joshi, “Current status and future strategy for development of medicinal plants sector in Uttaranchal, India,” *Current Science*, vol. 83, no. 8, pp. 956–964, 2002.
73. K.-H. Lee and Z. Xiao, “Lignans in treatment of cancer and other diseases†,” *Phytochemistry Reviews*, vol. 2, no. 3, pp. 341–362, Jan. 2003, doi: 10.1023/B:PHYT.0000045495.59732.58.

74. R. M. Moraes, C. Burandt, M. Ganzer, X. LI, I. Khan, and C. Canel, "The American mayapple revisited—podophyllum peltatum—still a potential cash crop?," *Econ Bot*, vol. 54, no. 4, pp. 471–476, Oct. 2000, doi: 10.1007/BF02866546.
75. P. M. Dewick, *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. Wiley, 2002.
76. Wrasidlo W., Gaedicke G., Guy RK., Renaud J., Pitsinos E., Nicolaou KC., Reisfeld RA., Lode HN., 2002, A Novel 2'-(N-Methylpyridinium Acetate) Prodrug of Paclitaxel Induces Superior Antitumor Responses in Preclinical Cancer Models, *Bioconjugate Chem*, 13(5), pp. 1093–1099, doi: 10.1021/bc0200226.
77. J.-Y. Chen, Y.-A. Tang, W.-S. Li, Y.-C. Chiou, J.-M. Shieh, and Y.-C. Wang, "A synthetic podophyllotoxin derivative exerts anti-cancer effects by inducing mitotic arrest and pro-apoptotic ER stress in lung cancer preclinical models," *PLoS One*, vol. 8, no. 4, p. e62082, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0062082.
78. P. Komericki, M. Akkilić-Materna, T. Strimitzer, and W. Aberer, "Efficacy and safety of imiquimod versus podophyllotoxin in the treatment of anogenital warts," *Sex Transm Dis*, vol. 38, no. 3, pp. 216–218, Mar. 2011, doi: 10.1097/OLQ.0b013e3181f68ebb.
79. Lacey CJ., Goodall RL., Tennvall GR., Maw R., Kinghorn GR., Fisk PG., Barton S., Byren I., 2003, Randomised controlled trial and economic evaluation of podophyllotoxin solution, podophyllotoxin cream, and podophyllin in the treatment of genital warts, *Sex Transm Infect*, 79(4), pp. 270–275, doi: 10.1136/sti.79.4.270.
80. P. I. Clark and M. L. Slevin, "The Clinical Pharmacology of Etoposide and Teniposide," *Clin-Pharmacokinet*, vol. 12, no. 4, pp. 223–252, Apr. 1987, doi: 10.2165/00003088-198712040-00001.
81. Paz-Ares L., Dvorkin M., Chen Y., Reinmuth N., Hotta K., Trukhin D., Statsenko G., Hochmair MJ., Özgüroğlu M., Ji JH, Voitko O., Poltoratskiy A., Ponce S., Verderame F., Havel L., Bondarenko I., Kazarnowicz A., Losonczy G., Conev NV., Armstrong J., Byrne N., Shire N., Jiang H., Goldman JW., 2019, Durvalumab plus platinum-etoposide versus platinum-etoposide in first-line treatment of extensive-stage small-cell lung cancer (CASPIAN): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial, *Lancet*, 394(10212), pp. 1929–1939, doi: 10.1016/S0140-6736(19)32222-6.
82. Liu JF., Sang CY., Xu XH., Zhang LL., Yang X., Hui L., Zhang JB., Chen SW., 2013, Synthesis and cytotoxic activity on human cancer cells of carbamate derivatives of 4β-(1,2,3-triazol-1-yl) podophyllotoxin, *Eur J Med Chem*, 64, pp. 621–628, doi: 10.1016/j.ejmech.2013.03.068.
83. Seidel V., Windhövel J., Eaton G., Alfermann AW., Arroo RR., Medarde M., Petersen M., Woolley JG., 2002, Biosynthesis of podophyllotoxin in *Linum album* cell cultures, *Planta*, 215(6), pp. 1031–1039, doi: 10.1007/s00425-002-0834-1.
84. M. Gordaliza, P. A. García, J. M. Miguel del Corral, M. A. Castro, and M. A. Gómez-Zurita, "Podophyllotoxin: distribution, sources, applications and new

- cytotoxic derivatives,” *Toxicon*, vol. 44, no. 4, pp. 441–459, Sept. 2004, doi: 10.1016/j.toxicon.2004.05.008.
85. Y. You, “Podophyllotoxin Derivatives: Current Synthetic Approaches for New Anticancer Agents,” *Current Pharmaceutical Design*, vol. 11, no. 13, pp. 1695–1717, May 2005, doi: 10.2174/1381612053764724.
 86. W. Lau and E. S. Sattely, “Six enzymes from mayapple that complete the biosynthetic pathway to the etoposide aglycone,” *Science*, vol. 349, no. 6253, pp. 1224–1228, Sept. 2015, doi: 10.1126/science.aac7202.
 87. D. Biswas, P. Biswas, S. Nandy, A. Mukherjee, D. K. Pandey, and A. Dey, “Endophytes producing podophyllotoxin from *Podophyllum* sp. and other plants: A review on isolation, extraction and bottlenecks,” *South African Journal of Botany*, vol. 134, pp. 303–313, Nov. 2020, doi: 10.1016/j.sajb.2020.02.038.
 88. R. E. Higgs, J. A. Zahn, J. D. Gygi, and M. D. Hilton, “Rapid Method To Estimate the Presence of Secondary Metabolites in Microbial Extracts,” *Appl Environ Microbiol*, vol. 67, no. 1, pp. 371–376, Jan. 2001, doi: 10.1128/AEM.67.1.371-376.2001.
 89. J. Smedsgaard, “Micro-scale extraction procedure for standardized screening of fungal metabolite production in cultures,” *Journal of Chromatography A*, vol. 760, no. 2, pp. 264–270, Jan. 1997, doi: 10.1016/S0021-9673(96)00803-5.
 90. Andriy Synytsya., Jutamart Monkai., Roman Bleha., Anna Macurkova., Tomas Ruml., Juhee Ahn., Ekachai Chukeatirote., 2017, Antimicrobial activity of crude extracts prepared from fungal mycelia, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(3), pp. 257–261, doi: 10.1016/j.apjtb.2016.12.011.
 91. M. Yousefzadi, M. Sharifi, N. A. Chashmi, M. Behmanesh, and A. Ghasempour, “Optimization of podophyllotoxin extraction method from *Linum album* cell cultures,” *Pharm Biol*, vol. 48, no. 12, pp. 1421–1425, Dec. 2010, doi: 10.3109/13880209.2010.489564.
 92. Houbraken J., Kocsubé S., Visagie CM., Yilmaz N., Wang XC., Meijer M., Kraak B., Hubka V., Bensch K., Samson RA., Frisvad JC., 2020, Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (Eurotiales): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species, *Stud Mycol*, 95, pp. 5–169, doi: 10.1016/j.simyco.2020.05.002.
 93. C.M. Visagie., J. Houbraken., J.C. Frisvad., S.B. Hong., C.H.W. Klaassen., G. Perrone., K.A. Seifert., J. Varga., T. Yaguchi., R.A. 2014., 2014, Samson, Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*, *Stud Mycol*, 78, pp. 343–371, doi: 10.1016/j.simyco.2014.09.001.
 94. Yang SQ., Mándi A., Li XM., Liu H., Li X., Balázs Király S., Kurtán T., Wang BG., 2021, Separation and configurational assignment of stereoisomeric phenalenones from the marine mangrove-derived fungus *Penicillium herquei* MA-370, *Bioorg Chem*, 106, p. 104477, , doi: 10.1016/j.bioorg.2020.104477.
 95. Yu JS., Jeong SY., Li C., Oh T., Kwon M., Ahn JS., Ko SK., Ko YJ., Cao S., Kim KH., 2022, New phenalenone derivatives from the Hawaiian volcanic soil-associated fungus *Penicillium herquei* FT729 and their inhibitory effects on indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1), *Arch Pharm Res*, 45(2), pp. 105–113, , doi: 10.1007/s12272-022-01372-8.

96. Long KY., Dai DC., Zheng CJ., Wang YT., Song XM., Chen X., Zhou XM., Chen GY., 2023, Three new long-chain polyenes from the mangrove-derived fungus *Penicillium herquei* JX4, *J Asian Nat Prod Res*, 25(5), pp. 422–428, , doi: 10.1080/10286020.2022.2104718.
97. Zhou XM., Zheng CJ., Song XM., Tang MM., Yang JY., Yang X., Peng SJ., Cai J., Chen GY., 2019, Bioactive acetaminophen derivatives from *Penicillium herquei* JX4, *Fitoterapia*, 139, p. 104400, doi: 10.1016/j.fitote.2019.104400.
98. Luo ZW., Tang MM., Zhou XM., Song XM., Yi JL., Zhang B., Yang JY., Chen GY., 2021, Five New Triene Derivatives from the Fungus *Penicillium herquei* JX4, *Chem Biodivers*, 18(5), p. e2100027, doi: 10.1002/cbdv.202100027.
99. Jeanne Ropars., Ricardo C Rodríguez de la Vega., Manuela López-Villavicencio., Jérôme Gouzy., Joëlle Dupont., Dominique Swennen., Emilie Dumas., Tatiana Giraud., and Antoine Branca., 2025, Diversity and Mechanisms of Genomic Adaptation in *Penicillium*, in *Aspergillus and Penicillium in the post-genomic era*. (<https://hal.science/hal-01302706>)
100. F. F. of B. D. of E. G. and M. S. of M. Fierro, S. Gutierrez, B. Diez, and J. F. Martin, “Resolution of four large chromosomes in penicillin-producing filamentous fungi: the penicillin gene cluster is located on chromosome 2 (9.6 Mb) in *Penicillium notatum* and chromosome 1 (10.4 Mb) in *Penicillium chrysogenum*,” *Molecular and General Genetics (Germany)*, vol. 241, no. 5–6, 1993, Accessed: Aug. 11, 2025. [Online]. Available: <https://agris.fao.org/search/en/providers/122438/records/647758e15eb437ddff76135f>
101. Yuen KY., Pascal G., Wong SS., Glaser P., Woo PC., Kunst F., Cai JJ., Cheung EY., Médigue C., Danchin A., 2003, Exploring the *Penicillium marneffei* genome, *Arch Microbiol*, 179(5), pp. 339–353, doi: 10.1007/s00203-003-0533-8.
102. A. Rhoads and K. F. Au, “PacBio Sequencing and Its Applications,” *Genomics Proteomics Bioinformatics*, vol. 13, no. 5, pp. 278–289, Oct. 2015, doi: 10.1016/j.gpb.2015.08.002.
103. Yin G., Zhao H., Pennerman KK., Jurick WM., Fu M., Bu L., Guo A., Bennett JW., 2021, Genomic Analyses of *Penicillium* Species Have Revealed Patulin and Citrinin Gene Clusters and Novel Loci Involved in Oxylin Production, *J Fungi (Basel)*, 7(9), p. 743, doi: 10.3390/jof7090743.
104. Joardar V., Abrams NF., Hostetler J., Paukstelis PJ., Pakala S., Pakala SB., Zafar N., Abolude OO., Payne G., Andrianopoulos A., Denning DW., Nierman WC., 2012, Sequencing of mitochondrial genomes of nine *Aspergillus* and *Penicillium* species identifies mobile introns and accessory genes as main sources of genome size variability, *BMC Genomics*, 13, p. 698, doi: 10.1186/1471-2164-13-698.
105. Pham HM., Le DT., Le LT., Chu PTM., Tran LH., Pham TT., Nguyen HM., Luu TT., Hoang H., Chu HH., 2023, A highly quality genome sequence of *Penicillium oxalicum* species isolated from the root of *Ixora chinensis* in Vietnam,” *G3 (Bethesda)*, 13(2), p. jkac300, doi: 10.1093/g3journal/jkac300.

106. Sato A., Oshima K., Noguchi H., Ogawa M., Takahashi T., Oguma T., Koyama Y., Itoh T., Hattori M., Hanya Y., 2011, Draft Genome Sequencing and Comparative Analysis of *Aspergillus sojae* NBRC4239, *DNA Res*, 18(3), pp. 165–176, doi: 10.1093/dnares/dsr009.
107. X. Wu, N. Ibrahim, Y. Liang, and X. Liu, “Screening and Genomic Analysis of Alkaloid-Producing Endophytic Fungus *Fusarium solani* Strain MC503 from *Macleaya cordata*,” *Microorganisms*, vol. 12, no. 6, p. 1088, June 2024, doi: 10.3390/microorganisms12061088.
108. Hashem AH., Attia MS., Kandil EK., Fawzi MM., Abdelrahman AS., Khader MS., Khodaira MA., Emam AE., Goma MA., Abdelaziz AM., 2023, Bioactive compounds and biomedical applications of endophytic fungi: a recent review, *Microb Cell Fact*, 22, p. 107, doi: 10.1186/s12934-023-02118-x.
109. A. Singh, D. K. Singh, R. N. Kharwar, J. F. White, and S. K. Gond, “Fungal Endophytes as Efficient Sources of Plant-Derived Bioactive Compounds and Their Prospective Applications in Natural Product Drug Discovery: Insights, Avenues, and Challenges,” *Microorganisms*, vol. 9, no. 1, p. 197, Jan. 2021, doi: 10.3390/microorganisms9010197.
110. Alam B., Li J., Gě Q., Khan MA., Gōng J., Mehmood S., Yuán Y., Gōng W., 2021, Endophytic Fungi: From Symbiosis to Secondary Metabolite Communications or Vice Versa?, *Front Plant Sci*, 12, p. 791033, doi: 10.3389/fpls.2021.791033.
111. Pathak, P., Rai, V. K., Can, H., Singh, S. K., Kumar, D., Bhardwaj, N., Roychowdhury, R., de Azevedo, L. C. B., Kaushalendra, Verma, H., & Kumar, A., 2022, “Plant-Endophyte Interaction during Biotic Stress Management,” *Plants (Basel)*, 11(17), p. 2203, doi: 10.3390/plants11172203.
112. Ali A Badawy., Modhi O Alotaibi., Amer M Abdelaziz., Mahmoud S Osman., Ahmed M A Khalil., Ahmed M Saleh., Afrah E Mohammed., Amr H Hashem., 2021, Enhancement of Seawater Stress Tolerance in Barley by the Endophytic Fungus *Aspergillus ochraceus*, *Metabolites*, 11(7), p. 428, , doi: 10.3390/metabo11070428..
113. A. A. Ogbe, J. F. Finnie, and J. Van Staden, “The role of endophytes in secondary metabolites accumulation in medicinal plants under abiotic stress,” *South African Journal of Botany*, vol. 134, no. Complete, pp. 126–134, 2020, doi: 10.1016/j.sajb.2020.06.023.
114. S. B. Zotchev, “Unlocking the potential of bacterial endophytes from medicinal plants for drug discovery,” *Microb Biotechnol*, vol. 17, no. 2, p. e14382, Feb. 2024, doi: 10.1111/1751-7915.14382.
115. Trần Hồ Quang, Hoàng Thị Thu Hằng, Nguyễn Thị Thanh Hương, Đỗ Tiến Phát, and Phạm Bích Ngọc, “Nghiên cứu khai thác vi nấm nội sinh trên các cây dược liệu bản địa nhằm thu nhận podophyllotoxin hoặc một số hợp chất có hoạt tính sinh dược học khác,” Báo cáo tổng hợp kết quả thực hiện đề tài cấp Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam TĐCNSH.01/20-22, 2024.
116. J.-X. Huang, J. Zhang, X.-R. Zhang, K. Zhang, X. Zhang, and X.-R. He, “*Mucor fragilis* as a novel source of the key pharmaceutical agents podophyllotoxin and kaempferol,” *Pharm Biol*, vol. 52, no. 10, pp. 1237–1243, Oct. 2014, doi: 10.3109/13880209.2014.885061.

117. Nguyễn Thị Minh Huyền, “Nghiên cứu công nghệ sản xuất sinh khối nấm thượng hoàng (*Phellinus linteus*) và ứng dụng để sản xuất thực phẩm chức năng,” Báo cáo tổng hợp đề tài Bộ Công Thương ĐT.04.18/CNSHCB, 2020.
118. D. K. Gogoi, H. P. Deka Boruah, R. Saikia, and T. C. Bora, “Optimization of process parameters for improved production of bioactive metabolite by a novel endophytic fungus *Fusarium* sp. DF2 isolated from *Taxus wallichiana* of North East India,” *World J Microbiol Biotechnol*, vol. 24, no. 1, pp. 79–87, Jan. 2008, doi: 10.1007/s11274-007-9442-3.
119. L. Miao, T. F. N. Kwong, and P.-Y. Qian, “Effect of culture conditions on mycelial growth, antibacterial activity, and metabolite profiles of the marine-derived fungus *Arthrrium* c.f. *saccharicola*,” *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 72, no. 5, pp. 1063–1073, Oct. 2006, doi: 10.1007/s00253-006-0376-8.
120. S. Narayanaswamy, *Plant Cell and Tissue Culture*. Tata McGraw-Hill Publishing Company, 1994.
121. O. S. Ling, A. L. P. Kiong, and S. Hussein, “ESTABLISHMENT AND OPTIMISATION OF GROWTH PARAMETERS FOR,” 2008.
122. R. Yan, Z. Zhang, Y. Wang, H. Yang, Q. Zeng, and D. Zhu, “Efficient strategy for maintaining and enhancing the huperzine A production of *Shiraia* sp. Slf14 through inducer elicitation,” *J Ind Microbiol Biotechnol*, vol. 41, no. 7, pp. 1175–1179, July 2014, doi: 10.1007/s10295-014-1461-0.
123. Doyle, J.J. and Doyle, and J.L., “A Rapid DNA Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue,” *Phytochemical Bulletin*, vol. 19, pp. 11–15, 1987.
124. M. Ahmad, H. Nangyal, M. Imran, and F. Ullah, “Optimization of Protocol for Surface Sterilization and Callus Induction for Three Rice Varieties,” *Environ. Sci.*, 2016.
125. S. Kusari, S. Singh, and C. Jayabaskaran, “Rethinking production of Taxol® (paclitaxel) using endophyte biotechnology,” *Trends Biotechnol*, vol. 32, no. 6, pp. 304–311, June 2014, doi: 10.1016/j.tibtech.2014.03.011.
126. M. Klich, “Identification of common *Aspergillus* species,” Utrecht, the Netherlands: Amer Society for Microbiology., 2002, pp. 1–116. Accessed: Jan. 09, 2025. [Online]. Available: <https://www.semanticscholar.org/paper/Identification-of-common-Aspergillus-species-Klich/2f7c4d8d5f5ee8beeb4c829c912ab7f4dab7b56a>
127. Nguyễn Lâm Dũng, *Vi nấm*. Khoa học kỹ thuật, 1982.
128. Houburken J., Kocsubé S., Visagie CM., Yilmaz N., Wang XC., Meijer M., Kraak B., Hubka V., Bensch K., Samson RA., Frisvad JC., 2020, Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (Eurotiales): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species, *Stud Mycol*, 95, pp. 5–169, doi: 10.1016/j.simyco.2020.05.002.
129. Landeweert R., Leeflang P., Kuyper TW., Hoffland E., Rosling A., Wernars K., Smit E., 2003, Molecular Identification of Ectomycorrhizal Mycelium in Soil Horizons, *Appl Environ Microbiol*, 69(1), pp. 327–333, doi: 10.1128/AEM.69.1.327-333.2003.
130. S. Kumar, G. Stecher, and K. Tamura, “MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets,” *Mol Biol Evol*, vol. 33, no. 7, pp. 1870–1874, July 2016, doi: 10.1093/molbev/msw054.

131. Kanieski MR, Longhi SJ, and Soares PRC, "(PDF) Methods for Biodiversity Assessment: Case Study in an Area of Atlantic Forest in Southern Brazil," in *ResearchGate*, Selected Studies in Biodiversity, 2018, pp. 45-58. doi: 10.5772/intechopen.71824.
132. M. Katoch, S. Phull, S. Vaid, and S. Singh, "Diversity, Phylogeny, anticancer and antimicrobial potential of fungal endophytes associated with *Monarda citriodora* L.," *BMC Microbiol*, vol. 17, no. 1, p. 44, Mar. 2017, doi: 10.1186/s12866-017-0961-2.
133. P. Kusari, S. Kusari, M. Spiteller, and O. Kayser, "Endophytic fungi harbored in *Cannabis sativa* L.: diversity and potential as biocontrol agents against host plant-specific phytopathogens," *Fungal Diversity*, vol. 60, no. 1, pp. 137–151, May 2013, doi: 10.1007/s13225-012-0216-3.
134. J. A. Shah and A. K. Pandit, "Application of diversity indices to crustacean community of Wular Lake, Kashmir Himalaya," *Int J Biodivers Conserv*, vol. 5, pp. 311–316, 2013.
135. A. G. Williams, "Staining reactions for the detection of hemicellulose-degrading bacteria," *FEMS Microbiology Letters*, vol. 20, no. 2, pp. 253–258, Oct. 1983, doi: 10.1111/j.1574-6968.1983.tb00127.x.
136. M. E. Puente, Y. Bashan, C. Y. Li, and V. K. Lebsky, "Microbial Populations and Activities in the Rhizoplane of Rock-Weathering Desert Plants. I. Root Colonization and Weathering of Igneous Rocks," *Plant Biology*, vol. 6, no. 5, pp. 629–642, 2004, doi: 10.1055/s-2004-821100.
137. D. Í. de Melo Pereira *et al.*, "Isolation and Identification of Pigment-Producing Endophytic Fungi from the Amazonian Species *Fridericia chica*," *J Fungi (Basel)*, vol. 10, no. 1, p. 77, Jan. 2024, doi: 10.3390/jof10010077.
138. Gupta., D. K., Verma., M. K., Lal., S., Anand., R., Khajuria., R. K., Kitchlu., S., and Koul, S., 2014, Extraction Studies of *Podophyllum Hexandrum* Using Conventional and Nonconventional Methods by Hplc–Uv–Dad, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 37(2), pp. 259–273, doi: 10.1080/10826076.2012.745134.
139. J. P. Hughes, S. Rees, S. B. Kalindjian, and K. L. Philpott, "Principles of early drug discovery," *Br J Pharmacol*, vol. 162, no. 6, pp. 1239–1249, Mar. 2011, doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.01127.x.
140. W. Medawar, P. Strehaiano, and M.-L. Délia, "Yeast growth: lag phase modelling in alcoholic media," *Food Microbiology*, vol. 20, no. 5, pp. 527–532, Oct. 2003, doi: 10.1016/S0740-0020(02)00170-3.
141. L. Hou, Y. Chen, C. Ma, J. Liu, C. Ligu, and A. Ma, "Effects of Environmental Factors on Dimorphic Transition of the Jelly Mushroom *Tremella Fuciformis*," *Cryptogamie, Mycologie*, vol. 32, no. 4, pp. 421–428, Dec. 2011, doi: 10.7872/crym.v32.iss4.2011.421.
142. E. Lee, H.-S. Park, C.-J. Lee, W.-S. Kong, and C.-D. Koo, "Suitable Conditions for Mycelial Culture of *Tremella fuciformis*," *The Korean Journal of Mycology*, vol. 47, no. 1, pp. 1–12, Tháng Ba 2019, doi: 10.4489/KJM.20190001.
143. M. A. Almalki, "In-Vitro Screening and Biosynthesis of Secondary Metabolites from a New *Streptomyces* sp. SA1 from a Marine Environment," *Current*

- Pharmaceutical Biotechnology*, vol. 21, no. 13, pp. 1333–1341, Nov. 2020, doi: 10.2174/1389201021666200622120850.
144. Changxing L., Galani S., Hassan FU., Rashid Z., Naveed M, Fang D., Ashraf A, Qi W., Arif A., Saeed M., Chishti AA., Jianhua L., 2020, Biotechnological approaches to the production of plant-derived promising anticancer agents: An update and overview, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 132(110918), doi: 10.1016/j.biopha.2020.110918.
 145. Rai N., Kumari Keshri P., Verma A., Kamble SC., Mishra P., Barik S., Kumar Singh S., Gautam V., 2021, Plant associated fungal endophytes as a source of natural bioactive compounds, *Mycology*, 12(3), pp. 139–159, doi: 10.1080/21501203.2020.1870579.
 146. Sobolevskaya MP., Leshchenko EV., Hoai TP., Denisenko VA., Dyshlovoy SA., Kirichuk NN., Khudyakova YV., Kim NY., Berdyshev DV., Pislyagin EA, Kuzmich AS., Gerasimenko AV., Popov RS., von Amsberg G., Antonov AS., Afiyatulloev SS., 2016, Pallidopenillines: Polyketides from the Alga-Derived Fungus *Penicillium thomii* Maire KMM 4675, *J Nat Prod*, 79(12), pp. 3031–3038, doi: 10.1021/acs.jnatprod.6b00624.
 147. K. J. Lee., Y. C. Oh., W. K. Cho., and J. Y. Ma., 2015, Antioxidant and Anti-Inflammatory Activity Determination of One Hundred Kinds of Pure Chemical Compounds Using Offline and Online Screening HPLC Assay, *Evid Based Complement Alternat Med*, vol. 2015, p. 165457, doi: 10.1155/2015/165457.
 148. P. Kumar, T. Pal, N. Sharma, V. Kumar, H. Sood, and R. S. Chauhan, “Expression analysis of biosynthetic pathway genes vis-à-vis podophyllotoxin content in *Podophyllum hexandrum* Royle,” *Protoplasma*, vol. 252, no. 5, pp. 1253–1262, Sept. 2015, doi: 10.1007/s00709-015-0757-x.
 149. Shah Z., Gohar UF., Jamshed I., Mushtaq A., Mukhtar H., Zia-Ui-Haq M., Toma SI., Manea R., Moga M., Popovici B., 2021, Podophyllotoxin: History, Recent Advances and Future Prospects, *Biomolecules*, 11(4), p. 603, doi: 10.3390/biom11040603.
 150. Motyka S., Jaferník K, Ekiert H., Sharifi-Rad J., Calina D., Al-Omari B., Szopa A., Cho WC., 2023, Podophyllotoxin and its derivatives: Potential anticancer agents of natural origin in cancer chemotherapy, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 158, p. 114145, doi: 10.1016/j.biopha.2022.114145.
 151. K. Palaniyandi and W. Jun, “Low temperature enhanced the podophyllotoxin accumulation vis-a-vis its biosynthetic pathway gene(s) expression in *Dyosma versipellis* (Hance) M. Cheng – A pharmaceutically important medicinal plant,” *Process Biochemistry*, vol. 95, pp. 197–203, Aug. 2020, doi: 10.1016/j.procbio.2020.02.009.
 152. M. Sautour, P. Dantigny, C. Divies, and M. Bensoussan, “A temperature-type model for describing the relationship between fungal growth and water activity,” *Int J Food Microbiol*, vol. 67, no. 1–2, pp. 63–69, July 2001, doi: 10.1016/s0168-1605(01)00471-8.
 153. Nguyễn Văn Giang N. T. B. T. and Nguyễn Duy Trình T. T. H., “Ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy đến sinh trưởng hệ sợi của nấm *Phellinus linteus*,” *VJST B*, vol. 63, no. 2, Art. no. 2, Feb. 2021, doi: 10.31276/VJST.63(2).39-43.
 154. B. T. T. Nguyen, V. V. Le, H. T. T. Nguyen, L. T. Nguyen, T. T. T. Tran, and N. X. Ngo, “Nutritional requirements for the enhanced mycelial growth and

- yield performance of *Trametes versicolor*,” *J App Biol Biotech*, vol. 9, no. 1, pp. 1–7, Jan. 2021, doi: 10.7324/JABB.2021.9101.
155. C. -H. Dong and Y. -J. Yao, “Nutritional requirements of mycelial growth of *Cordyceps sinensis* in submerged culture,” *Journal of Applied Microbiology*, vol. 99, no. 3, pp. 483–492, Sept. 2005, doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02640.x.
 156. Nguyen GT., Nguyen HTH., Tran HT., Tran HT., Ho AN., Tran QH., Pham NB., 2023, “Enhanced podophyllotoxin production of endophyte *Fusarium proliferatum* TQN5T by host extract and phenylalanine,” *Appl Microbiol Biotechnol*, 107(17), pp. 5367–5378, doi: 10.1007/s00253-023-12659-1.
 157. Uzma F., Mohan CD., Hashem A., Konappa NM., Rangappa S., Kamath PV., Singh BP., Mudili V., Gupta VK., Siddaiah CN., Chowdappa S., Alqarawi AA., Abd Allah EF., 2018, Endophytic Fungi-Alternative Sources of Cytotoxic Compounds: A Review, *Front Pharmacol*, 9, p. 309, doi: 10.3389/fphar.2018.00309.
 158. S. Mishra, P. K. Sahu, V. Agarwal, and N. Singh, “Exploiting endophytic microbes as micro-factories for plant secondary metabolite production,” *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 105, no. 18, pp. 6579–6596, Sept. 2021, doi: 10.1007/s00253-021-11527-0.
 159. M. A. Naranjo-Ortiz and T. Gabaldón, “Fungal evolution: diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi,” *Biol Rev Camb Philos Soc*, vol. 94, no. 6, pp. 2101–2137, Dec. 2019, doi: 10.1111/brev.12550.
 160. S. Gupta, P. Chaturvedi, M. G. Kulkarni, and J. Van Staden, “A critical review on exploiting the pharmaceutical potential of plant endophytic fungi,” *Biotechnol Adv*, vol. 39, p. 107462, 2020, doi: 10.1016/j.biotechadv.2019.107462.
 161. M. R. Kanieski, S. J. Longhi, P. R. C. Soares, M. R. Kanieski, S. J. Longhi, and P. R. C. Soares, “Methods for Biodiversity Assessment: Case Study in an Area of Atlantic Forest in Southern Brazil,” in *Selected Studies in Biodiversity*, IntechOpen, 2017. doi: 10.5772/intechopen.71824.
 162. G. Dhayanithy, K. Subban, and J. Chelliah, “Diversity and biological activities of endophytic fungi associated with *Catharanthus roseus*,” *BMC Microbiol*, vol. 19, no. 1, p. 22, Jan. 2019, doi: 10.1186/s12866-019-1386-x.
 163. R. H. Whittaker, “Dominance and Diversity in Land Plant Communities: Numerical relations of species express the importance of competition in community function and evolution,” *Science*, vol. 147, no. 3655, pp. 250–260, Jan. 1965, doi: 10.1126/science.147.3655.250.
 164. Lee, Ji-Hyeok, Zhang, Chao, Ko, Ju-Young, Lee, Jung-Suck, and Jeon, You-Jin, “Evaluation on Anticancer Effect Against HL-60 Cells and Toxicity in vitro and in vivo of the Phenethyl Acetate Isolated from a Marine Bacterium *Streptomyces griseus*,” *Fisheries and aquatic sciences*, vol. 18, no. 1, pp. 35–44, Tháng Ba 2015, doi: 10.5657/FAS.2015.0035.
 165. Z. Tayarani-Najaran, F.-S. Makki, N.-S. Alamolhodaei, M. Mojarab, and S. A. Emami, “Cytotoxic and apoptotic effects of different extracts of *Artemisia biennis* Willd. on K562 and HL-60 cell lines,” *Iran J Basic Med Sci*, vol. 20, no. 2, pp. 166–171, Feb. 2017, doi: 10.22038/ijbms.2017.8242.

166. H. T. Nguyen, D. V. Ho, P. D. Q. Nguyen, H. Q. Vo, T. T. Do, and A. Raal, "Cytotoxic Evaluation of Compounds Isolated from the Aerial Parts of *Hedyotis pilulifera* and Methanol Extract of *Inonotus obliquus*," *Natural Product Communications*, vol. 13, no. 8, p. 1934578X1801300805, Aug. 2018, doi: 10.1177/1934578X1801300805.
167. M. S. Rahaman, M. A. Siraj, S. Sultana, V. Seidel, and M. A. Islam, "Molecular Phylogenetics and Biological Potential of Fungal Endophytes From Plants of the Sundarbans Mangrove," *Front Microbiol*, vol. 11, p. 570855, Nov. 2020, doi: 10.3389/fmicb.2020.570855.
168. D. Torres-Mendoza, H. E. Ortega, and L. Cubilla-Rios, "Patents on Endophytic Fungi Related to Secondary Metabolites and Biotransformation Applications," *J Fungi (Basel)*, vol. 6, no. 2, p. 58, May 2020, doi: 10.3390/jof6020058.
169. S. Hua., 2003, Select of producing podophyllotoxin endophytic fungi from podophyllin plant, *Natural Product Research and Development*, <https://www.semanticscholar.org/paper/select-of-producing-podophyllotoxin-endophytic-from-Hua/e7d2c2ae9046963a858831e10411ead38e026220>
170. S. Wachtel-Galor, J. Yuen, J. A. Buswell, and I. F. F. Benzie, "Ganoderma lucidum (Lingzhi or Reishi): A Medicinal Mushroom," in *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*, 2nd ed., I. F. F. Benzie and S. Wachtel-Galor, Eds., Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis, 2011. Accessed: Apr. 11, 2025. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92757/>
171. W. A. A. Q. I. Wan Mohtar, "Production and bioactivity of *Ganoderma lucidum* BCCM 31549 exopolysaccharide using submerged liquid fermentation."
172. Lenta., Bruno Ndjakou., Ngatchou., Jules., Frese., Marcel., Ladoh-Yemeda., Flora., Voundi., Steve., Nardella., Flore., Michalek., Carmela., Wibberg., Daniel., Ngouela., Silvère., Tsamo., Etienne., Kaiser., Marcel., Kalinowski., Jörn and Sewald., Norbert., 2016, Purpureone, an antileishmanial ergochrome from the endophytic fungus *Purpureocillium lilacinum*, *Zeitschrift für Naturforschung B*, 71(11), pp. 1159–1167, doi: 10.1515/znB-2016-0128.
173. M. S. Park, J. J. Fong, S.-Y. Oh, K. K. Kwon, J. H. Sohn, and Y. W. Lim, "Marine-derived *Penicillium* in Korea: diversity, enzyme activity, and antifungal properties," *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 106, no. 2, pp. 331–345, Aug. 2014, doi: 10.1007/s10482-014-0205-5.
174. S. R. M. Ibrahim., 2018, Bioactive γ -butyrolactones from Endophytic Fungus *Aspergillus versicolor*, *International Journal of Pharmacology*, Accessed: Apr. 13, 2025. Available: https://www.academia.edu/122935685/Bioactive_%CE%B3_butyrolactones_from_Endophytic_Fungus_AspERGILLUS_versicolor
175. S. M, B. Tr, S. K. Kk, and P. Hs, "Diversity and biological activities of fungal root endophytes of *Hemidesmus indicus* (L.) R. Br.," *J Pharmacogn Phytochem*, vol. 8, no. 1, pp. 273–280, 2019.
176. Corrêa RC., Rhoden SA., Mota TR., Azevedo JL., Pamphile JA., de Souza CG., Polizeli Mde L., Bracht A., Peralta RM., 2014, Endophytic fungi: expanding the arsenal of industrial enzyme producers, *J Ind Microbiol Biotechnol*, 41(10), pp. 1467–1478, doi: 10.1007/s10295-014-1496-2.

177. Chen CY., Liu SY., Yan Y., Yin L., DI P., Liu HM., Liu HZ., 2020, Candidate genes involved in the biosynthesis of lignan in *Schisandra chinensis* fruit based on transcriptome and metabolomes analysis, *Chin J Nat Med*, 18(9), pp. 684–695, doi: 10.1016/S1875-5364(20)60007-3.
178. C.-Q. Li, H.-M. Lei, Q.-Y. Hu, G.-H. Li, and P.-J. Zhao, “Recent Advances in the Synthetic Biology of Natural Drugs,” *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 9, July 2021, doi: 10.3389/fbioe.2021.691152.
179. S. Kaul, T. Sharma, and M. K. Dhar, “‘Omics’ Tools for Better Understanding the Plant–Endophyte Interactions,” *Front Plant Sci*, vol. 7, p. 955, June 2016, doi: 10.3389/fpls.2016.00955.
180. A. Shankar and K. K. Sharma, “Fungal secondary metabolites in food and pharmaceuticals in the era of multi-omics,” *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 106, no. 9–10, pp. 3465–3488, May 2022, doi: 10.1007/s00253-022-11945-8.
181. D. Orčić, S. Berežni, and N. Mimica-Dukić, “Quantitative HPLC-UV Study of Lignans in *Anthriscus sylvestris*,” *Molecules*, vol. 27, no. 18, p. 6072, Sept. 2022, doi: 10.3390/molecules27186072.
182. Peng Q., Yuan Y., Gao M., Chen X., Liu B., Liu P., Wu Y., Wu D., 2014, Genomic characteristics and comparative genomics analysis of *Penicillium chrysogenum* KF-25, *BMC Genomics*, 15, p. 144, doi: 10.1186/1471-2164-15-144.
183. Wang FQ., Zhong J., Zhao Y., Xiao J., Liu J., Dai M., Zheng G., Zhang L., Yu J., Wu J., Duan B., 2014, Genome sequencing of high-penicillin producing industrial strain of *Penicillium chrysogenum*, *BMC Genomics*, 15(1), p. S11, doi: 10.1186/1471-2164-15-S1-S11.
184. V. V. Gujar, P. Fuke, A. A. Khardenavis, and H. J. Purohit, “Draft genome sequence of *Penicillium chrysogenum* strain HKF2, a fungus with potential for production of prebiotic synthesizing enzymes,” *3 Biotech*, vol. 8, no. 2, p. 106, Feb. 2018, doi: 10.1007/s13205-018-1132-3.
185. W. Guo, W. Wang, J. Tang, T. Li, and X. Li, “Genome analysis and genomic comparison of a fungal cultivar of the nonsocial weevil *Euops chinensis* reveals its plant decomposition and protective roles in fungus-farming mutualism,” *Front Microbiol*, vol. 14, p. 1048910, 2023, doi: 10.3389/fmicb.2023.1048910.
186. Miyamoto M., Motooka D., Gotoh K., Imai T., Yoshitake K., Goto N., Iida T., Yasunaga T., Horii T., Arakawa K., Kasahara M., Nakamura S., 2014, Performance comparison of second- and third-generation sequencers using a bacterial genome with two chromosomes, *BMC Genomics*, 15(1), p. 699, doi: 10.1186/1471-2164-15-699.
187. N. Javadian, G. Karimzadeh, M. Sharifi, A. Moieni, and M. Behmanesh, “In vitro polyploidy induction: changes in morphology, podophyllotoxin biosynthesis, and expression of the related genes in *Linum album* (Linaceae),” *Planta*, vol. 245, no. 6, pp. 1165–1178, June 2017, doi: 10.1007/s00425-017-2671-2.
188. Davin LB., Wang HB., Crowell AL., Bedgar DL., Martin DM., Sarkanen S., Lewis NG., 1997, Stereoselective bimolecular phenoxy radical coupling by an auxiliary (dirigent) protein without an active center, *Science*, 275(5298), pp. 362–366, doi: 10.1126/science.275.5298.362.

189. S. C. Halls and N. G. Lewis, "Secondary and quaternary structures of the (+)-pinoresinol-forming dirigent protein," *Biochemistry*, vol. 41, no. 30, pp. 9455–9461, July 2002, doi: 10.1021/bi0259709.
190. J. Hu, H. Li, and Y.-H. Chooi, "Fungal Dirigent Protein Controls the Stereoselectivity of Multicopper Oxidase-Catalyzed Phenol Coupling in Viriditoxin Biosynthesis," *J Am Chem Soc*, vol. 141, no. 20, pp. 8068–8072, May 2019, doi: 10.1021/jacs.9b03354.
191. U. Bayindir, A. W. Alfermann, and E. Fuss, "Hinokinin biosynthesis in *Linum corymbulosum* Reichenb.," *Plant J*, vol. 55, no. 5, pp. 810–820, Sept. 2008, doi: 10.1111/j.1365-3113X.2008.03558.x.
192. Xiao Y, Ji Q, Gao S, Tan H, Chen R, Li Q, Chen J, Yang Y, Zhang L, Wang Z, Chen W, Hu Z., 2015, Combined transcriptome and metabolite profiling reveals that IiPLR1 plays an important role in lariciresinol accumulation in *Isatis indigotica*, *J Exp Bot*, 66(20), pp. 6259–6271, doi: 10.1093/jxb/erv333.
193. A. A. Brakhage and V. Schroeckh, "Fungal secondary metabolites - strategies to activate silent gene clusters," *Fungal Genet Biol*, vol. 48, no. 1, pp. 15–22, Jan. 2011, doi: 10.1016/j.fgb.2010.04.004.
194. N. Alam, M. J. Shim, M. W. Lee, P. G. Shin, Y. B. Yoo, and T. S. Lee, "Vegetative Growth and Phylogenetic Relationship of Commercially Cultivated Strains of *Pleurotus eryngii* based on ITS sequence and RAPD," *Mycobiology*, vol. 37, no. 4, pp. 258–266, Dec. 2009, doi: 10.4489/MYCO.2009.37.4.258.
195. Wen-Cai Liu., Fan Yang., Ran Zhang., Xuan Shi., Xin-Hua Lu., Yu-Shi Luan., Zhi-Long Xiu., Yue-Sheng Dong., Dec. 2016, Production of polyketides with anthelmintic activity by the fungus *Talaromyces wortmannii* using one strain-many compounds (OSMAC) method, *Phytochemistry Letters*, 18, pp. 157–161, doi: 10.1016/j.phytol.2016.10.006.
196. E. Kerry, "Effects of temperature on growth rates of fungi from subantarctic Macquarie Island and Casey, Antarctica," *Polar Biol*, vol. 10, no. 4, Feb. 1990, doi: 10.1007/BF00238428.
197. R. S. Parmar, C. Singh, and A. Kumar, "Optimization of Cultural Parameters for Pigment Production from *Streptomyces flavofuscus* ARITM02, Isolated from Rhizosphere Soil," *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.*, vol. 6, no. 2, pp. 961–966, Feb. 2017, doi: 10.20546/ijcmas.2017.602.108.
198. K. A. Wheeler, B. F. Hurdman, and J. I. Pitt, "Influence of pH on the growth of some toxigenic species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*," *Int J Food Microbiol*, vol. 12, no. 2–3, pp. 141–149, Feb. 1991, doi: 10.1016/0168-1605(91)90063-u.
199. Oluseyi Adejoye., Bukola Christianah Adebayo-Tayo., Adeniyi Adewale Ogunjobi., Olaoye O. A. and Fadahunsi F. I., 2006, Effect of carbon, nitrogen and mineral sources on growth of *Pleurotus florida*, a Nigeria edible mushroom, *AJB*, 5(14), doi: 10.5897/AJB2006.000-5061
200. Y.-C. Li, W.-Y. Tao, and L. Cheng, "Paclitaxel production using co-culture of *Taxus* suspension cells and paclitaxel-producing endophytic fungi in a co-bioreactor," *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 83, no. 2, pp. 233–239, May 2009, doi: 10.1007/s00253-009-1856-4.

201. S. Kusari and M. Spiteller, "Are we ready for industrial production of bioactive plant secondary metabolites utilizing endophytes?," *Nat. Prod. Rep.*, vol. 28, no. 7, pp. 1203–1207, June 2011, doi: 10.1039/C1NP00030F.
202. H. Sharma, A. K. Rai, D. Dahiya, R. Chettri, and P. S. Nigam, "Exploring endophytes for in vitro synthesis of bioactive compounds similar to metabolites produced in vivo by host plants," *AIMS Microbiol*, vol. 7, no. 2, pp. 175–199, 2021, doi: 10.3934/microbiol.2021012.
203. "Novel linear and step-gradient counter-current chromatography for bio-guided isolation and purification of cytotoxic podophyllotoxins from *Dyosma versipellis* (Hance) | Request PDF," *ResearchGate*, Oct. 2024, doi: 10.1002/jssc.201201038.
204. M. A. Rashid, Gustafson, Kirk R., Cardellina II, John H., and M. R. and Boyd, "A New Podophyllotoxin Derivative from *Bridelia ferruginea*," *Natural Product Letters*, vol. 14, no. 4, pp. 285–292, July 2000, doi: 10.1080/10575630008041244.
205. R. R. J. Arroo, A. W. Alfermann, M. Medarde, M. Petersen, N. Pras, and J. G. Woolley, "Plant cell factories as a source for anti-cancer lignans," *Phytochemistry Reviews*, vol. 1, no. 1, pp. 27–35, Jan. 2002, doi: 10.1023/A:1015824000904.
206. Germaine K., Keogh E., Garcia-Cabellos G., Borremans B., Lelie D., Barac T., Oeyen L., Vangronsveld J., Moore FP., Moore ER., Campbell CD., Ryan D., Dowling DN., 2004, Colonisation of poplar trees by gfp expressing bacterial endophytes, *FEMS Microbiology Ecology*, doi: 10.1016/j.femsec.2003.12.009.
207. K. Sridhar and A. L. Charles, "In vitro antioxidant activity of Kyoho grape extracts in DPPH and ABTS assays: Estimation methods for EC50 using advanced statistical programs," *Food Chem*, vol. 275, pp. 41–49, Mar. 2019, doi: 10.1016/j.foodchem.2018.09.040.
208. Hubner A., Sobreira F., Vetore Neto A., Pinto CASO., Dario MF., Díaz IEC., Lourenço FR., Rosado C., Baby AR., Bacchi EM., 2019, The Synergistic Behavior of Antioxidant Phenolic Compounds Obtained from Winemaking Waste's Valorization, Increased the Efficacy of a Sunscreen System, *Antioxidants*, 8(11), Art. no. 11, doi: 10.3390/antiox8110530.
209. T. Oktriawan, N. Ariefta, T. J. Raharjo, E. Astuti, T. Koseki, and Y. Shiono, "Phytotoxic and Cytotoxic Polyketides Produced by Fungal Endophytes Isolated from *Psidium guajava*," *HAYATI Journal of Biosciences*, vol. 30, no. 3, Art. no. 3, Jan. 2023, doi: 10.4308/hjb.30.3.473-479.

PHỤ LỤC A

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

Hà Nội, ngày 29 tháng 10 năm 2025

BẢN GIẢI TRÌNH VÀ CAM KẾT

Về việc ký hiệu tên chủng nấm nội sinh HGN12.1C và HGN12.1R là một

Tên tôi là: Trần Thị Hoa, nghiên cứu sinh (NCS) theo Quyết định công nhận nghiên cứu sinh số 2019/QĐ-HVKHCN, ngày 10/12/2020 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ.

Thực hiện Luận án: “*Nghiên cứu phân lập vi nấm nội sinh từ cây dược liệu Bát Giác Liên và đánh giá khả năng sinh hoạt chất Podophyllotoxin và các dẫn xuất*” theo Quyết định công nhận đề tài và người hướng dẫn: Số 2554/QĐ-HVKHCN, ngày 31/12/2020 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ.

Luận án là sản phẩm của đề tài Trọng điểm Công nghệ sinh học cấp Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, mã số TĐCN.01/20-22 do TS. Trần Hồ Quang làm chủ nhiệm.

1. Giải trình về sự thay đổi ký hiệu

- Ký hiệu ban đầu: Trong quá trình thực hiện đề tài, ban đầu việc ký hiệu các chủng vi nấm nội sinh được mã hoá theo các bộ phận phân lập của cây Bát Giác Liên như: rễ (R), củ (C), thân (T), lá (L) ở các địa điểm thu mẫu Hà Giang và Lai Châu, do đó có ký hiệu HGN12.1C (nấm phân lập ở củ tại Hà Giang). Từ đó NCS và nhóm đề tài viết Giai pháp hữu ích, giải trình tự toàn hệ gen và đăng ký trên Ngân hàng Genbank dưới tên nấm là HGN12.1C.

- Tuy nhiên, do cây Bát Giác Liên là cây thân rễ, củ và rễ của không có sự tách biệt rõ ràng. Để thuận tiện cho việc nhận biết và quản lý, sau này nhóm nghiên cứu đã phân loại, quy ước và điều chỉnh lại như sau:

+ Nếu vi nấm nội sinh được phân lập từ củ ký hiệu (C), quy ước chuyển thành rễ ký hiệu R, ví dụ: HGN3C → HGN3R

+ Nếu vi nấm nội sinh được phân lập từ rễ ký hiệu R, quy ước chuyển thành (.1R), ví dụ: HGN3R → HGN3.1R

- Do sơ suất, NCS và nhóm nghiên cứu Đề tài đã không rà soát lại tên chủng/giống vi nấm trong các công trình công bố sau này dẫn đến sự không thống nhất như đã nêu.

2. Cam kết và công nhận

- Với giải trình trên, trong quá trình viết luận án NCS và tập thể hướng dẫn xin phép được thống nhất điều chỉnh HGN12.1C thành HGN12.1R.



- Việc giải trình ký hiệu chủng nấm như trên đã được nhất trí tại Hội đồng bảo vệ cấp cơ sở.

- Nghiên cứu sinh và tập thể hướng dẫn cam kết chủng vi nấm nội sinh ký hiệu trong các công bố là HGN12.1C và HGN12.1R là một chủng và đề xuất sử dụng thống nhất ký hiệu HGN12.1R trong toàn bộ nội dung Luận án.

Chúng tôi cam kết bản giải trình trên đây là đúng sự thật.

Xác nhận của tập thể hướng dẫn

Nghiên cứu sinh



TS. Trần Hồ Quang

PGS. TS. Phạm Bích Ngọc

Trần Thị Hoa

Chủ nhiệm đề tài
TĐCN.01/20-22

Đơn vị chủ trì

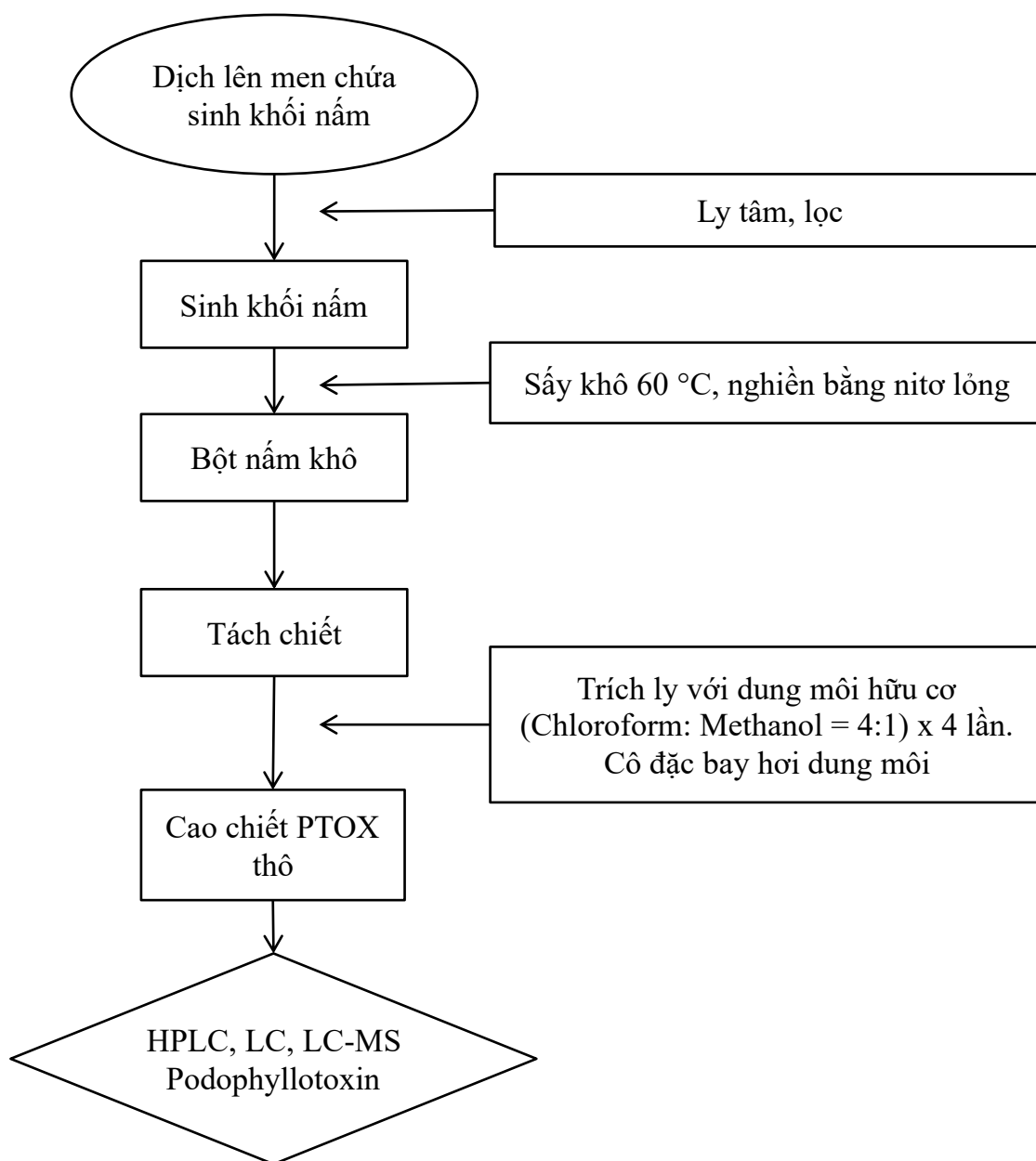


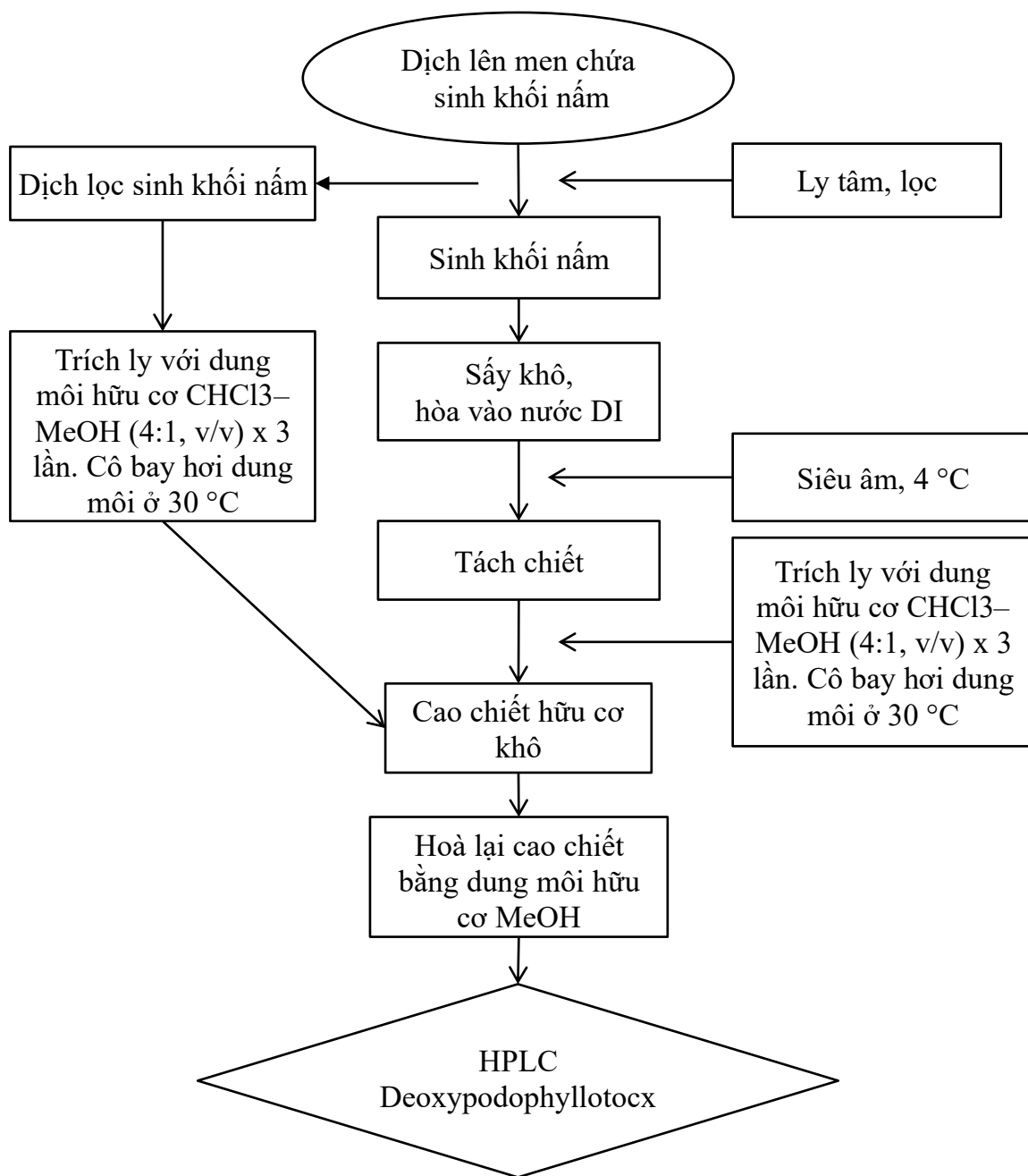
PHÓ VIỆN TRƯỞNG
Phí Quyết Tiến,

TS. Trần Hồ Quang



PHỤ LỤC B

**Hình 1B.** Tách chiết xác định PTOX bởi TCL, HPLC [35]



Hình 2B. Tách chiết, tinh sạch thu nhận deoxyPodophyllotoxin (DPTOX) [15]

PHỤ LỤC C

Bảng 1C. Kết quả BLAST trình tự gen ITS của các mẫu nấm với các trình tự tương đồng trên NCBI

TT	Chủng vi nấm nội sinh	Địa điểm	Mô thực vật	Mã số đăng ký Ngân hàng Gen	Tên chủng so sánh (Mã số)	Độ tương đồng(%)	Chi, Ngành	Tần xuất xuất hiện của các chi nấm (CF, %)
1	HGN6.1R	Hà Giang	Rễ	MZ461976	<i>Apiotrichum dehoogii</i> culture CBS8686 (KY101656.1)	99.80	<i>Apiotrichum</i> , Basidiomycota	1.85
2	HGN6.2R	Hà Giang	Rễ	MZ468130	<i>Aspergillus</i> sp. 151304 (MT371256.1)	91.94	<i>Aspergillus</i> , Ascomycota	5.56
3	HGN13R	Hà Giang	Rễ	MZ462046	<i>Aspergillus flavus</i> GFRSS (MT447477.1)	100		
4	LCN9R	Lai Châu	Rễ	MZ470737	<i>Aspergillus nomius</i> IXX-FS31 (KR296870.1)	99.82		
5	LCN21T	Lai Châu	Thân	MZ470733	<i>Cercospora citrullina</i> C2015 (KY593165.1)	100	<i>Cercospora</i> , Ascomycota	1.85
6	HGN1R	Hà Giang	Rễ	ON142327	<i>Cladosporium sphaerospermum</i> SCAU177 (MH464425.1)	99.82	<i>Cladosporium</i> , Ascomycota	3.70
7	LCN7L	Lai Châu	Lá	MZ470614	<i>Cladosporium</i> sp. XHMEA3 (MH985344.1)	100		
8	HGN8R	Hà Giang	Rễ	MZ469934	<i>Clonostachys rogersoniana</i> voucher IFRD500-015 (MT559105.1)	100	<i>Clonostachys</i> , Ascomycota	3.70
9	LCN1R	Lai Châu	Rễ	MZ477226	<i>Clonostachys rosea</i> 197 WS (MG396999.1)	100		

TT	Chủng vi nấm nội sinh	Địa điểm	Mô thực vật	Mã số đăng ký Ngân hàng Gen	Tên chủng so sánh (Mã số)	Độ tương đồng(%)	Chi, Ngành	Tần xuất xuất hiện của các chi nấm (CF, %)
10	HGN11.1R	Hà Giang	Rễ	MZ461968	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> Y35 (MT729915.1)	100	<i>Colletotrichum</i> , Ascomycota	5.56
11	LCN3L	Lai Châu	Lá	MZ470466	<i>Colletotrichum kohawee</i> WZ-135 (MN856281.1)	100		
12	LCN19T	Lai Châu	Thân	MZ470465	<i>Colletotrichum acutatum</i> WZ-298 (MN856415.1)	99.27		
13	LCN8.3L	Lai Châu	Lá	MZ470419			<i>Fungal</i> sp.	1.85
14	HGN7.1R	Hà Giang	Rễ	MZ461980	<i>Fusarium oxysporum</i> LZ070103 (FJ157216.1)	99.80	<i>Fusarium</i> , Ascomycota	11.11
15	HGN7R	Hà Giang	Rễ	MZ461979	<i>Fusarium oxysporum</i> LZ070103 (FJ157216.1)	99.6		
16	HGN5L	Hà Giang	Lá	MZ461981	<i>Fusarium solani</i> LJ02 (MT579853.1)	99.81		
17	LCN1L	Lai Châu	Lá	MZ470447	<i>Fusarium</i> sp. 2 IM-2014 (KJ920732.1)	88.71		
18	LCN6T	Lai Châu	Thân	MZ472087	<i>Fusarium</i> sp. 2 IM-2014 (KJ920732.1)	88.74		
19	LCN1T	Lai Châu	Thân	MZ470445	<i>Fusarium</i> sp. 2 IM-2014 (KJ920732.1)	92.48		
20	LCN8T	Lai Châu	Thân	MZ470735	<i>Ganoderma lucidum</i> AL BS (MH160076.1)	100	<i>Ganoderma</i> , Basidiomycota	1.85

TT	Chủng vi nấm nội sinh	Địa điểm	Mô thực vật	Mã số đăng ký Ngân hàng Gen	Tên chủng so sánh (Mã số)	Độ tương đồng(%)	Chi, Ngành	Tần xuất xuất hiện của các chi nấm (CF, %)
21	HGN2R	Hà Giang	Rễ	MZ461975	<i>Guignardia</i> sp. voucher HQU PL08 (MK640597.1)	99.83	<i>Guignardia</i> , Ascomycota	1.85
22	HGN3R	Hà Giang	Rễ	MZ461966	<i>Ilyonectria destructans</i> (MK403674.1)	100	<i>Ilyonectria</i> , Ascomycota	5.56
23	HGN7.2R	Hà Giang	Rễ	MZ461985	<i>Ilyonectria robusta</i> JJHHD-6 (MN091953.1)	99		
24	LCN16L	Lai Châu	Lá	MZ470426	<i>Ilyonectria</i> sp. HB 5 (KP761761.1)	99.80		
25	HGN14.1R	Hà Giang	Rễ	MZ462039	<i>Lasiodiplodia venezuelensis</i> CBS 129753 (MH865369.1)	100	<i>Lasiodiplodia</i> , Ascomycota	1.85
26	HGN5R	Hà Giang	Rễ	MZ469936	<i>Mucor</i> sp. RL288 (MT557384.1)	99.29	<i>Mucor</i> , Mucoromycota	3.70
27	LCN7R	Lai Châu	Rễ	MZ470734	<i>Mucor circinelloides</i> M (MK791718.1)	99.47		
28	HGN6R	Hà Giang	Rễ	MZ461978	<i>Neurospora intermedia</i> WS11JB14 (KT844672.1)	99.45	<i>Neurospora</i> , Ascomycota	1.85
29	HGN13.1R	Hà Giang	Rễ	MZ468131	<i>Penicillium citrinum</i> JBGC3.4 (MG554246.1)	100	<i>Penicillium</i> , Ascomycota	7.41
30	HGN12.1R	Hà Giang	Rễ	MZ462047	<i>Penicillium herquei</i> BCC (THA):84323 (MF537646.1)	99.80		
31	LCN15L	Lai Châu	Lá	MZ470422	<i>Penicillium herquei</i> LTL319 (MF663569.1)	99.81		

TT	Chủng vi nấm nội sinh	Địa điểm	Mô thực vật	Mã số đăng ký Ngân hàng Gen	Tên chủng so sánh (Mã số)	Độ tương đồng(%)	Chi, Ngành	Tần xuất xuất hiện của các chi nấm (CF, %)
32	LCN12.1L	Lai Châu	Lá	MZ470423	<i>Penicillium herquei</i> 505G10 (MH986808.1)	100		
33	HGN1T	Hà Giang	Thân	MZ461977	<i>Pestalotiopsis</i> sp. SC24c (MG489866.1)	99.80	<i>Pestalotiopsis</i> , Ascomycota	1.85
34	LCN12T	Lai Châu	Thân	MZ470448	<i>Phaeoacremonium</i> sp. MRHf10 (MK120896.1)	100	<i>Phaeoacremoniu</i> <i>m</i> , Ascomycota	1.85
35	HGN14R	Hà Giang	Rễ	MZ461983	<i>Phaeosphaeriopsis musae</i> A731 (KU529845.1)	100	<i>Phaeosphaeriopsi</i> <i>s</i> , Ascomycota	3.7
36	HGN3L	Hà Giang	Lá	MZ461982	<i>Phaeosphaeriopsis musae</i> A731 (KU529845.1)	100		
37	HGN1L	Hà Giang	Lá	MZ461986	<i>Phyllosticta capitalensis</i> H (ON014497.1)	99.49	<i>Phyllosticta</i> , Ascomycota	3.70
38	LCN5L	Lai Châu	Lá	MZ470604	<i>Phyllosticta capitalensis</i> PN-2014- 08-28-A1 (KT319044.1)	99.83		
39	HGN3T	Hà Giang	Thân	MZ462053	<i>Plectosphaerella oligotrophica</i> CGMCC 3.15078 (NR_155632.1)	99.42	<i>Plectosphaerella</i> , Ascomycota	3.70
40	LCN14L	Lai Châu	Lá	MZ470459	<i>Plectosphaerella cucumerina</i> PCO.52 (HQ248206.1)	99.60		
41	LCN3T	Lai Châu	Thân	MZ470446	<i>Purpureocillium lilacinum</i> PIYN7703 (MH483756.1)	99.53	<i>Purpureocillium</i> , Ascomycota	1.85
42	LCN13T	Lai Châu	Thân	MZ470584	<i>Setophoma</i> sp. PSRF58 (MN888811.1)	100	<i>Setophoma</i> , Ascomycota	1.85

TT	Chủng vi nấm nội sinh	Địa điểm	Mô thực vật	Mã số đăng ký Ngân hàng Gen	Tên chủng so sánh (Mã số)	Độ tương đồng(%)	Chi, Ngành	Tần xuất xuất hiện của các chi nấm (CF, %)
43	LCN17T	Lai Châu	Thân	MZ470424	<i>Simplicillium</i> sp. FTIZZJ01 (FJ196609.1)	99.81	<i>Simplicillium</i> , Ascomycota	1.85
44	LCN4T	Lai Châu	Thân	MZ471623	<i>Talaromyces amestolkiae</i> CBS 274.95 (KP975419.1)	100	<i>Talaromyces</i> , Ascomycota	1.85
45	HGN11R	Hà Giang	Rễ	MZ469933	<i>Trametes cf. cubensis</i> 118-25 (KJ654514.1)	99.83	<i>Trametes</i> , Basidiomycota	9.26
46	HGN12.2R	Hà Giang	Rễ	MZ461967	<i>Trametes cf. cubensis</i> 118-25 (KJ654514.1)	100		
47	HGN3.1R	Hà Giang	Rễ	MZ461984	<i>Trametes cf. cubensis</i> 118-25 (KJ654514.1)	100		
48	LCN11L	Lai Châu	Lá	MZ470263	<i>Trametes cf. cubensis</i> 118-25 (KJ654514.1)	99.83		
49	LCN13L	Lai Châu	Lá	MZ470264	<i>Trametes cf. cubensis</i> 118-25 (KJ654514.1)	99.5		
50	HGN2.1R	Hà Giang	Rễ	MZ469935	<i>Trichoderma citrinoviride</i> SC2e (MG461650.1)	97.01	<i>Trichoderma</i> , Ascomycota	5.56
51	HGN5.1R	Hà Giang	Rễ	MZ462050	<i>Trichoderma citrinoviride</i> SC2e (MG461650.1)	97.01		
52	LCN3R	Lai Châu	Rễ	MZ477227	<i>Trichoderma lixii</i> NGS (KX580184.1)	99.82		
53	HGN10R	Hà Giang	Rễ	MZ469932	<i>Xylaria</i> sp. NBRTSLF-46 (MF807974.1)	99.24	<i>Xylaria</i> , Ascomycota	1.85

PHỤ LỤC D

1. >*Apiotrichum*_HGN6.1R_ MZ461976

CTTCCGTAGGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAGTGATTGCCCTAGTGGCTTAAACTATATCCATATACACCTGTGAACC
GTTTGATTGACACTCTGTGTTGATTTTACAAACAATGTGTAATGAACGTCTAGTTATTATAACAAAAATAACTTTCAACA
ACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCA
TCGAATCTTTGAACGCAACTTGCCTCTCTGGTATTCCGGAGAGCATGCCTGTTTGAGTGTTCATGAAATCTCAACCATTAG
GGTTTCTTAATGGCTTGGATTGTTGGGTGTTGCCAGTCTCTTGGCTCACCTTAAAGGAGTTAGCGAGTTTAACAATGTCGTCT
GGCGTAATAAGTTTCGCTGGTAAGACTTGTGAAGTTTGCTTCTAATCGTCTTCGGACAATTACTTTGACTCTGGCCTCAA
TCAGGTAG

2. > *Aspergillus*_HGN6.2R_ MZ468130

TGCTTCGGCGGGCCCGCCGTTTCGCGCGGGCCGCCGGGGGGGAACCCCTCCCCCGGGCGAGCGCCCGCCGGAGACCCCAA
CGTGAACACTGTCTGAAGTTTTGTCGTCTGAGTTCGATTGTATCGCAATCACTTAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGT
TCCGGCATCGATGAAAAACGCAGCGAAATGCGATAATTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAAC
GTACATTGCACCCCTGGTATTCCGGGGGGTATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGG
TCCTCGACCCCAAACCTTCAGACAGTGTTACGTTGGGGTCTCCGGCGGGCGCTCGCCCGGGGGGAGGGGTTTGTCCCCG
CTCTCGTAGGCCCGGCCGGCGCTGGCCGACGCTGAAAAACAACCATTAATTTCTCCAAGGTGACCTCGGATCAGGTAGGGA
TACCCGCTGAACTTAATCATATCAATAAGC

3. > *Aspergillus*_HGN13R_ MZ468131

GGGTTCTAGCGAGCCCAACCTCCCACCCGTGTTTACTGTACCTTAGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCATTCATGGCCGCCGGG
GGCTCTCAGCCCCGGGCGCGCCCGCCGGAGACACCACGAACCTCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATTGTATCG
CAATCAGTTAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAGTGTG
AATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTCCGAG
CGTCATTGCTGCCCATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTCGTCTCCCTCTCCGGGGGGGACGGGGCCCAAAGGCAGCG
GCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCTTGCCGAACGCAAA
TCAATCTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA

4. >*Aspergillus*_LCN9R_ MZ470737

GTAGGATTCCCTAGCGAGCCCAACCTCCCACCCGTGTTTACTGTACCTTAGTTGCTTCGGCGGGCCCCGCCGCAAGGCCGCCG
 GGGGGCATCCGCCCCCGGGCCCCGCGCCCCGCCGGAGACACCACGAACCTCTGAACGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATTGTA
 TCGCAATCAGTTAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAGT
 GTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTCCG
 AGCGTCATTGCTGCCCATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTCGTCGTCCCCCCCCCTCCGGGGGGGGACGGGCCCTAAAGG
 CAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCTTGCCGAAC
 GCAAAACAACCATTCTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGCGGAGG
 AA

5. >*Cercospora*_LCN21T_MZ470733

CTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACTGAGTGAGGGCCTTCGGGCTCGACCTCCAACCCTTTGTGAACACAACCT
 TGTTGCTTCGGGGGCGACCCTGCCGTTTCGACGGCGAGCGCCCCCGGAGGCCTTCAAACACTGCATCTTTGCGTCGGAGTT
 TAAGTAAATTAACAACAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA
 ATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGAGGGGGCATGCCTGTT
 CGAGCGTCATTTACCACTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGGCGCCGCGGTGTTCCGCGCGCCTCAAAGTCTCCGGCTGAGCT
 GTCCGTCTCTAAGCGTTGTGATTTCAATTAATCGCTTCGGAGCGCGGGCGGTTCGCGGCCGTAAATCTTTCAACAAGGTGACC
 TCGGATCAG

6. >*Cladosporium*_HGN1R_ON142327

GCTGGCTCGGGCGGGAGTTCACACCCTTTGTTGTCCGACTCTGTTGCCTCCGGGGCGACCCTGCCTCCAGGCGGGGGCCCC
 GGGTGGACATTTCAAACCTTTGCGTAACTTTGCAGTCTGAGTAAATTTAATTAATAAAATTAACAACTTTCAACAACGGATCT
 CTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCT
 TTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTACCACTCAAGCCTCGCTTGGTA
 TTGGGCGACGCGGTCCGCCGCGCGCCTCAAATCGACCGGCTGGGTCTTTTCGTCCCCTCAGCGTTGTGGAACTATTCGCTA
 AAGGGTGCCGCGGGGGGCCACGCCGTGAAACAACCCCATTTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGA
 ACTTAAGCATATCAATAAAGCGGAGGAAAAGCATATCAATAGAGCGGGAGGACCTGGCCGGGGAAAGTTAGAACAATTT
 TGATTGTACGATTC

7. >*Cladosporium*_LCN7L_MZ470614

TTCCGTAGGGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACAAGTGACCCCGGTCTAACCACCGGGATGTTTCATAACCCTTTGTTGT
CCGACTCTGTTGCCTCCGGGGCGACCCTGCCTTCGGGGCGGGGGCTCCGGGTGGACACTTCAAACCTTTGCGTAACCTTTGCA
GTCTGAGTAAACTTAATTAATAAATTAACAACTTTTAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA
ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGG
GGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCACTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGGCAACGCGGTCCGCCGCGTGCCTCAAATC
GACCGGCTGGGTCTTCTGTCCCCTAAGCGTTGTGGAACTATTCGCTAAAGGGTGCTCGGGAGGCTACGCCGTAAAACAA
ACCCATTTCTAAGGTGACCTCGGATCAGGA

8. >*Clonostachys*_HGN8R_ MZ469934

CCTTGTGTGCCCCGGATCCAGGCACCCGCCGGGGGACCTTAACTCTTGTTTTATTTAGAATCTTCTGAGTAGTTTTTACAA
ATAAATAAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGAAAAGTAATGTGA
ATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCTGAGC
GTCATTTCAACCCTCATACCCCTAGGGTGTGGTGTGGGGATCGGCCAAGGCCCGCAAGGGACGGCCGGCCCCCTAAATCT
AGTGGCGGACCCGTCGTGGCCTCCTCTGCGAAGTAGTAATATTCCGCATCGGAGAAGCGACGAGCCCCCTGCCGTTAAACC
CCCAACTTTCTAAGGTTGACCTCAGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGCGGAGG

9. >*Clonostachys*_LCN1R_ MZ477226

CCAGCCCATGTGAACATACCTATCGTTGCTTCGGCGGGATCGCCCCGGGCGCCTCGTGTGCCCCGGATCCGGCGCCCCGCC
TAGGAACCTTAACTCTTGTTTTATTTTGAATCTTCTGAGTAGTTTTTACAAATAAATAAAAACTTTCAACAACGGATCTCT
TGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTT
GAACGCACATTGCGCCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCTGAGCGTCATTTCAACCCTCATGCCCCCTAGGGCGTG
GTGTTGGGGATCGGCCAAGGCCCGCAAGGGACGGCCGGCCCCCTAAATCTAGTGGCGGACCCGTCGTGGCCTCCTCTGCGA
AGTAGTGATATTCCGCATCGGAGAGCGACGAGCCCCCTGCCGTTAAACCCCCCACTTTCCAAGGTTGACCTCAGATCAGGT
AGGAATACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA

10. >*Colletotrichum*_HGN11.1R_ MZ469933

GCGGGTAGGGTCTCCGTGACCCTCCCGGCCTCCCGCCCCCGGGCGGGTTCGGCGCCCCGCCGGAGGATAACCAAACCTCTGAT
TTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAACTTTTAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAG
AACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCC
AGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCTGATGTA

GGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGACCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACTTTACGTCTCGCACTGGGATCCGGAGGGA
CTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAA
TAACCGAAGG

11. >*Fungal* sp._LCN8.3L_ MZ470419

GCCTGCGGAAGGATCATTACTGAGTGCGGGTCCCTCGTGGACCTAACCTCCCACCCTTGTCTCTTGTATACCCTGTTGCTT
TGGCGGGCCCACTGGGGATCCCCCAGTCGCCGAGGGGGCCCTGTGCCCCTGGGCCCCTGTCCGCCAGAGCGCCCTGGAACC
CTCATGAAGATGGACTGTCTGAGCATGATTGATAATAATCAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATG
AAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCC
CCTGGCATTCCGGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTGTGGTCCCCCG
TGATACGGGGGACCTGCCTGAAAGGCAGTGGCGACGCCCCGCCTAGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCGG
GAAGGGTCTACGGGTGTTGGTCATCCACGATAATTTTTTCCACGGTTGACCTCGGATCAGTAGA

12. >*Colletotrichum*_LCN19T_ MZ470465

TCCGTAGGGGGAACCTGCGGAGGGATCATTACTGAGTTACCGCTCTATAACCCTTTGTGAACGTACCTAACCGTTGCTTCG
GCGGGCAGGGGAAGCCTCTCGCGGGCCTCCCCTCCCGGCGCCGGCCCCCACCACGGGGACGGGGCGCCCGCCGGAGGAA
ACCAAACCTCTATTTACACGACGTCTCTTCTGAGTGGCACAAGCAAATAATTAACAACTTTTAACAACGGATCTCTTGGTTCT
GGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGC
ACATTGCGCTCGCCAGCATTCTGGCGAGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCACCGCTTGGTTTTGGGGCC
CCACGGCCGACGTGGGGCCCTTAAAGGTAGTGGCGGACCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACTAACGTCTCGCACTG
GGATCCGGAGGGACTCTTGCCGTTAAACCCCCAAATTCTTACAGGTGACCTCGGATCAGGTACGATC

13. >*Fungal* sp._LCN8.3L_ MZ470419

GCCTGCGGAAGGATCATTACTGAGTGCGGGTCCCTCGTGGACCTAACCTCCCACCCTTGTCTCTTGTATACCCTGTTGCTT
TGGCGGGCCCACTGGGGATCCCCCAGTCGCCGAGGGGGCCCTGTGCCCCTGGGCCCCTGTCCGCCAGAGCGCCCTGGAACC
CTCATGAAGATGGACTGTCTGAGCATGATTGATAATAATCAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATG
AAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCC
CCTGGCATTCCGGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTGTGGTCCCCCG
TGATACGGGGGACCTGCCTGAAAGGCAGTGGCGACGCCCCGCCTAGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCGG
GAAGGGTCTACGGGTGTTGGTCATCCACGATAATTTTTTCCACGGTTGACCTCGGATCAGTAGA

14. >*Fusarium*_HGN7.1R_ MZ461980

TCCGTAGGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCACTTGTTCCTCG
GCGGATCAGCCCGCTCCCGGTAAAACGGGACGGCCCGCCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTTCTGAGT
AAAACCATAAAATAAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATA
AGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGC
CTGTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCACAGCTTGGTGTGGGACTCGCGTTAATTCGCGTTCCTCAAATTGATTGGCG
GTCACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAACCCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTC
TGAATGTGACCTCGGATCAT

15. >*Fusarium*_HGN7R_ MZ461979

TTCCGTAGGGGTGACCTGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCACTTGTTCCTCG
GCGGATCAGCCCGCTCCCGGTAAAACGGGACGGCCCGCCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTTCTGAGT
AAAACCATAAAATAAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATA
AGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGC
CTGTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCACAGCTTGGTGTGGGACTCGCGTTAATTCGCGTTCCTCAAATTGATTGGCG
GTCACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAACCCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTC
TGAATGTGACCTCGGATCAGG

16. >*Fusarium*_HGN5L_ MZ461981

CTATTCATCATCACCTGTGACATACCTAAACGTTGCTTCGGCGGGAATAGACGGCCCCGTGAAACGGGGCCGCCCCCGC
CAGAGGACCCTTAACTCTGTTTCTATAATGTTTCTTCTGAGTAAAACAAGCAAATAAATTTAAACTTTCAACAACGGATCT
CTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCT
TTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTACAACCCTCAGGCCCCCGGGCCT
GGCGTTGGGGATCGGCGGAGCCCTTTGTGGGCACACGCCGTCCCCCAAATACAGTGGCGGTCCCGCCGCAGCTTCCATCG
CGTAGTAGCTAACACCTCGCGACTGGAGAGCGGCGCGGCCACGCCGTAAAACACCCAACTCTTCTGAAGTTGACCTCGAA
TCAGGTAGGAATAACCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGGCG

17. >*Fusarium*_LCN1L_ MZ470447

CTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCAATTGTTGCCTCG
GCGGATCAGCCCGCTCCCGGTAAAACGGGACGGCCCGCCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTTCTGAGT

AAAACCATAAATAAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATA
AGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGC
CTGTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCCCCGGGTTTGGTGTGGGGATCGGCGAGCCCTCGCGGCAAGCCGGCCCCG
AAATCTAGTGGCGGTCTCGCTGCAGCTTCCATTGCGTAGTAGTAAAACCCTCGCAACTGGTACGCGGCGCGGCCAAGCCG
TTAAACCCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAC

18. >*Purpureocillium*_LCN3T_MZ472087

TCCCAACCCACTGTGACCTTACCTCAGTTGCCTCGGCGGGAACGCCCCGGCCGCCTGCCCCCGCGCCGGCGCCGGACCCA
GGCGCCCGCCGCAGGGATCCCAAACCTCTCTTGCATTACGCCCAGCGGGCGGAATTTCTTCTCTGAGTTGCACAAGCAAAA
ACAAATGAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATG
TGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCG
AGCGTCATTTCAACCCTCGAGCCCCCCCCGGGGGCCTCGGTGTTGGGGGACGGTACACCAGCCGCCCCCGAAATGCAGTGG
CGACCCCGCCGCAGCCTCCCCT

19. >*Fusarium*_LCN1T_MZ470445

TCCGTAGGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCACTTGTTCCTCG
GCGGATCAGCCCGCTCCCGGTAAAACGGGACGGCCCGCCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTTCTGAGT
AAAACCATAAATAAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATA
AGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGC
CTGTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCACAGCTTGGTGTGGGACTCGCGTTAATTCGCGTTCCTCAAATTGATTGGCG
GTCACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAACCCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTC
TGAATGTGACCTCGGATCAT

20. >*Ganoderma*_LCN8T_MZ470735

CTTTGACCGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCACTTACTGTGGGC
TTCAGATTGCGAGGCACGCTCTTTACCGGGCTTGCGGAGCATATCTGTGCCTGCGTTTATCACAACTCTATAAAGTAACA
GAATGTGTATTGCGATGTAACACATCTATATACAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCA
GCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTATTG
CGAGGAGCATGCCTGTTTGTAGTGTTCATGAAATCTTCAACCTACAAGCTTTTGTGGTTTGTAGGCTTGGACTTGGAGGCTTG
TCGGCCGTTATCGGTTCGGCTCCTCTTAAATGCATTAGCTTGGTTCCTTGCGGATCGGCTCTCGGTGTGATAATGTCTACGC

CGCGACCGTGAAGCGTTTGGCGAGCTTCTAACCGTCTTATAAGACAGCTTTATGACCTCTGACCTCAAATCAGGTAGGAC
TACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAAT

21. >*Trichoderma*_HGN2.1R_MZ469935

GTCAACTCCAAACCCAATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGA
CCAAGGCGCCCGCCGGAGGACCAACCAAACTCTTATTGTATACCCCTCGCGGGTTTTTTACTATCTGAGCCATCTCGGC
GCCCCTCGTGGGCGTTTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGC
GAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGTATTCT
GGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTTTACGGG
GCCGGCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGCGGCG
CGTCCACAGCCGTTAAACACCCCAAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATA
TCAAAAGCCGGAGGAA

22. >*Ilyonectria*_HGN3R_MZ461984

TTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCATATCGTTGCCTCG
GCGGTGCCCCGTTTCGGCGGCCCCGCCAGAGGACCCAAACCCTGTATTAAAGTATTCTTCTGAGTAAATGATTAAATCAATC
AAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGA
ATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCA
ACCCTCAAGCCCCCGGGCTTGGTGTGGAGACCGGCGAGCCCTCCGGGGCACGCCGCCTCCCAAATTTAGTGGCGGTCTC
GCTGTAGCTTCCTCTGCGTAGTAGCACACCTCGCACTGGGAAACAGCGTGGCCACGCCGTAAAACCCCCCACTTCTGAAA
GGTTGACCTCGGATCA

23. >*Ilyonectria*_HGN7.2R_MZ461985

GGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCATATTGTTGCCTCGGCGGTG
CCTGTTTCGGCAGCCCGCCAGAGGACCCAAACCCTAGATTACATTAAAGCATTTTCTGAGTCAATGATTAAATCAATCAA
AACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAT
TCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAAC
CCTCAAGCCCCCGGGCTTGGTGTGGAGATCGGCGAGCCCCCGGGGCGCGCCGTCTCCCAAATATAGTGGCGGTCCCGC
TGTAGCTTCCTCTGCGTAGTAGCACACCTCGCACTGGGAAACAGCGTGGCCACGCCGTAAAACCCCCCACTTCTGAAAGG
TGACCTCGGATG

24. >*Ilyonectria*_LCN16L_MZ470426

TCCGTAGGGGTGACCTGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCATATTGTTGCCTC
GGCGGTGCCTGTTTCGGCAGCCCGCCAGAGGACCCAAACCCTAGATTACATTAAAGCATTTTCTGAGTCAATGATTAAAT
CAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATT
GCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTC
ATTTCAACCCTCAAGCCCCCGGGCTTGGTGTGGAGATCGGCGAGCCCCCGGGGCGCGCCGTCTCCCAAATATAGTGGC
GGTCCCGCTGTAGCTTCCTCTGCGTAGTAGCACACCTCGCACTGGGAAACAGCGTGGCCACGCCGTAAAACCCCCCACTT
CTGAAAGGTGACCTCGGATGCA

25. >*Phaeosphaeriopsis*_HGN14R_MZ461983

CTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACATTCAGTAGCCCAGCTACTTGTTTACACCCTTGTCTTTTTGCGTACTTA
TCGTTTCCTCGGCGGGCTTGCCTGCCGGTTGGACAACCTTTATAACCTTTTTAAATCTTCAATCAGCGTCTGAATAATATAC
AATAATTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAA
TTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTTGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGT
CATTTGTACCTTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGTGCTTGTCTTTTTGTAAAGACTCACCTCAAAGTCATTGGCAGCCAGTGT
TTTGGTAGTAAGCGCAGCACATTTTGCGTCTTGGTCCCTTAACAGCAGCATCCATCAAGCCATTTTCTCACTTTGACCTCG
GATCAGGT

26. >*Mucor*_HGN5R_MZ462050

TTTTCATAATTTTGGCTTGTCCATCATTATCTATTTACTGTGAAACGTATTATTACTTGACGCCTGAGGGATGTTCCAYTGC
TATAAGGATAGGCAGCGGAAATGTAAACCGAGTCATAATCAAGCTTAGGCTTGGTATCCTATTATTATTTACCAAAAAGAA
TTCAGAATTAATATTGTAACATAGACGTAAAAAATCTATAAAACAACCTTTTAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGAT
GAAGAACGTAGCAAAGTGCGATAACTAGTGTGAATTGCATATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCAACTTGCGCTC
ATTGGTATTCCAATGAGCACGCCTGTTTCAGTATCAAAACAAACCCTCTATCCAACCTTTTGTGTAATAGGATGACTGAGAG
TCTCTTGATCGTCAGATCTCGAACCTCTTGAAATGTACAAAGGCCTGATCTTGTTTGAATGCCTGAACTTTTTTTTAATATA
AAGAGAAGCTCTTGCGGTAAACTGTGCTGGGGCCTCCCAAATAACACTTTTTTTAAATTTGATCTGAAATCAGGTGGGATT
ACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGCCGGAGGAAA

27. >*Mucor*_LCN7R_MZ470734

CATTATTTTGGCTTGTCCATCATTATCTATTTACTGTGAAACGTATTATTACTTGACGCCTGAGGGATGTTCCATTGCTATA
 AGGATAGGCAGCGGAAATGTAAACCGAGTCATAATCAAGCTTAGGCTTGGTATCCTATTATTATTTACCAAAGAATTCA
 GAATTAATATTGTAACATAGACGTAAAAAATCTATAAAACAACCTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAA
 GAACGTAGCAAAGTGCGATAACTAGTGTGAATTGCATATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCAACTTGCGCTCATT
 GGTATTCCAATGAGCACGCCTGTTTCAGTATCAAAACAAACCCTCTATCCAACCTTTTGTGGAATAGGATGACTGAGAGTCT
 CTTGATCGTCAGATCTCGAACCTCTTGAAATGTACAAAGGCCTGATCTTGTTTGAATGCCTGAATTTTTTTTTTAATATAAA
 AAAA ACTTCTGGCGGAAAATGGGGTTGGGGCCTCCCAAATACCCTTTTTTTAATTTTAATCTAAAATCAGGGGGAATACC
 C

28. >*Neurospora*_HGN6R_ MZ461978

TTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACAGAGTTGCAAACTCCCACAAACCATCGCGAATCTTACCCGTACGGTT
 GCCTCGGCGCTGGCGGTCCGGAAAGGCCCTCGGGCCCTCCCGGATCCTCGGGTCTCCCGCTCGCGGGAGGCTGCCCCGCCG
 GAGTGCCGAACTAAACTCTGGATATTTTATGTCTCTCTGAGTAAACTTTTAAATAAGTCAAACTTTCAACAACGGATCT
 CTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCT
 TTGAACGCACATTGCGCTCGCCAGTATTCTGGCGAGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCATCAAGCTCTGCTTGCGT
 TGGGGATCCGCGGCTGTCCGCGGTCCCTCAAATCAGTGGCGGGCTCGCTAGTCACACCGAGCGTAGTAACCTCTACATCG
 CTATGGTCGTGCGGCGGGTTCTTGCCGTAAAACCCCCCATTTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGG

29. >*Penicillium citrinum* HGN13.1R_ MZ462046

CTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGCGGGCCCCCTCGGGGCCCAACCTCCCACCCGTGTTGCCCGAA
 CCTATGTTGCCTCGGCGGGGCCCCGCGCCCCGCCGACGGCCCCCTGAACGCTGTCTGAAGTTGCAGTCTGAGACCTATAAC
 GAAATTAGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGT
 GAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCGGAGGGCATGCCTGTCCGA
 GCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCCGTCCCCCGCCGGGGGGACGGGCCCCGAAAGGCAGCGG
 CGGCACCGCGTCCGGTCCCTCGAGCGTATGGGGCTTCGTCACCCGCTCTAGTAGGCCCCGGCCGGCGCCAGCCGACCCCAA
 CCTTTAATTATCTCAGGTGACCTCGGATCA

30. >*Penicillium herquei* HGN12.1R_ MZ462047

TCATTAACGAGTTCTGACACTTCCGTAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGAGTGAGGGCCCTCTGG
 GTCCAACCTCCCACCCGTGTTTATTGTACCTTGTTGCTTCGGCAGGCCCGCCTCACGGCCGCCGGGGGGCTTCTCGCCCC

GGGCCCCGCGCCTGCCGGAGACACCTTTGAACGCTGTCTGAAGTTTGCAGTCTGAGCGATTAGCTAAATTAGTTAAACTT
TCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAATTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT
GAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCA
AGCCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCTCGTCCCCCCTCTGCGGGGGACGGGGCCCGAAAGGCAGCGGGCGGCACCGTGTCCGGTCC
TCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCTTTAGCAGGAAACACAAGGAGGAGCATATCAAT
AAGCGGAGACGATGATAATCCTTA

31. >*Penicillium*_LCN15L_MZ470422

CGTAGCTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGAGTGAGGACCCTCTGGGTCCAACCTCCCACCCGTGTTTAT
TGTACCTTGTGCTTCGGCAGGCCCGCCTCACGGCCGCCGGGGGGCTTCTCGCCCCCGGGCCCGCGCCTGCCAGAGACAC
CTTTGAACGCTGTCTGAAGTTTGCAGTCTGAGCGATTAGCTAAATTAGTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCG
GCATAGGTGAAGAACACAGCGAAATGCGATAATTAATGTGAATTGCAGAATTCAGCGAATCATCGAGTCTTTGAACGCA
CATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCT
CGTCCCCCCTCTGCGGGGGACGGGGCCCGAAAGGCAGCGGGCGGCACCGTGTCCGGTCTCTGAGCGTATGGGGCTTTGTCAC
CCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCCTTAGCAGGAAACACAAGGAGGAGCATATCAATAAGCGGAGACGATGATAATCCT
TA

32. >*Penicillium*_LCN12.1L_MZ470423

CGACTGATCGAGGTCACCTGAAAAAAGATTGTGTCGTCGGCTAAGGCGCCGGCCGGGCCTACAGAGCGGGTGACAAAG
CCCCATACGCTCGAGGACCGGACACGGTGCCGCCGCTGCCTTTCGGGCCCCGTCCCCCGCAGAGGGGGACGAGGCCCAAC
ACACAAGCCGGGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTC
AAAGACTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTAATTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAA
GAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAACTAATTTAGCTAATCGCTCAGACTGCAAACCTTCAGACAGCGTTCAAAGGTGTCTCCG
GCAGGCGCGGGCCCCGGGGGCGAGAAGCCCCCGGCGGGCCGTGAGGCGGGCCTGCCGAAGCAACAAGGTACAATAAACA
CGGGTGGGAGGTTGGACCCAGAGGGCCCTCACTCAGTAATGATCCTTCCGCAGGC

33. >*Pestalotiopsis*_HGN1T_MZ461977

TTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTATAGAGTTTTCTAAACTCCCAACCCATGTGAACTTACCTTTTGTGCTCG
GCAGAAGTTATAGGTCTTCTTATAGCTGCTGCCGGTGGACCATTAACTCTTGTTATTTTATGTAATCTGAGCGTCTTATTT
TAATAAGTCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTG

AATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCATTAGTATTCTAGTGGGCATGCCTGTTTCGAGC
GTCATTTCAACCCTTAAGCCTAGCTTAGTGTTGGGAATCTACTTCTTTATAGTTGTAGTTCCTGAAATACAACGGCGGATT
TGTAGTATCCTCTGAGCGTAGTAATTTTTTTCTCGCTTTTGTTAGGTGCTATAACTCCCAGCCGCTAAACCCCAATTTTTT
GTGGTGACCTCGGATCAG

34. >*Phaeoacremonium*_LCN12T_ MZ470448

CTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTAAACGAGTTTCGTACTCCAAACCCTTTGTGAACATACCTGTTTTCGTTGCT
TCGGCAGGTGAAGGCGGACGGCCTCCGGGCCTGAAGCCGCCGCCGGGCGGACCCCTCGCGGGGCGCTGCCGGGTGGGCC
TGCCGGAGGGGCACAGACTCTGTATTACAACGTACCTCTCTGAGTTATATTTTACAAACAAGTAAAAACTTTCAACAACGG
ATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGA
ATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCAGGCCCTGGTT
GCCTGGTGTGGGGCGCCGCGCACCCCTCAGCGGGCGCGGGCCCCGAAAGTCAGTGGCGGGCTCGCCAGGACTCCGAGCG
CAGTAATTTTCTCTCGCTGTGGAGCGCCTGGTGGGTACC GGCCGTAAAACACCCCAAATTCTAAAGGTTGACCTCC

35. >*Lasiodiplodia*_HGN14.1R_ MZ462039

CTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTTTTTCGAGCTCCGGCTCGACTCTCCCACCCTTTGTGAACGTACC
TCTGTTGCTTTGGCGGCTCCGGCCGCCAAAGGACCTTCAAACCTCCAGTCAGTAAACGCAGACGTCTGATAAACAAGTTAA
TAAACTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAAT
TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTC
ATTACAACCCTCAAGCTCTGCTTGGAATTGGGCACCGTCCTCACTGCGGACGCGCCTCAAAGACCTCGGCGGTGGCTGTT
CAGCCCTCAAGCGTAGTAGAATACACCTCGCTTTGGAGCGGTTGGCGTCGCCCCGCCGGACGAACCTTCTGAACCTTCTCA
AGGTTGACCTCGGATCA

36. >*Phaeosphaeriopsis*_HGN3L_ MZ461982

TTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACATTCAGTAGCCCAGCTACTTGTTTACACCCTTGTCTTTTTGCGTACTTAT
CGTTTCCTCGGCGGGCTTGCTTGCCGGTTGGACAACTTTATAACCTTTTTAAATCTTCAATCAGCGTCTGAATAATATACA
ATAATTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAAT
TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTC
ATTTGTACCTTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGTGCTTGTCTTTTTGTAAAGACTCACCTCAAAGTCATTGGCAGCCAGTGTT

TTGGTAGTAAGCGCAGCACATTTTGC GTCTTGGTCCCTTAACAGCAGCATCCATCAAGCCATTTTCTCACTTTGACCTCGG
ATCAGGTATG

37. >*Phyllosticta*_HGN1L_MZ461986

TTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGAAATGTAATAACTTCTATTGAAAGGTTCCAGAGTAGGCGCTACAAC
GCCGAAATGACCTTCTCACCCTTGTGTACTCACTATGTTGCTTTGGCGGGTTCGACCTGGTTCCGACCCAGGCGGCCGGCGC
CCCCAGCCTTAACCTGGACAGGACGCCCCGGCTAAGTGCCCCGCCAGTATACAAAACCTCAAGAATTCATTTTGTGAAGTCCTG
ATATATCATTTAATTGATTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGAT
AAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCGGAGGGCATG
CCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCATCAAGCTCTGCTTGGTATTGGGCAACGTCCGCTGCCGGACGGGCCTTGAAGACCTCG
GCGACGGCGTCCTAGCCTCGAGCGTAGTAGTAAAATATCTCGCTTTGGAGTGCTGGGCGACGGCCGCCGGACAATCGACC
TTCGGTCTATTTTCAAGGTGACCTCGGATCATG

38. >*Phyllosticta*_LCN5L_MZ470604

CTTCCGTAGGGGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGAAATGTAACAACCTTCTATTGAAAGGTTCCAGAGTAGGCGCTACAA
CGCCGAAATGACCTTCTCACCCTTGTGTACTCACTATGTTGCTTTGGCGGGTTCGACCTGGTTCCGACCCAGGCGGCCGGCG
CCCCAGCCTTAACCTGGCCAGGACGCCCCGGCTAAGTGCCCCGCCAGTATACAAAACCTCAAGAATTCATTTTGTGAAGTCCT
GATATATCATTTAATTGATTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGA
TAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCGGAGGGCAT
GCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTATTGGGCAACGTCCGCTGCCGGACGTGCCTTGAAGACCTC
GGCGACGGCGTCCTAGCCTCGAGCGTAGTAGTAAAATATCTCGCTTTGGAGTGCTGGGCGACGGCCGCCGGACAATCGAC
CTTCGGTCTATTTTCCAAGGTGACCTCGATCAGGTAATGCA

39. >*Plectosphaerella*_HGN3T_MZ462053

CTCTCTACTCTTTGTGAACTATTATAGCTGTTGCTTCGGCGGGCGCCCGCGAGGGTGCCCGCCGGTCTCATCAGAATCTCTG
TTTTCGAACCCGACGATACTTCTGAGTGTTCTTAGCGAACTGTCAAAAACCTTTTAAACAACGGATCTCTTGGCTCCAGCATCG
ATGAAGAACGCAGCGAAACGCGATATGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATGGC
GCCTTCCAGTATCCTGGGAGGCATGTCTGTCCGAGCGTCGTTTCAACCCTCGAGCCCCTGTGGCCCCGGCGTTGGGGATCTG
CCACGGCAGGCCCCTAAAACCAGTGGCGGACCCGACGGGCCCTCTCCTTTACGTAGTAGCATTCGCCTCGTATTGGGAGT

CCTCGGCGTCCTGCCTCTAAACCCCCACAAGCCCGCTCCGGCGGCACCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCC
GCTGA ACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA

40. >*Plectosphaerella*_LCN14L_ MZ470459

TCCTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACTGAGTACTATACTCTCTACCCTTTGTGAACTATTATACCTGTTGCTT
CGGCGGCGCCCGATAGGGTGCCCGCCGGTCTCATCAGAATCTCTGTTTTCGAACCCGACGATACTTCTGAGTGTTCTTAGC
GAACTGTCAAACTTTTAACAACGGATCTCTTGGCTCCAGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAACGCGATATGTAATGTGA
ATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATGGCGCCTTCCAGTATCCTGGGAGGCATGCCTGTCCGAGC
GTCGTTTTCAACCCTCGAGCCCCTGTGGCCCGGCGTTGGGGATCTGCCACGGCAGGCCCCCTAAAACCAGTGGCGGACCCGA
TGGGCCCTCTCCTTTACGTAGTAGCATTGCGCTCGTATTGGGAGTCCTCGGCGTCCTGCCTCTAAACCCCCACAAGCCCG
CTTCGGCGGCACCAAAGGT

41. >*Fusarium*_LCN6T_ MZ470446

CTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGTCCCTCGGGGCTTCCGTAGGGGTAACTGCGGAGGGA
TCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCAATTGTTGCCTCGGCGGATCAGCCCGCTCCCGGTAAAAC
GGGACGGCCCGCCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTTCTGAGTAAAACCATAAATAAATCAAACTTTC
AACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGA
ATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAG
CCCCCGGGTTTGGTGTGGGGATCGGCGAGCCCTCGCGGCAAGCCGGCCCCGAAATCTAGTGGCGGTCTCGCTGCAGCTT
CCATTGCGTAGTAGTAAAACCCTCGCAACTGGTACGCGGCGCGGCCAAGCCGTTAAACCCCCAACTTCTGAATGTTGACC
TCGGATCAGGTAGATGC

42 >*Setophoma*_LCN13T_ MZ470584

CTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATCAAAAAGTCAAGTCGGGGGCTGTAAAGCTCTCGTCTACACCCATGTC
TTTTGCGTACTCTTGTTCCTCGGTGGCGCAAGCTGCCGATTGGACAAACCAAAACCTTTTTTTGTAATTGCAATCAGCGTC
TGAAAATAATCTAATTATTTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGA
TAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTTGGTATTCCATGGGGCATG
CCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTTGTTCGTATTACGACTCGCCTTAAATTCATTG
GCAGCCGGCACTTTGGCCTAGGAGCGCAGCACATTTTGCATCGTAGCCCGTTGCACTGGCGTCCATCAAGAACATTTAC
CACGTTTGACCTCGGATCA

43. >*Simplicillium*_LCN17T_MZ470424

GGGCTGCGGAGGGATCATTATCGAGTTTATTCAACTCCCAAACCCTATGTGAACTTACCACTTGTTGCTTCGGCGGGCGCTC
TGGCGCTGCCGGGGGTATCAAACCTCTTATTGTTTTTACAGCATTATCTGAGTGGCCGAAAGGCCAAAAACAAATGAATCA
AAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAA
TTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAA
CCCTCGAGCCCGACTCTTCGGAGGACGGCCCCGGCGTTGGGGACCGGCAGACTGCCCCGCGCCTCCGGGGCGTGGGACGCC
GCCCCCGAAATTTAGTGGCGGGCCCTTCGAGGGCGACCTCTGCGTAGTAACCTTACCTCGCACTGGGAAAATCGAAGCGGCCA
CGCCGTAAAACACCCAACCTATTTTAAGGTGACCTCGAATCAGTACG

44. >*Talaromyces*_LCN4T_MZ471623

GGGGACTCGTGGCACCTCCCACCTTGTCTCTATACACCTGTTGCTTTGGCGGGGCCACCGGGGGCCACCTGGTCGCCGGGG
GACATCTGTCCCCGGGGCCCGCGCCCCGCCGAAGCGCTCTGTGAACCCTGATGAAGATGGGCTGTCTGAGTACTATGAAAAT
TGTCAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTG
CAGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCA
TTTCTGCCCTCAAGCACGG

45. >*Trametes*_HGN11R_MZ461968

CTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAACGAGTTCTGACATGGGTTGTAGCTGGCCTCACGAGGCATGTGCACGC
CCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCACTTACTGTAGGTTTGGCGTGGGCTTCGAGGGCCTTCACGGGCTTTTGAGGCATT
CTGCCTGCCTATGTATCACTACAAACACTATAAAGTAACAGAATGTAATCGCGTCTAACGCATCTTAATACAACCTTTCAGC
AACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATC
ATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATGGTATTCTCAACCCAC
ACATCCTTGCGATGCTTGTGAGGCTTGGACTTGGAGGCTTGTGGCCCCGTCGCGGTTCGGCTCCTCTTGAATGCATTAGCTT
GGTTCCTTGCGGATCGGCTCTCAGTGTGATAATTGTCTACGCTGTGACCGTGAAGCGTTTGGCGAGCTTCTAACCGTCCTG
CTAGGGACAACCTTACTTGACATCTGACCTCAAATCAGGTAGG

46. >*Trametes*_HGN12.2R_MZ461967

TTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAACGAGTTCTGACATGGGTTGTAGCTGGCCTCACGAGGCATGTGCACGCC
CTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCACTTACTGTAGGTTTGGCGTGGGCTTCGAGGGCCTTCACGGGCTTTTGAGGCATT
TGCCTGCCTATGTATCACTACAAACACTATAAAGTAACAGAATGTAATCGCGTCTAACGCATCTTAATACAACCTTTCAGCA

ACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCA
TCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTTCATGGTATTCTCAACCCACA
CATCCTTGTGATGCTTGTGAGGCTTGGACTTGGAGGCTTGTCTGGCCCGTCGCGGTTCGGCTCCTCTTGAATGCATTAGCTTG
GTTCCCTTGCGGATCGGCTCTCAGTGTGATAATTGTCTACGCTGTGACCGTGAAGCGTTTGGCGAGCTTCTAACCGTCCTGC
TAGGGACAACCTTACTTGACATCTGACCTCAAATCAG

47. >*Trametes*_HGN3.1R_MZ461966

CTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAACGAGTTCTGACATGGGTTGTAGCTGGCCTCACGAGGCATGTGCACGC
CCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCACTTACTGTAGGTTTGGCGTGGGCTTCGAGGGCCTTCACGGGCTTTTGAGGCATT
CTGCCTGCCTATGTATCACTACAAACACTATAAAGTAACAGAATGTAATCGCGTCTAACGCATCTTAATACAACCTTTCAGC
AACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATC
ATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTTCATGGTATTCTCAACCCAC
ACATCCTTGTGATGCTTGTGAGGCTTGGACTTGGAGGCTTGTCTGGCCCGTCGCGGTTCGGCTCCTCTTGAATGCATTAGCTT
GGTTCCTTGCGGATCGGCTCTCAGTGTGATAATTGTCTACGCTGTGACCGTGAAGCGTTTGGCGAGCTTCTAACCGTCCTG
CTAGGGACAACCTTACTTGACATCTGACCTCAAATCAGGTAG

48. >*Trametes*_LCN11L_MZ470263

CTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAACGAGTTCTGACATGGGTTGTAGCTGGCCTCACGAGGCATGTGCACGC
CCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCACTTACTGTAGGTTTGGCGTGGGCTTCGAGGGCCTTCACGGGCTTTTGAGGCATT
CTGCCTGCCTATGTATCACTACAAACACTATAAAGTAACAGAATGTAATCGCGTCTAACGCATCTTAATACAACCTTTCAGC
AACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATC
ATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTTCATGGTATTCTCAACCCAC
ACATCCTTGCGATGCTTGTGAGGCTTGGACTTGGAGGCTTGTCTGGCCCGTCGCGGTTCGGCTCCTCTTGAATGCATTAGCTT
GGTTCCTTGCGGATCGGCTCTCAGTGTGATAATTGTCTACGCTGTGACCGTGAAGCGTTTGGCGAGCTTCTAACCGTCCTG
CTAGGGACAACCTTACTTGACATCTGACCTCAAATCAGTACGA

49. >*Trametes*_LCN13L_MZ470264

TTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAACGAGTTCTGACATGGGTTGTAGCTGGCCTCACGAGGCATGTGCACGCC
CTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCACTTACTGTAGGTTTGGCGTGGGCTTCGAGGGCCTTCACGGGCTTTTGAGGCATT
TGCCTGCCTATGTATCACTACGAACACTATAAAGTAACAGAATGTAATCGCGTCTAACGCATCTTAATACAACCTTTCAGCA

ACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCA
TCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTTCATGGTATTCTCAACCCACA
CATCCTTGCGATGCTTGTGAGGCTTGGACTTGGAGGCTTGTGCCCCGTCGCGGTCGGCTCCTCTTGAATGCATTAGCTTG
GTTCCCTTGCGGATCGGCTCTCAGTGTGATAATTGTCTACGCTGTGACCGTGAAGCGTTTGGCGAGCTTCTAACCGTCCTGC
TAGGGACAACCTTACTTGACATCTGACCTCAAATCA

50. >*Guignardia*_HGN2R_ MZ461975

CTTCCGTAGGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGAAATGTAACAACCTTCTATTGAAAGGTTCCAGAGTAGGGCGCTACA
ACGCCGAAATGACCTTCTCACCCTTGTGTACTCACTATGTTGCTTTGGCGGGTTCGACCTGGTTCCGACCCAGGCGGGCCGGC
GCCCCAGCCTTAACCTGGCCAGGACGCCCCGGCTAAGTGCCCGCCAGTATACAAAACCTCAAGAATTCATTTTGTGAAGTCC
TGATATATCATTTAATTGATTAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCG
ATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCGGAGGGCA
TGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTATTGGGCAACGTCCGCTGCCGGACGTGCCTTGAAGACCT
CGGCGACGGCGTCCTAGCCTCGAGCGTAGTAGTAAAATATCTCGCTTTGGAGTGCTGGGCGACGGCCGCCGGACAATCGA
CCTTCGGTCTATTTTCCAAGGTTGACCTCGGATCAGAT

51. >*Trichoderma*_HGN5.1R_ MZ469936

AACTCCAAACCCAATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCCGGGTGCGTCGCAGC
CCCGGACCAAGGCGCCCGCCGGAGGACCAACCAAACTCTTATTGTATACCCCCTCGCGGGTTTTTTTACTATCTGAGCCAT
CTCGGCGCCCCCTCGTGGGCGTTTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAA
CGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAG
TATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGGCCCTTT
ACGGGGGCCGGCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCG
CGGCGCGTCCACAGCCGTTAAACACCCCAAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAA
GCATATCAATAAGGCGGAGGAA

52. >*Trichoderma*_LCN3R_ MZ477227

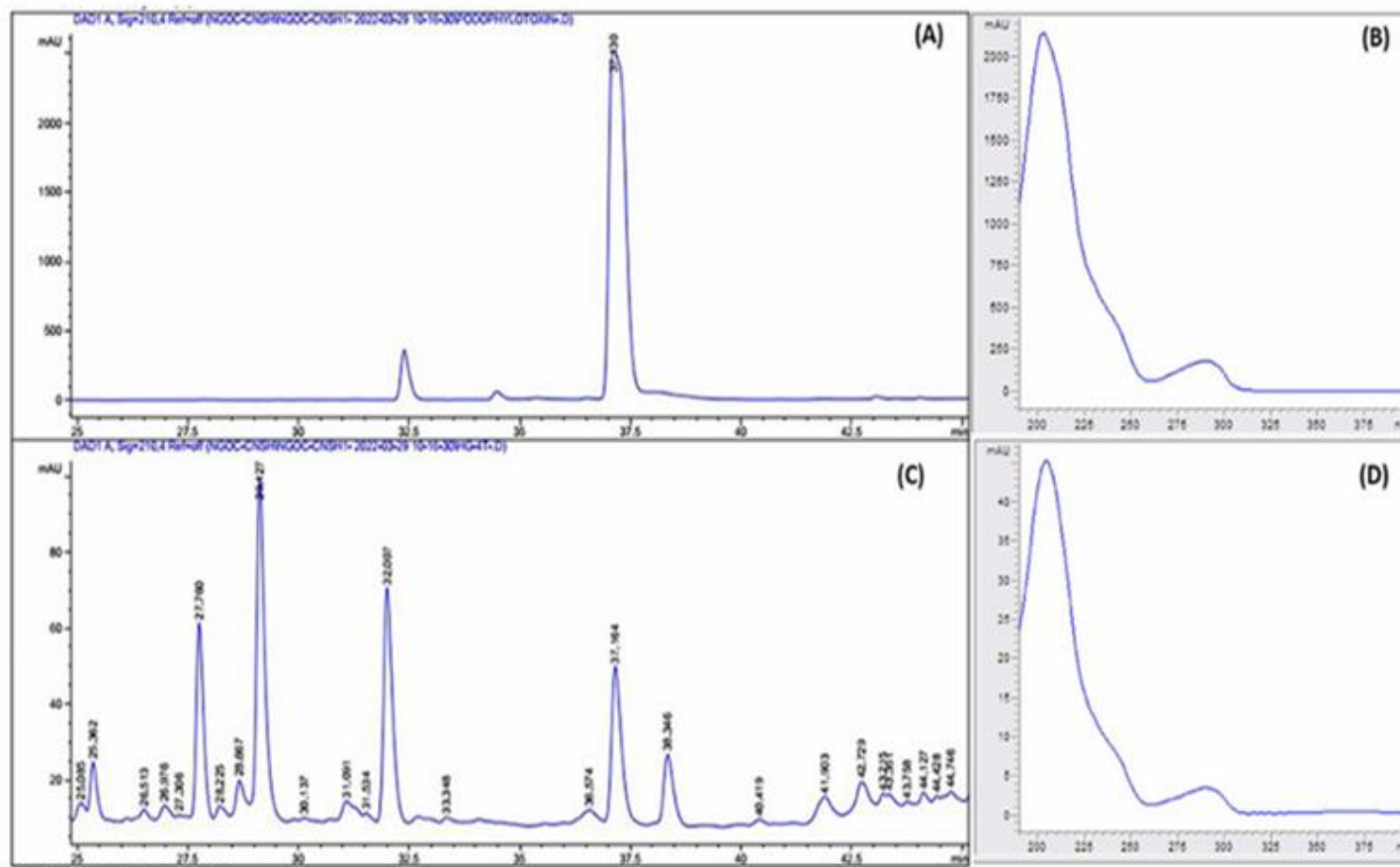
CACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGACCAAGGCGCCCGCCGGAGGAC
CAACCAAACTCTTTTTGTATACCCCCTCGCGGGTTTTTTATAATCTGAGCCTTCTCGGCGCCTCTCGTAGGGCGTTTCGAAA
ATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAA

TTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGT
CATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTCCCTCTGCGGGTGGCCGTCTCCGAAATACA
GTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGCGGCGCGTCCACAGCCGTTAAA
CACCCAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCTAGGTGGGG

53. >*Xylaria*_HGN10R_MZ469932

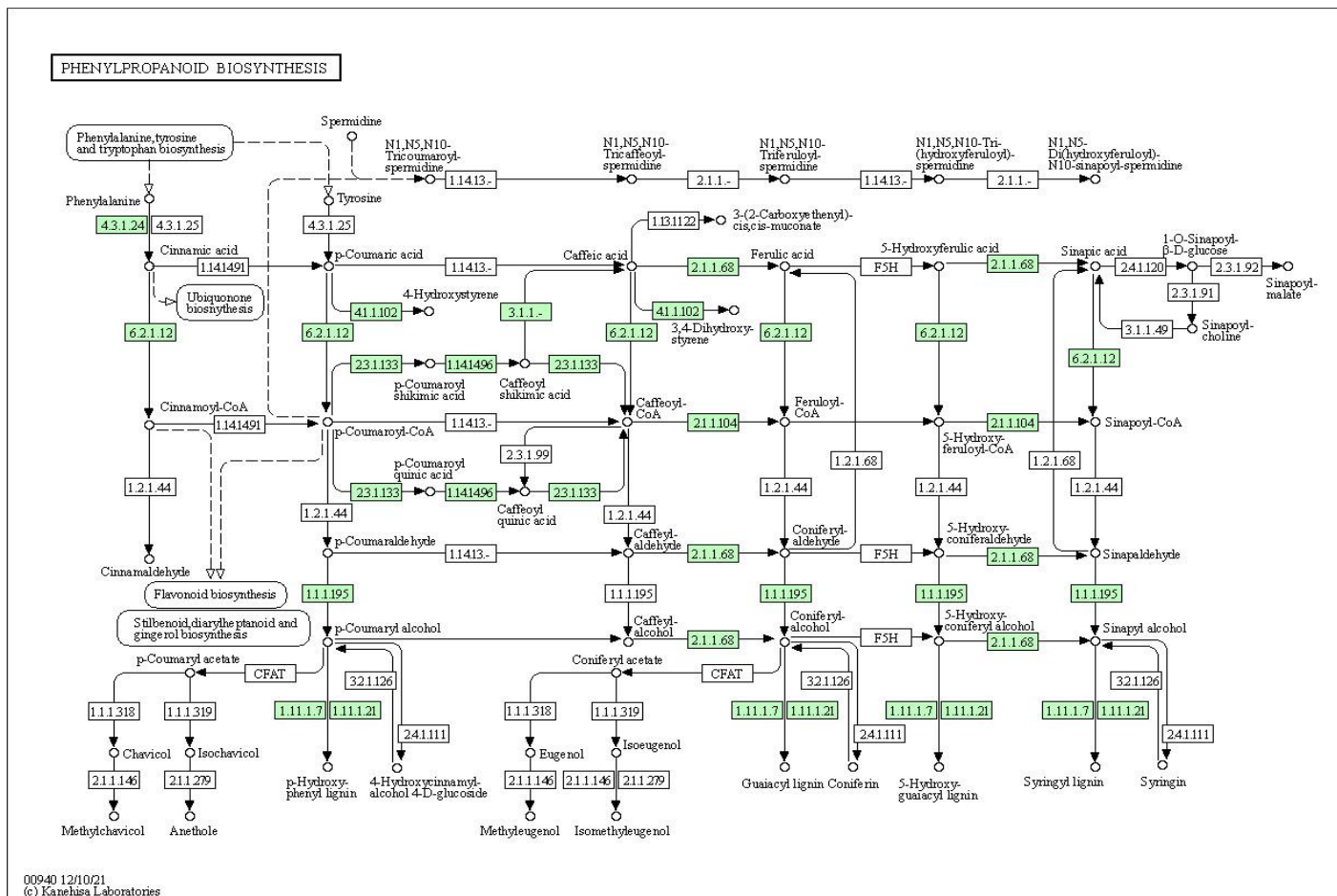
GCAGACTCCTRATCCCTGTGACATACCTTCTGTTGCCTCGGCAGGCCCTGGCCTACCCTGTAGCGCCCCTACRCTGTAGGG
CTTGCTTTAGGGGGAGCGCTGGGGGCACCTGCCGGCGGCTCGCAAACTCTGTTTAGCATTGAATTCTGAACATATAACT
AAATAAATTGAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTG
AATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCATTAGTATTCTAGTGGGCATGCCTGTTCGAGC
GTCATTTCAACCCTTAAGCCCCTGTTGCTTAGCGTTGGGAGCCTACGGCAGCGTAGCTCCCTAAAGTTAGTGGCGTGGTCG
GTTCACACTCCAGACGTAGTAGATTTTCACCTCGCCTGTAGATGGATCGGTCCCCTGCCGTAAAACACCCCAATTTTAAA
GGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCATAAACCCGGAGGAAA

PHỤ LỤC E

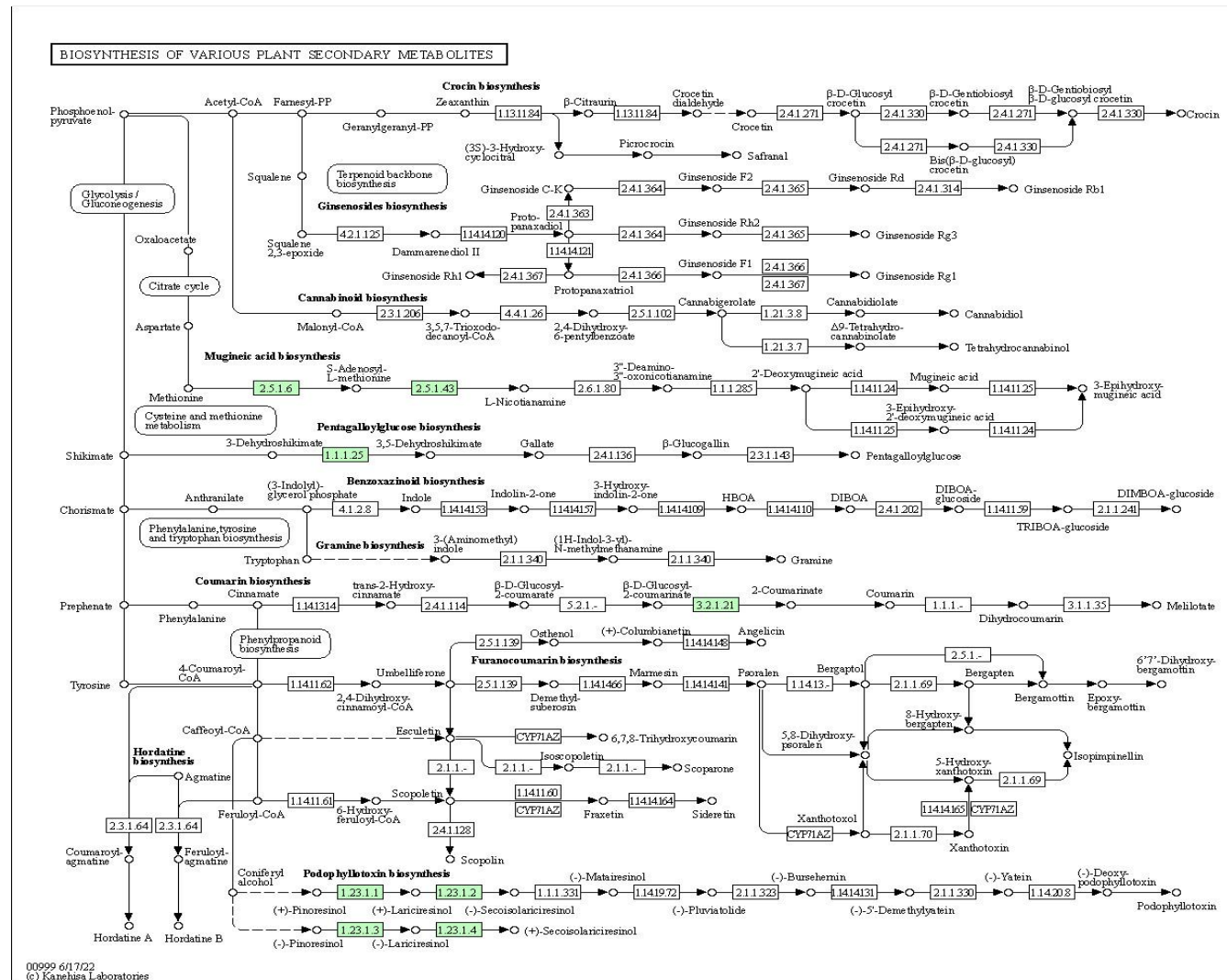


Hình 1E. Xác định PTOX bằng HPLC-DAD. Sắc ký đồ (A) và phổ UV (B) của PTOX chuẩn (Sigma); Sắc ký đồ (C) và phổ UV (D) của dịch chiết HGN13R

PHỤ LỤC F



Hình 1F. Chú giải các gen liên quan con đường sinh tổng hợp podophylotoxin chủng HGN12.1R theo KEGG



Hình 2F. Chú giải các gen liên quan con đường sinh tổng hợp các chất thứ cấp từ thực vật

G-1

PHỤ LỤC G



Hình 1G. Sinh khối tươi ở các môi trường lên men



Hình 2G. Sinh khối khô của nấm ở các môi trường lên men

PHỤ LỤC H
CƠ SỞ DỮ LIỆU CHÚ GIẢI CÁC GEN LIÊN QUAN CON ĐƯỜNG SINH
TỔNG HỢP PODOPHYLOTOXIN
CHỨNG HGN12.1R

Bảng 1H. Kết quả dự đoán các gen liên quan đến con đường sinh tổng hợp podophyllotoxin ở vi nấm giai đoạn từ coniferyl alcohol tới podophyllotoxin
(E-value <1e⁻⁵)

STT	query_id	subject_id	percent_identity	alignment_length	evalue
Gene 2- ODD					
1	2-ODD	g9213.tl	26.761	284	6.34E-18
2	2-ODD	g10191.tl	25.784	287	2.76E-13
3	2-ODD	g10175.tl	24.845	322	9.50E-12
4	2-ODD	g4336.tl	24.296	284	9.90E-11
5	2-ODD	g10284.tl	27.143	210	1.17E-08
6	2-ODD	g9838.tl	28.671	143	1.88E-06
7	2-ODD	g3875.tl	30.693	101	5.20E-06
Gene CYP719A23					
1	CYP719A23	g1641.tl	25.331	529	6.84E-40
2	CYP719A23	g1042.tl	23.222	478	2.10E-36
3	CYP719A23	g1576.tl	25.527	474	7.30E-32
4	CYP719A23	g12300.tl	25.051	491	7.04E-31
5	CYP719A23	g2994.tl	22.851	477	5.52E-30
6	CYP719A23	g3057.tl	24.131	518	8.41E-27
7	CYP719A23	g11336.tl	25.47	479	1.71E-25
8	CYP719A23	g107.tl	22.245	481	9.69E-23
9	CYP719A23	g3234.tl	23.218	435	6.41E-21
10	CYP719A23	g292.tl	32	200	3.28E-20
11	CYP719A23	g8745.tl	27.854	219	9.88E-20
12	CYP719A23	g3440.tl	33.14	172	1.54E-19
13	CYP719A23	g5094.tl	22.475	396	5.99E-19
14	CYP719A23	g1566.tl	25.246	305	2.17E-18
15	CYP719A23	g12085.tl	24.119	369	3.25E-18
16	CYP719A23	g7591.tl	32.796	186	4.50E-18
17	CYP719A23	g1914.tl	24.638	276	9.29E-18
18	CYP719A23	g12010.tl	27.66	188	7.85E-17
19	CYP719A23	g710.tl	28.641	206	9.13E-17
20	CYP719A23	g9823.tl	24.481	241	1.06E-16
21	CYP719A23	g11816.tl	27.928	222	1.36E-16
22	CYP719A23	g5676.tl	29.012	162	1.65E-16
23	CYP719A23	g4487.tl	25.51	196	1.19E-15

STT	query_id	subject_id	percent_identity	alignment_length	evalue
24	CYP719A23	g9667.tl	27.826	230	1.41E-15
25	CYP719A23	g3216.tl	21.839	435	2.00E-15
26	CYP719A23	g8992.tl	21.739	460	3.39E-15
27	CYP719A23	g7324.tl	24.775	222	5.19E-15
28	CYP719A23	g2644.tl	26.54	211	7.93E-15
29	CYP719A23	g5792.tl	26.609	233	8.60E-15
30	CYP719A23	g1371.tl	24.545	220	1.01E-14
31	CYP719A23	g9194.tl	23.385	449	1.09E-14
32	CYP719A23	g858.tl	23	400	3.25E-14
33	CYP719A23	g6023.tl	27.473	182	3.60E-14
34	CYP719A23	g1039.tl	24.855	346	6.59E-14
35	CYP719A23	g395.tl	27.604	192	6.63E-14
36	CYP719A23	g5581.tl	28.313	166	6.74E-14
37	CYP719A23	g1418.tl	25.843	178	9.39E-14
38	CYP719A23	g8102.tl	22.936	436	1.10E-13
39	CYP719A23	g12171.tl	26.21	248	1.13E-13
40	CYP719A23	g10909.tl	25.439	228	1.65E-13
41	CYP719A23	g231.tl	25.681	257	2.88E-13
42	CYP719A23	g2266.tl	23.457	243	3.02E-13
43	CYP719A23	g10542.tl	23.131	428	3.08E-13
44	CYP719A23	g10178.tl	25	160	5.36E-13
45	CYP719A23	g11871.tl	26.512	215	8.18E-13
46	CYP719A23	g6273.tl	28.188	149	1.31E-12
47	CYP719A23	g9719.tl	26.344	186	1.46E-12
48	CYP719A23	g9175.tl	25.967	181	2.14E-12
49	CYP719A23	g3725.tl	29.518	166	2.95E-12
50	CYP719A23	g973.tl	22.479	476	2.97E-12
51	CYP719A23	g1801.tl	24.737	190	3.14E-12
52	CYP719A23	g9074.tl	33.871	124	3.61E-12
53	CYP719A23	g363.tl	20.721	333	3.83E-12
54	CYP719A23	g10866.tl	27.381	168	3.99E-12
55	CYP719A23	g6374.tl	26.695	236	4.59E-12
56	CYP719A23	g6982.tl	22.892	166	4.88E-12
57	CYP719A23	g2649.tl	27.206	136	9.24E-12
58	CYP719A23	g2691.tl	26.471	170	1.16E-11
59	CYP719A23	g11356.tl	25	248	1.46E-11
60	CYP719A23	g3335.tl	22.642	265	1.52E-11
61	CYP719A23	g10108.tl	28.492	179	1.59E-11
62	CYP719A23	g2470.tl	26.776	183	1.72E-11
63	CYP719A23	g6773.tl	29.609	179	2.76E-11
64	CYP719A23	g2973.tl	21.236	518	2.79E-11

STT	query_id	subject_id	percent_identity	alignment_length	evalue
65	CYP719A23	g10080.tl	23.313	163	3.46E-11
66	CYP719A23	g3215.tl	22.323	439	3.68E-11
67	CYP719A23	g7830.tl	25.61	164	5.96E-11
68	CYP719A23	g10543.tl	25.652	230	7.67E-11
69	CYP719A23	g10504.tl	28.426	197	8.47E-11
70	CYP719A23	g1833.tl	28.302	159	8.48E-11
71	CYP719A23	g9783.tl	22.5	160	1.59E-10
72	CYP719A23	g3009.tl	23.81	168	1.95E-10
73	CYP719A23	g9537.tl	22.727	198	3.52E-10
74	CYP719A23	g10001.tl	29.008	131	4.10E-10
75	CYP719A23	g2128.tl	23.837	172	4.38E-10
76	CYP719A23	g10059.tl	27.778	162	8.85E-10
77	CYP719A23	g583.tl	24.084	191	9.05E-10
78	CYP719A23	g7269.tl	25.381	197	9.73E-10
79	CYP719A23	g3509.tl	24.737	190	1.01E-09
80	CYP719A23	g4564.tl	23.113	212	1.40E-09
81	CYP719A23	g10914.tl	23.81	189	1.61E-09
82	CYP719A23	g1837.tl	26.708	161	2.42E-09
83	CYP719A23	g12343.tl	26	200	3.79E-09
84	CYP719A23	g9196.tl	25.166	151	5.67E-09
85	CYP719A23	g8657.tl	23.204	181	6.06E-09
86	CYP719A23	g8868.tl	25.714	175	7.70E-09
87	CYP719A23	g9568.tl	24.503	151	8.60E-09
88	CYP719A23	g9015.tl	22.013	159	8.75E-09
89	CYP719A23	g2512.tl	21.505	186	9.84E-09
90	CYP719A23	g611.tl	22.951	183	1.25E-08
91	CYP719A23	g9768.tl	21.875	160	1.57E-08
92	CYP719A23	g7296.tl	21.858	183	1.71E-08
93	CYP719A23	g7828.tl	28.824	170	1.97E-08
94	CYP719A23	g5670.tl	26.316	171	2.31E-08
95	CYP719A23	g11373.tl	27.966	118	4.09E-08
96	CYP719A23	g2825.tl	29.752	121	4.91E-08
97	CYP719A23	g9071.tl	27.451	153	6.40E-08
98	CYP719A23	g10566.tl	20.561	321	7.76E-08
99	CYP719A23	g326.tl	28.022	182	9.91E-08
100	CYP719A23	g2823.tl	28.834	163	3.68E-07
101	CYP719A23	g11633.tl	26.22	164	4.87E-07
102	CYP719A23	g1512.tl	30.216	139	7.45E-07
103	CYP719A23	g11958.tl	24.859	177	1.41E-06
104	CYP719A23	g2826.tl	24.444	180	1.68E-06
105	CYP719A23	g11337.tl	27.273	99	1.87E-06

STT	query_id	subject_id	percent_identity	alignment_length	evalue
106	CYP719A23	g3287.tl	20.988	162	2.06E-06
107	CYP719A23	g267.tl	24.859	177	2.95E-06
108	CYP719A23	g1534.tl	24.257	202	3.79E-06
109	CYP719A23	g9531.tl	19.795	293	4.65E-06
Gene CYP71BE54					
1	CYP71BE54	g1042.tl	25.161	465	1.02E-37
2	CYP71BE54	g1641.tl	24.319	477	3.19E-35
3	CYP71BE54	g12300.tl	23.077	481	1.79E-28
4	CYP71BE54	g5094.tl	26.179	424	2.90E-27
5	CYP71BE54	g3057.tl	24.173	393	1.07E-26
6	CYP71BE54	g11816.tl	28.716	296	1.64E-23
7	CYP71BE54	g10554.tl	24.503	453	1.72E-23
8	CYP71BE54	g1576.tl	24.508	457	8.00E-22
9	CYP71BE54	g8992.tl	24.565	460	8.55E-22
10	CYP71BE54	g3234.tl	25.25	400	1.32E-21
11	CYP71BE54	g9531.tl	28.669	293	2.21E-21
12	CYP71BE54	g10178.tl	24.518	363	8.05E-21
13	CYP71BE54	g3725.tl	26.523	279	1.50E-20
14	CYP71BE54	g11336.tl	23.061	477	2.62E-20
15	CYP71BE54	g1418.tl	30.052	193	9.20E-20
16	CYP71BE54	g292.tl	21.778	450	1.14E-19
17	CYP71BE54	g1833.tl	24.925	333	2.68E-19
18	CYP71BE54	g3440.tl	31.844	179	6.36E-19
19	CYP71BE54	g7269.tl	25.543	368	1.00E-18
20	CYP71BE54	g6273.tl	23.077	468	1.73E-18
21	CYP71BE54	g9719.tl	25.484	310	2.28E-18
22	CYP71BE54	g2128.tl	26.524	328	2.59E-18
23	CYP71BE54	g2994.tl	23.094	446	3.31E-18
24	CYP71BE54	g5792.tl	30.049	203	4.03E-18
25	CYP71BE54	g6982.tl	31.25	176	6.01E-18
26	CYP71BE54	g2644.tl	23.481	362	8.58E-18
27	CYP71BE54	g1534.tl	23.546	361	8.89E-18
28	CYP71BE54	g1039.tl	30	170	9.73E-18
29	CYP71BE54	g9194.tl	22.749	422	1.11E-17
30	CYP71BE54	g12085.tl	30.864	162	1.74E-17
31	CYP71BE54	g10909.tl	31.928	166	2.50E-17
32	CYP71BE54	g7591.tl	32.768	177	2.64E-17
33	CYP71BE54	g858.tl	24.194	310	4.33E-17
34	CYP71BE54	g11871.tl	28.326	233	5.71E-17
35	CYP71BE54	g231.tl	22.406	424	7.48E-17

STT	query_id	subject_id	percent_identity	alignment_length	evalue
36	CYP71BE54	g8745.tl	28.652	178	8.58E-17
37	CYP71BE54	g10542.tl	24.276	449	1.02E-16
38	CYP71BE54	g1837.tl	24.214	318	1.56E-16
39	CYP71BE54	g1371.tl	21.674	466	2.87E-16
40	CYP71BE54	g12343.tl	28.689	244	5.09E-16
41	CYP71BE54	g9568.tl	23.028	317	6.38E-16
42	CYP71BE54	g107.tl	28.324	173	2.00E-15
43	CYP71BE54	g5581.tl	25.749	334	2.37E-15
44	CYP71BE54	g3009.tl	21.457	508	2.97E-15
45	CYP71BE54	g6374.tl	30.409	171	3.02E-15
46	CYP71BE54	g12171.tl	30.698	215	3.91E-15
47	CYP71BE54	g9074.tl	30.556	180	4.69E-15
48	CYP71BE54	g8102.tl	26.486	185	5.50E-15
49	CYP71BE54	g3215.tl	28.085	235	1.55E-14
50	CYP71BE54	g7324.tl	29.586	169	2.02E-14
51	CYP71BE54	g5676.tl	28.655	171	6.47E-14
52	CYP71BE54	g12010.tl	21.978	364	7.10E-14
53	CYP71BE54	g10866.tl	24.859	177	8.59E-14
54	CYP71BE54	g10566.tl	23.558	208	1.19E-13
55	CYP71BE54	g11356.tl	29.714	175	1.33E-13
56	CYP71BE54	g8657.tl	24.082	245	2.44E-13
57	CYP71BE54	g11373.tl	25.697	323	3.40E-13
58	CYP71BE54	g10543.tl	24.648	426	3.68E-13
59	CYP71BE54	g4487.tl	28.994	169	3.75E-13
60	CYP71BE54	g6023.tl	24.839	310	3.82E-13
61	CYP71BE54	g10914.tl	25.946	185	3.94E-13
62	CYP71BE54	g973.tl	22.422	223	6.64E-13
63	CYP71BE54	g3509.tl	25.688	218	1.14E-12
64	CYP71BE54	g3287.tl	23.899	318	1.20E-12
65	CYP71BE54	g9783.tl	21.013	395	1.31E-12
66	CYP71BE54	g1566.tl	29.885	174	1.62E-12
67	CYP71BE54	g9015.tl	29.412	170	2.19E-12
68	CYP71BE54	g267.tl	24.082	490	2.46E-12
69	CYP71BE54	g11483.tl	22	350	3.67E-12
70	CYP71BE54	g9667.tl	23.741	278	3.96E-12
71	CYP71BE54	g2691.tl	24.468	188	6.01E-12
72	CYP71BE54	g8868.tl	23.355	304	7.34E-12
73	CYP71BE54	g7828.tl	24.125	257	9.06E-12
74	CYP71BE54	g710.tl	25.806	217	1.21E-11
75	CYP71BE54	g9823.tl	26.752	157	3.83E-11
76	CYP71BE54	g1801.tl	25.789	190	4.21E-11

STT	query_id	subject_id	percent_identity	alignment_length	evalue
77	CYP71BE54	g2512.tl	23.394	218	6.03E-11
78	CYP71BE54	g2266.tl	26.415	212	6.59E-11
79	CYP71BE54	g611.tl	25.592	211	8.05E-11
80	CYP71BE54	g9768.tl	22.343	367	1.22E-10
81	CYP71BE54	g6773.tl	26.291	213	1.26E-10
82	CYP71BE54	g6839.tl	20.144	417	4.93E-10
83	CYP71BE54	g1914.tl	26.154	195	5.40E-10
84	CYP71BE54	g3335.tl	26.257	179	1.21E-09
85	CYP71BE54	g583.tl	20.604	364	1.25E-09
86	CYP71BE54	g10080.tl	22.167	406	1.50E-09
87	CYP71BE54	g10001.tl	27.604	192	1.91E-09
88	CYP71BE54	g10504.tl	23.097	381	2.43E-09
89	CYP71BE54	g2470.tl	25.49	204	4.08E-09
90	CYP71BE54	g10200.tl	23.423	222	5.28E-09
91	CYP71BE54	g5670.tl	27.326	172	6.48E-09
92	CYP71BE54	g9196.tl	24.18	244	6.61E-09
93	CYP71BE54	g10059.tl	22.91	323	7.59E-09
94	CYP71BE54	g11252.tl	21.408	341	9.60E-09
95	CYP71BE54	g9175.tl	26.425	193	1.08E-08
96	CYP71BE54	g10108.tl	27.647	170	2.27E-08
97	CYP71BE54	g1512.tl	26.042	192	2.35E-08
98	CYP71BE54	g9071.tl	24.878	205	2.75E-08
99	CYP71BE54	g11958.tl	27.778	180	3.68E-08
100	CYP71BE54	g2973.tl	19.315	409	4.76E-08
101	CYP71BE54	g3216.tl	21.798	445	6.86E-08
102	CYP71BE54	g395.tl	23.858	197	7.54E-08
103	CYP71BE54	g4564.tl	24.022	179	8.28E-08
104	CYP71BE54	g11510.tl	20.048	414	1.51E-07
105	CYP71BE54	g2825.tl	23.316	193	2.06E-07
106	CYP71BE54	g9537.tl	24.737	190	3.30E-07
107	CYP71BE54	g363.tl	24.54	163	4.46E-07
108	CYP71BE54	g7296.tl	23.958	192	8.58E-07
109	CYP71BE54	g11337.tl	24.107	224	8.63E-07
110	CYP71BE54	g11633.tl	25.62	242	9.91E-07
111	CYP71BE54	g9472.tl	22.273	220	1.16E-06
112	CYP71BE54	g2649.tl	26.163	172	1.29E-06
113	CYP71BE54	g12573.tl	23.757	181	1.38E-06
114	CYP71BE54	g7830.tl	23.116	199	1.60E-06
115	CYP71BE54	g11629.tl	22.917	288	2.65E-06
116	CYP71BE54	g9536.tl	23.894	226	2.91E-06
117	CYP71BE54	g11213.tl	30.337	89	4.06E-06

STT	query_id	subject_id	percent_identity	alignment_length	evalue
118	CYP71BE54	g9098.tl	21.935	155	4.35E-06
119	CYP71BE54	g5149.tl	24.084	191	8.76E-06
Gene CYP71CU1					
1	CYP71CU1	g1042.tl	23.679	473	1.25E-26
2	CYP71CU1	g1641.tl	22.474	485	8.09E-26
3	CYP71CU1	g12300.tl	22.5	480	9.18E-23
4	CYP71CU1	g8992.tl	23.702	443	1.45E-22
5	CYP71CU1	g5094.tl	24.793	363	3.72E-20
6	CYP71CU1	g3234.tl	24.51	408	4.18E-19
7	CYP71CU1	g2994.tl	22.803	421	8.26E-19
8	CYP71CU1	g8745.tl	31.138	167	3.31E-18
9	CYP71CU1	g10178.tl	29.586	169	5.69E-18
10	CYP71CU1	g11816.tl	26.042	192	3.41E-16
11	CYP71CU1	g107.tl	25.221	226	1.36E-15
12	CYP71CU1	g3057.tl	31.944	144	1.38E-15
13	CYP71CU1	g10566.tl	20.728	357	1.57E-15
14	CYP71CU1	g3440.tl	28.155	206	1.73E-15
15	CYP71CU1	g11252.tl	21.93	342	5.49E-15
16	CYP71CU1	g8102.tl	21.556	450	7.05E-15
17	CYP71CU1	g3009.tl	22.961	466	7.93E-15
18	CYP71CU1	g5670.tl	22.488	418	2.24E-14
19	CYP71CU1	g2266.tl	22.957	257	2.39E-14
20	CYP71CU1	g11336.tl	21.457	494	2.99E-14
21	CYP71CU1	g10554.tl	27.711	166	6.65E-14
22	CYP71CU1	g1418.tl	22.857	210	6.72E-14
23	CYP71CU1	g292.tl	21.396	444	1.43E-13
24	CYP71CU1	g9074.tl	27.717	184	1.64E-13
25	CYP71CU1	g8868.tl	27.451	306	2.22E-13
26	CYP71CU1	g11373.tl	28.91	211	2.53E-13
27	CYP71CU1	g9015.tl	21.716	373	2.95E-13
28	CYP71CU1	g8657.tl	25.403	248	5.11E-13
29	CYP71CU1	g7828.tl	25.764	229	6.47E-13
30	CYP71CU1	g9719.tl	24.324	259	7.94E-13
31	CYP71CU1	g2644.tl	21.509	265	8.09E-13
32	CYP71CU1	g6273.tl	22.803	421	9.05E-13
33	CYP71CU1	g9568.tl	25.098	255	9.58E-13
34	CYP71CU1	g3725.tl	26.54	211	1.88E-12
35	CYP71CU1	g1914.tl	26.809	235	1.95E-12
36	CYP71CU1	g231.tl	23.013	239	1.98E-12
37	CYP71CU1	g1576.tl	20.852	446	3.63E-12
38	CYP71CU1	g4487.tl	23.622	254	3.91E-12

STT	query_id	subject_id	percent_identity	alignment_length	evalue
39	CYP71CU1	g7324.tl	23.684	228	4.88E-12
40	CYP71CU1	g5581.tl	28.485	165	5.74E-12
41	CYP71CU1	g5792.tl	22.628	274	5.90E-12
42	CYP71CU1	g9823.tl	21.862	247	6.54E-12
43	CYP71CU1	g2826.tl	21.343	417	6.94E-12
44	CYP71CU1	g1534.tl	22.177	487	8.97E-12
45	CYP71CU1	g3216.tl	23.039	408	9.47E-12
46	CYP71CU1	g6374.tl	30.508	118	1.03E-11
47	CYP71CU1	g5676.tl	23.361	244	1.07E-11
48	CYP71CU1	g3215.tl	26.667	225	1.23E-11
49	CYP71CU1	g9768.tl	20.69	377	1.83E-11
50	CYP71CU1	g11510.tl	21.581	468	2.32E-11
51	CYP71CU1	g11483.tl	26.163	172	2.81E-11
52	CYP71CU1	g7591.tl	25.1	251	2.98E-11
53	CYP71CU1	g267.tl	24.67	227	3.37E-11
54	CYP71CU1	g12010.tl	24.607	191	5.51E-11
55	CYP71CU1	g4564.tl	28.959	221	1.26E-10
56	CYP71CU1	g10914.tl	21.958	378	1.33E-10
57	CYP71CU1	g12085.tl	21.084	332	2.55E-10
58	CYP71CU1	g6982.tl	24.444	180	3.68E-10
59	CYP71CU1	g10542.tl	25.301	332	4.04E-10
60	CYP71CU1	g9531.tl	26.38	163	4.46E-10
61	CYP71CU1	g2973.tl	19.86	428	7.86E-10
62	CYP71CU1	g7269.tl	20.617	519	1.43E-09
63	CYP71CU1	g11871.tl	22.41	415	1.52E-09
64	CYP71CU1	g1039.tl	25.907	193	1.53E-09
65	CYP71CU1	g2128.tl	21.923	260	1.64E-09
66	CYP71CU1	g1566.tl	23.077	182	2.05E-09
67	CYP71CU1	g583.tl	20.8	250	3.30E-09
68	CYP71CU1	g9196.tl	25.14	179	4.22E-09
69	CYP71CU1	g10909.tl	20.541	185	4.71E-09
70	CYP71CU1	g3335.tl	25.105	239	6.53E-09
71	CYP71CU1	g6839.tl	22.177	248	9.61E-09
72	CYP71CU1	g9071.tl	25	172	2.36E-08
73	CYP71CU1	g1833.tl	24.39	164	2.59E-08
74	CYP71CU1	g9194.tl	20.428	421	2.84E-08
75	CYP71CU1	g710.tl	20.661	242	3.09E-08
76	CYP71CU1	g2649.tl	24.691	162	3.12E-08
77	CYP71CU1	g10080.tl	25.989	177	3.61E-08
78	CYP71CU1	g11356.tl	25	164	5.40E-08
79	CYP71CU1	g1371.tl	20.576	243	7.81E-08

STT	query_id	subject_id	percent_identity	alignment_length	evalue
80	CYP71CU1	g11296.tl	25	176	8.88E-08
81	CYP71CU1	g395.tl	21.287	202	1.21E-07
82	CYP71CU1	g9537.tl	22.648	287	2.23E-07
83	CYP71CU1	g858.tl	20.741	270	2.56E-07
84	CYP71CU1	g2825.tl	21.081	185	3.17E-07
85	CYP71CU1	g6023.tl	19.184	245	3.32E-07
86	CYP71CU1	g2691.tl	23.729	177	3.85E-07
87	CYP71CU1	g3287.tl	23.95	238	4.24E-07
88	CYP71CU1	g2512.tl	20.553	253	6.70E-07
89	CYP71CU1	g10200.tl	23.464	179	6.78E-07
90	CYP71CU1	g2823.tl	27.273	165	8.81E-07
91	CYP71CU1	g12343.tl	22.167	203	9.00E-07
92	CYP71CU1	g9783.tl	22.148	149	1.01E-06
93	CYP71CU1	g1801.tl	21.898	274	1.16E-06
94	CYP71CU1	g363.tl	21.739	161	1.78E-06
95	CYP71CU1	g12573.tl	25.373	134	2.15E-06
96	CYP71CU1	g10866.tl	22.01	209	2.94E-06
97	CYP71CU1	g5149.tl	21.604	449	4.65E-06
98	CYP71CU1	g10543.tl	23.476	443	4.96E-06
99	CYP71CU1	g7296.tl	20.968	248	5.57E-06
100	CYP71CU1	g326.tl	23.27	159	9.11E-06
101	CYP71CU1	g2470.tl	21.028	214	9.56E-06
Gene CYP82D61					
1	CYP82D61	g12300.tl	23.669	507	1.14E-31
2	CYP82D61	g1641.tl	25	500	1.97E-31
3	CYP82D61	g3057.tl	25.786	477	5.79E-28
4	CYP82D61	g1042.tl	24.593	492	4.59E-27
5	CYP82D61	g5094.tl	25.754	431	2.40E-26
6	CYP82D61	g2994.tl	24.118	510	1.66E-25
7	CYP82D61	g8745.tl	23.297	455	4.44E-23
8	CYP82D61	g3440.tl	32.381	210	1.33E-22
9	CYP82D61	g1039.tl	31.076	251	7.54E-21
10	CYP82D61	g11336.tl	24.089	494	2.36E-20
11	CYP82D61	g3234.tl	32.941	170	4.02E-20
12	CYP82D61	g8992.tl	24.078	461	4.15E-19
13	CYP82D61	g5676.tl	31.222	221	1.15E-18
14	CYP82D61	g107.tl	30	190	1.33E-18
15	CYP82D61	g7591.tl	35.87	184	1.75E-18
16	CYP82D61	g9074.tl	28.679	265	2.12E-18
17	CYP82D61	g9194.tl	24.194	434	3.63E-18
18	CYP82D61	g10178.tl	32.164	171	7.15E-18

STT	query_id	subject_id	percent_identity	alignment_length	evalue
19	CYP82D61	g1833.tl	23.292	322	1.31E-17
20	CYP82D61	g4487.tl	28.755	233	2.30E-17
21	CYP82D61	g3215.tl	31.674	221	3.15E-17
22	CYP82D61	g858.tl	27.966	236	3.42E-17
23	CYP82D61	g1914.tl	31.214	173	1.31E-16
24	CYP82D61	g1418.tl	29.341	167	1.36E-16
25	CYP82D61	g9667.tl	27.895	190	6.85E-16
26	CYP82D61	g12085.tl	22.126	461	8.12E-16
27	CYP82D61	g9783.tl	29.762	168	9.15E-16
28	CYP82D61	g5792.tl	27.027	259	1.28E-15
29	CYP82D61	g6374.tl	32.353	170	1.82E-15
30	CYP82D61	g2973.tl	24.146	439	1.86E-15
31	CYP82D61	g9531.tl	29.388	245	2.08E-15
32	CYP82D61	g2266.tl	27.451	255	2.28E-15
33	CYP82D61	g3725.tl	31.138	167	3.08E-15
34	CYP82D61	g6982.tl	28.814	177	5.01E-15
35	CYP82D61	g11816.tl	29.94	167	6.71E-15
36	CYP82D61	g11373.tl	26.46	291	2.06E-14
37	CYP82D61	g9823.tl	27.67	206	2.17E-14
38	CYP82D61	g8102.tl	26.538	260	2.67E-14
39	CYP82D61	g2644.tl	26.57	207	4.50E-14
40	CYP82D61	g10914.tl	32.639	144	5.05E-14
41	CYP82D61	g5670.tl	25.974	308	5.24E-14
42	CYP82D61	g6273.tl	29.744	195	5.84E-14
43	CYP82D61	g7324.tl	28.507	221	1.02E-13
44	CYP82D61	g292.tl	26.429	280	1.60E-13
45	CYP82D61	g3287.tl	29.358	218	2.04E-13
46	CYP82D61	g583.tl	26.471	204	2.64E-13
47	CYP82D61	g10909.tl	25.444	169	4.00E-13
48	CYP82D61	g10059.tl	26.636	214	4.08E-13
49	CYP82D61	g611.tl	29.508	183	4.36E-13
50	CYP82D61	g1837.tl	24.401	459	5.08E-13
51	CYP82D61	g1576.tl	26.238	202	7.99E-13
52	CYP82D61	g8868.tl	26.54	211	1.15E-12
53	CYP82D61	g2128.tl	27.723	202	1.32E-12
54	CYP82D61	g9719.tl	27.624	181	2.37E-12
55	CYP82D61	g9568.tl	26.102	295	4.73E-12
56	CYP82D61	g12343.tl	25.703	249	5.16E-12
57	CYP82D61	g231.tl	23.353	334	5.67E-12
58	CYP82D61	g3009.tl	21.368	468	6.17E-12
59	CYP82D61	g1801.tl	23.35	394	7.03E-12

STT	query_id	subject_id	percent_identity	alignment_length	evalue
60	CYP82D61	g12010.tl	27.746	173	1.19E-11
61	CYP82D61	g10080.tl	27.807	187	1.96E-11
62	CYP82D61	g9196.tl	25.592	211	2.11E-11
63	CYP82D61	g9098.tl	25.362	276	2.63E-11
64	CYP82D61	g6839.tl	26.519	181	2.87E-11
65	CYP82D61	g6023.tl	23.024	291	3.11E-11
66	CYP82D61	g2691.tl	27.32	194	3.18E-11
67	CYP82D61	g8657.tl	26.087	184	4.42E-11
68	CYP82D61	g2826.tl	29.609	179	5.04E-11
69	CYP82D61	g973.tl	25.904	166	5.59E-11
70	CYP82D61	g1566.tl	28.251	223	5.88E-11
71	CYP82D61	g11510.tl	25	244	6.04E-11
72	CYP82D61	g3335.tl	27.184	206	6.89E-11
73	CYP82D61	g9175.tl	27.807	187	9.91E-11
74	CYP82D61	g9015.tl	29.412	170	1.19E-10
75	CYP82D61	g11871.tl	25.957	235	1.41E-10
76	CYP82D61	g10542.tl	23.896	385	2.15E-10
77	CYP82D61	g10554.tl	25.628	199	2.27E-10
78	CYP82D61	g10866.tl	28.859	149	5.30E-10
79	CYP82D61	g12171.tl	28.44	218	8.40E-10
80	CYP82D61	g10566.tl	22.822	241	8.89E-10
81	CYP82D61	g10108.tl	31.737	167	9.42E-10
82	CYP82D61	g11356.tl	25.888	197	1.12E-09
83	CYP82D61	g3216.tl	27.976	168	2.07E-09
84	CYP82D61	g3509.tl	27.826	230	8.71E-09
85	CYP82D61	g9768.tl	24.581	179	9.22E-09
86	CYP82D61	g11958.tl	28.492	179	1.13E-08
87	CYP82D61	g1371.tl	23.622	254	1.15E-08
88	CYP82D61	g10001.tl	26.042	192	1.22E-08
89	CYP82D61	g11252.tl	23.209	349	1.73E-08
90	CYP82D61	g11337.tl	25.217	230	1.81E-08
91	CYP82D61	g2512.tl	26.374	182	2.24E-08
92	CYP82D61	g5581.tl	27.368	190	2.37E-08
93	CYP82D61	g2649.tl	24.277	173	3.06E-08
94	CYP82D61	g7828.tl	23.276	232	3.28E-08
95	CYP82D61	g363.tl	28.144	167	4.15E-08
96	CYP82D61	g11296.tl	25.49	204	6.37E-08
97	CYP82D61	g10200.tl	27.647	170	7.17E-08
98	CYP82D61	g6773.tl	24.645	211	7.52E-08
99	CYP82D61	g9071.tl	27.174	184	1.91E-07
100	CYP82D61	g11483.tl	24.731	186	3.12E-07

STT	query_id	subject_id	percent_identity	alignment_length	evalue
101	CYP82D61	g9537.tl	23.593	462	4.08E-07
102	CYP82D61	g12573.tl	25.134	187	5.40E-07
103	CYP82D61	g9390.tl	22.727	396	5.94E-07
104	CYP82D61	g2470.tl	26.63	184	9.43E-07
105	CYP82D61	g10504.tl	25.641	195	9.89E-07
106	CYP82D61	g4564.tl	26.627	169	1.23E-06
107	CYP82D61	g5149.tl	22.676	441	2.35E-06
108	CYP82D61	g4899.tl	25.381	197	4.77E-06
109	CYP82D61	g9472.tl	24.561	228	5.19E-06
110	CYP82D61	g2823.tl	27.895	190	5.89E-06
111	CYP82D61	g10543.tl	21.081	370	6.60E-06
Gene OMT1					
1	OMT1	g3739.tl	25	348	4.35E-15
2	OMT1	g10850.tl	27.119	295	5.47E-15
3	OMT1	g616.tl	25.074	339	6.09E-15
4	OMT1	g5203.tl	26.444	329	3.30E-13
5	OMT1	g7989.tl	32.143	168	5.65E-13
6	OMT1	g1911.tl	24.09	357	5.90E-13
7	OMT1	g7374.tl	32.468	154	2.20E-12
8	OMT1	g3329.tl	31.788	151	4.42E-12
9	OMT1	g3378.tl	26.648	349	4.86E-12
10	OMT1	g8000.tl	27.027	222	5.21E-12
11	OMT1	g3951.tl	29.94	167	7.72E-12
12	OMT1	g4872.tl	30.508	177	5.57E-11
13	OMT1	g8859.tl	27.607	163	1.59E-10
14	OMT1	g2421.tl	29.762	168	1.88E-10
15	OMT1	g3574.tl	29.139	151	6.17E-09
16	OMT1	g1099.tl	30	160	6.56E-09
17	OMT1	g7087.tl	27.333	150	9.58E-09
18	OMT1	g7168.tl	28.571	147	3.06E-08
19	OMT1	g3519.tl	31.013	158	3.85E-08
20	OMT1	g12335.tl	26.667	180	4.73E-08
21	OMT1	g294.tl	25.352	213	1.24E-06
22	OMT1	g9818.tl	26.486	185	1.33E-06
23	OMT1	g11439.tl	24.848	165	9.89E-06
Gene OMT3					
1	OMT3	g7168.tl	28.417	278	3.75E-20
2	OMT3	g7087.tl	30.952	210	4.47E-20
3	OMT3	g10850.tl	26	350	1.28E-18
4	OMT3	g12335.tl	32.24	183	9.30E-18
5	OMT3	g3739.tl	26.575	365	9.81E-18

STT	query_id	subject_id	percent_identity	alignment_length	evalue
6	OMT3	g3951.tl	23.529	357	1.27E-17
7	OMT3	g7374.tl	25.949	316	1.40E-15
8	OMT3	g1099.tl	25.284	352	7.93E-15
9	OMT3	g3329.tl	31.333	150	6.75E-14
10	OMT3	g8859.tl	33.728	169	4.33E-13
11	OMT3	g1911.tl	23.851	348	8.61E-13
12	OMT3	g8000.tl	23.626	364	9.86E-13
13	OMT3	g7989.tl	31.928	166	1.53E-12
14	OMT3	g294.tl	32.192	146	1.63E-12
15	OMT3	g4872.tl	24.797	246	2.12E-12
16	OMT3	g4236.tl	28.846	156	2.47E-12
17	OMT3	g616.tl	23.92	301	3.25E-12
18	OMT3	g3519.tl	31.737	167	5.63E-12
19	OMT3	g2421.tl	25.519	337	1.14E-11
20	OMT3	g5203.tl	28.634	227	2.67E-10
21	OMT3	g3378.tl	23.867	331	3.21E-10
22	OMT3	g9818.tl	23.546	361	1.74E-09
23	OMT3	g11439.tl	25	192	3.88E-08
24	OMT3	g2202.tl	22.034	354	3.92E-08
25	OMT3	g307.tl	22.5	320	2.03E-07
26	OMT3	g5595.tl	28.025	157	6.90E-07
27	OMT3	g3574.tl	30.526	95	8.02E-06
Gene PLR					
1	PLR	g392.tl	26.744	258	1.59E-12
2	PLR	g2800.tl	25.097	259	4.20E-10
3	PLR	g9678.tl	26.966	267	2.65E-09
4	PLR	g5323.tl	26.721	247	5.07E-08
5	PLR	g7733.tl	29.936	157	2.50E-07
Gene SDH					
1	SDH	g11733.tl	35.448	268	5.39E-40
2	SDH	g12368.tl	35.955	267	2.10E-36
3	SDH	g2821.tl	35.341	249	2.94E-35
4	SDH	g4796.tl	29.151	271	2.80E-30
5	SDH	g10642.tl	31.765	255	6.12E-28
6	SDH	g1875.tl	29.964	277	1.75E-27
7	SDH	g4795.tl	33.333	252	4.61E-26
8	SDH	g1020.tl	29.675	246	8.12E-26
9	SDH	g1261.tl	29.368	269	1.86E-25
10	SDH	g7057.tl	29.249	253	3.22E-25
11	SDH	g5174.tl	29.963	267	5.71E-25
12	SDH	g7685.tl	33.212	274	5.88E-25

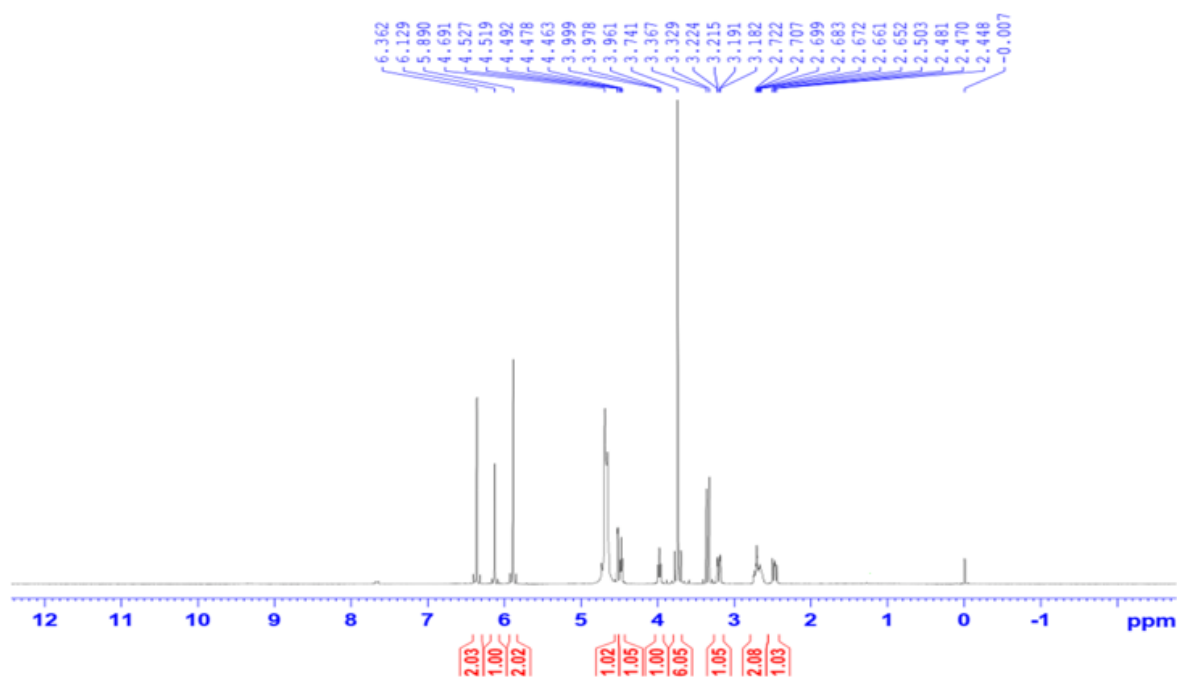
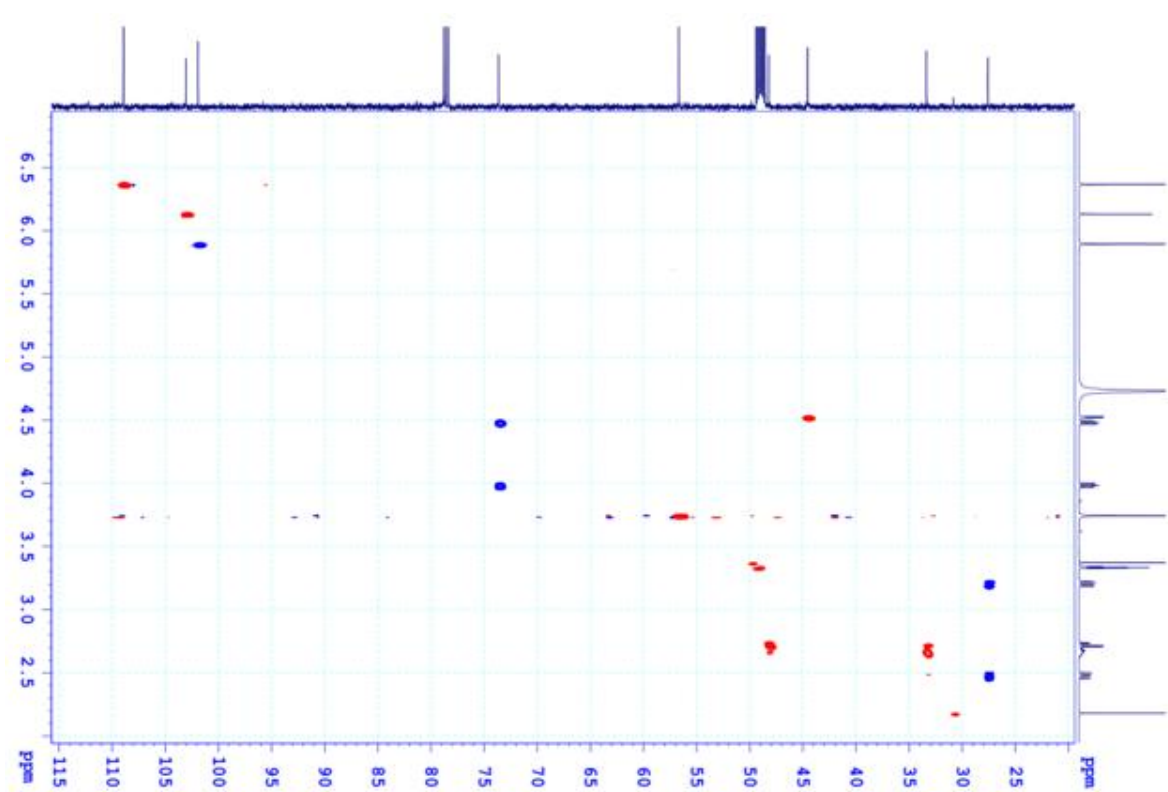
STT	query_id	subject_id	percent_identity	alignment_length	evalue
13	SDH	g6755.tl	32.8	250	6.14E-25
14	SDH	g1878.tl	30.851	282	1.29E-24
15	SDH	g6069.tl	28.016	257	1.47E-24
16	SDH	g7536.tl	30.292	274	3.86E-24
17	SDH	g10559.tl	30.153	262	8.46E-24
18	SDH	g10181.tl	28.736	261	1.12E-23
19	SDH	g12571.tl	31.086	267	1.21E-23
20	SDH	g1661.tl	31.694	183	2.63E-23
21	SDH	g12272.tl	29.008	262	3.23E-23
22	SDH	g4654.tl	32.271	251	6.90E-23
23	SDH	g12572.tl	30.556	252	1.62E-22
24	SDH	g3542.tl	26.316	304	1.70E-22
25	SDH	g1326.tl	29.615	260	5.82E-22
26	SDH	g6644.tl	25.954	262	6.29E-22
27	SDH	g8765.tl	30.258	271	1.60E-21
28	SDH	g2221.tl	27.798	277	2.13E-21
29	SDH	g4822.tl	30.35	257	5.54E-21
30	SDH	g5768.tl	32.558	258	5.74E-21
31	SDH	g1416.tl	26.415	265	8.81E-21
32	SDH	g9180.tl	26.692	266	4.90E-20
33	SDH	g1327.tl	30.12	249	6.01E-20
34	SDH	g7059.tl	30.729	192	7.17E-20
35	SDH	g2174.tl	27.444	266	9.65E-20
36	SDH	g4843.tl	28.452	239	1.32E-19
37	SDH	g7462.tl	28.723	282	1.41E-19
38	SDH	g92.tl	28.244	262	1.68E-19
39	SDH	g6230.tl	28.351	194	2.14E-19
40	SDH	g6230.tl	25.121	207	9.07E-15
41	SDH	g8955.tl	25.856	263	2.56E-19
42	SDH	g3060.tl	25.758	264	3.50E-19
43	SDH	g9669.tl	27.519	258	4.43E-19
44	SDH	g3500.tl	33.824	204	5.22E-19
45	SDH	g5596.tl	29.572	257	2.68E-18
46	SDH	g6656.tl	28.364	275	2.97E-18
47	SDH	g3408.tl	33.005	203	3.07E-18
48	SDH	g2212.tl	27.888	251	3.73E-18
49	SDH	g2179.tl	28.992	238	5.98E-18
50	SDH	g2391.tl	27.027	259	1.77E-17
51	SDH	g5666.tl	27.652	264	2.34E-17
52	SDH	g4718.tl	26.692	266	3.60E-17
53	SDH	g1244.tl	28.517	263	3.64E-17

STT	query_id	subject_id	percent_identity	alignment_length	evalue
54	SDH	g8957.tl	27.536	207	1.14E-16
55	SDH	g11449.tl	25.758	198	2.41E-16
56	SDH	g193.tl	29.651	172	3.16E-16
57	SDH	g6745.tl	27.823	248	3.77E-16
58	SDH	g10554.tl	30.385	260	5.51E-16
59	SDH	g4711.tl	25.547	274	5.71E-16
60	SDH	g12406.tl	27.612	268	7.11E-16
61	SDH	g6841.tl	28.947	228	1.21E-15
62	SDH	g1420.tl	28.627	255	1.45E-15
63	SDH	g8400.tl	23.322	283	1.53E-15
64	SDH	g10549.tl	26.538	260	1.90E-15
65	SDH	g7877.tl	29.963	267	2.55E-15
66	SDH	g7520.tl	26.667	240	2.79E-15
67	SDH	g11804.tl	27.203	261	7.62E-15
68	SDH	g7586.tl	27.715	267	1.44E-14
69	SDH	g8371.tl	27.306	271	1.48E-14
70	SDH	g7179.tl	24.803	254	1.77E-14
71	SDH	g8418.tl	27.228	202	6.52E-14
72	SDH	g627.tl	29.167	264	7.99E-14
73	SDH	g7117.tl	27.119	177	2.39E-13
74	SDH	g7538.tl	25.806	279	3.27E-13
75	SDH	g6595.tl	21.673	263	3.47E-13
76	SDH	g2085.tl	27.317	205	5.27E-13
77	SDH	g6843.tl	27.715	267	5.71E-13
78	SDH	g5665.tl	24.818	274	1.28E-12
79	SDH	g632.tl	28	275	1.92E-12
80	SDH	g2217.tl	25.283	265	2.90E-12
81	SDH	g10922.tl	26.119	268	2.93E-12
82	SDH	g5236.tl	31.905	210	3.22E-12
83	SDH	g5791.tl	26.51	298	5.00E-12
84	SDH	g7458.tl	30.415	217	6.42E-12
85	SDH	g2972.tl	24.126	286	1.11E-11
86	SDH	g7251.tl	28.409	264	1.23E-11
87	SDH	g4866.tl	29.907	214	1.47E-11
88	SDH	g3423.tl	28.293	205	2.04E-11
89	SDH	g3963.tl	26.054	261	3.44E-11
90	SDH	g4357.tl	26.007	273	3.55E-11
91	SDH	g4332.tl	29.63	189	9.62E-11
92	SDH	g3823.tl	27.66	188	2.19E-10
93	SDH	g1241.tl	27.652	264	7.58E-10
94	SDH	g7464.tl	23.86	285	1.88E-09

STT	query_id	subject_id	percent_identity	alignment_length	evalue
95	SDH	g4468.tl	28.718	195	2.15E-09
96	SDH	g1412.tl	27.419	248	2.75E-09
97	SDH	g658.tl	26.368	201	1.32E-08
98	SDH	g3724.tl	29.358	109	1.41E-08
99	SDH	g5828.tl	25	244	1.48E-08
100	SDH	g3029.tl	26.852	216	2.57E-08
101	SDH	g9555.tl	30.939	181	2.77E-08
102	SDH	g3514.tl	24.862	181	3.11E-08
103	SDH	g9635.tl	29.57	186	3.31E-08
104	SDH	g11078.tl	29.167	216	4.15E-08
105	SDH	g732.tl	24.016	254	4.65E-08
106	SDH	g3421.tl	27.513	189	8.96E-08
107	SDH	g255.tl	25.66	265	1.22E-07
108	SDH	g6278.tl	26.257	179	1.99E-07
109	SDH	g2289.tl	31.69	142	2.95E-07
110	SDH	g10581.tl	27.273	187	5.02E-07
111	SDH	g9816.tl	25.824	182	1.48E-06
112	SDH	g8409.tl	24.762	210	1.62E-06
113	SDH	g12057.tl	32.222	90	1.73E-06
114	SDH	g10054.tl	25.263	190	5.35E-06
115	SDH	g6627.tl	31.818	88	5.71E-06
116	SDH	g848.tl	25.882	170	6.16E-06
117	SDH	g6967.tl	26.259	278	6.41E-06
118	SDH	g4241.tl	50	44	7.22E-06
Gene VdtD					
1	VdtD	g9688.tl	39.068	558	2.61E-119
2	VdtD	g7477.tl	33.904	584	1.39E-98
3	VdtD	g6718.tl	28.803	493	1.25E-49
4	VdtD	g6895.tl	27.076	554	1.63E-44
5	VdtD	g6252.tl	29.36	453	2.54E-44
6	VdtD	g12073.tl	29.146	398	1.98E-40
7	VdtD	g8173.tl	28.539	438	1.45E-37
8	VdtD	g7551.tl	28.306	484	2.00E-36
9	VdtD	g7634.tl	37.917	240	9.42E-36
10	VdtD	g7704.tl	31.832	333	1.85E-35
11	VdtD	g10974.tl	26.744	516	9.08E-35
12	VdtD	g2.tl	30.719	306	2.33E-33
13	VdtD	g6787.tl	26.683	416	5.77E-33
14	VdtD	g5902.tl	28.389	391	1.46E-31
15	VdtD	g12561.tl	27.763	371	1.75E-31
16	VdtD	g11847.tl	28.794	514	2.77E-31

STT	query_id	subject_id	percent_identity	alignment_length	evalue
17	VdtD	g5002.tl	28.169	426	4.99E-30
18	VdtD	g1624.tl	25.595	504	3.24E-29
19	VdtD	g5013.tl	26.6	500	1.29E-28
20	VdtD	g7899.tl	26.265	514	6.07E-28
21	VdtD	g9547.tl	27.254	477	7.11E-28
22	VdtD	g80.tl	27.013	385	2.01E-27
23	VdtD	g5647.tl	25.852	499	1.76E-26
24	VdtD	g7625.tl	28.247	308	1.79E-26
25	VdtD	g1686.tl	31.541	279	3.43E-26
26	VdtD	g464.tl	27.434	339	2.95E-25
27	VdtD	g11636.tl	28.571	245	1.26E-24
28	VdtD	g4987.tl	26.602	515	2.65E-24
29	VdtD	g7072.tl	24.324	407	3.00E-24
30	VdtD	g11966.tl	28	350	3.12E-24
31	VdtD	g556.tl	27.92	351	5.47E-24
32	VdtD	g6134.tl	24.59	488	7.67E-24
33	VdtD	g9288.tl	25.357	560	8.58E-24
34	VdtD	g5090.tl	26.945	527	4.14E-23
35	VdtD	g3181.tl	29.392	296	6.35E-23
36	VdtD	g11400.tl	27.363	402	2.78E-22
37	VdtD	g1725.tl	28.716	296	3.00E-22
38	VdtD	g2995.tl	29.934	304	5.78E-22
39	VdtD	g10846.tl	29.226	349	2.09E-21
40	VdtD	g6099.tl	22.88	507	2.63E-21
41	VdtD	g7473.tl	28.255	361	1.50E-20
42	VdtD	g3274.tl	28.571	287	5.62E-20
43	VdtD	g10809.tl	24.832	447	1.02E-19
44	VdtD	g9003.tl	25.427	468	1.24E-18
45	VdtD	g11030.tl	24.897	486	1.45E-18
46	VdtD	g9794.tl	30.693	202	2.67E-18
47	VdtD	g9796.tl	25.769	260	4.91E-16
48	VdtD	g5539.tl	21.655	411	3.71E-13
49	VdtD	g8.tl	23.077	234	1.35E-07

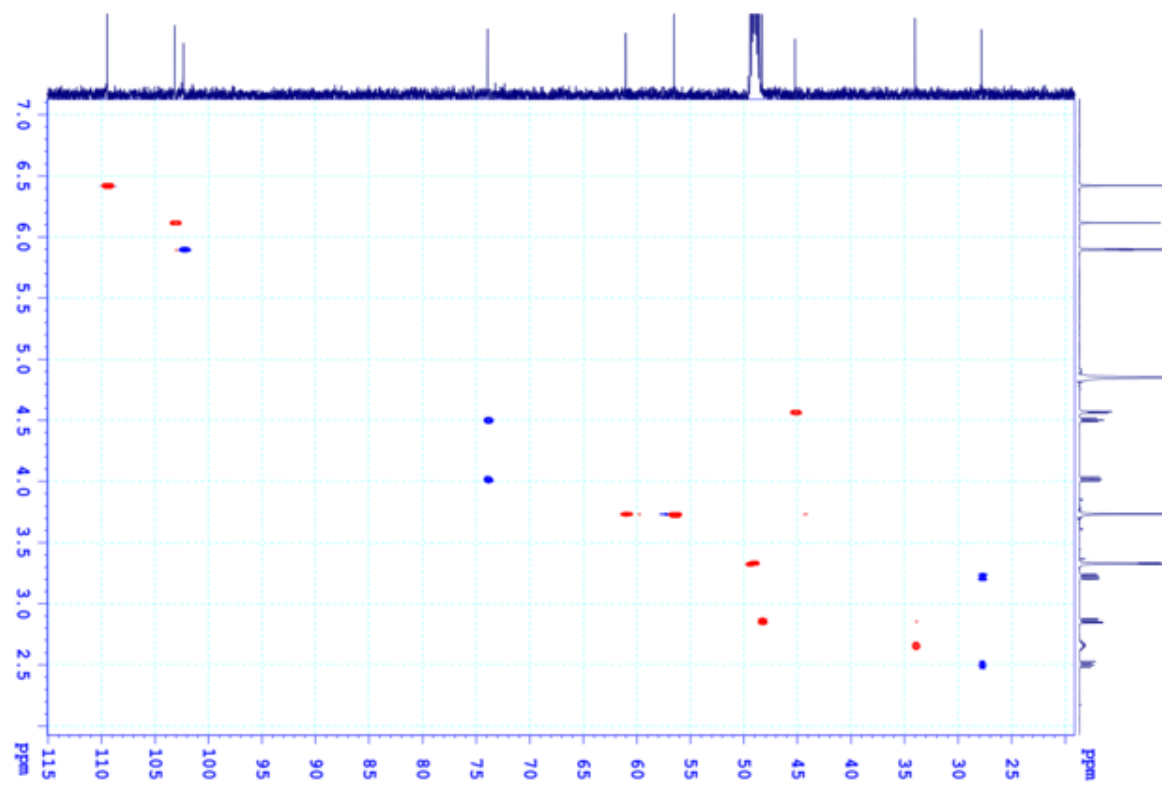
PHỤ LỤC I

Hình 1I. Phổ ^1H NMR của hợp chất VN12C.03

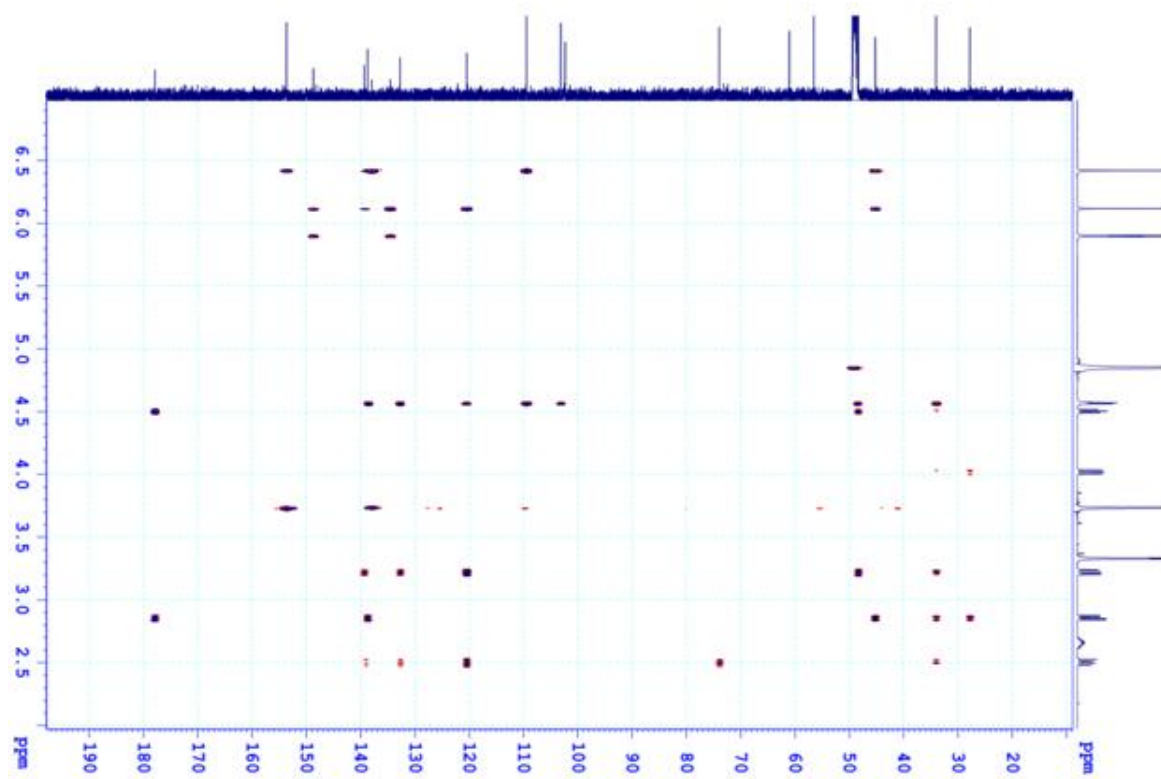
¹H NMR spectrum (400 MHz, CDCl₃) of compound 10. The spectrum shows peaks in the aromatic region (6.4-6.5 ppm) and aliphatic region (2.5-5.0 ppm). Integration values are provided below the baseline.

Chemical Shift (ppm)	Integration
6.421	2.04
6.117	1.00
5.903	2.05
5.901	
5.898	
5.896	
4.849	
4.571	
4.563	
4.516	
4.503	
4.490	
4.035	
4.021	
4.017	
4.003	
3.733	
3.335	1.12
3.333	1.07
3.330	1.04
3.327	9.08
3.325	
3.240	
3.231	1.09
3.213	1.04
3.204	1.07
2.875	1.04
2.867	1.06
2.852	
2.844	
2.680	
2.671	
2.668	
2.662	
2.658	
2.653	
2.649	
2.645	
2.640	
2.639	

Hình 4I. Phổ ^1H NMR của hợp chất VN12C.06



Hình 5I. Phổ HSQC của hợp chất VN12C.06



Hình 6I. Phổ HMBC của hợp chất VN12C.06