

**ISOLATION AND SELECTION OF ENDOPHYTIC FUNGI IN  
*Cleistocalyx operculatus* WITH IN VITRO ANTIOXIDANT CAPACITY**

Phan Ngọc Thùy Ngân<sup>1,2</sup>, Trần Chí Linh<sup>3</sup>, Trương Thị Phương Thảo<sup>1</sup>, Ngô Huỳnh Thúy Duy<sup>2</sup>, Nguyễn Cẩm Duyên<sup>2</sup>, Đại Thị Xuân Trang<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Can Tho University, <sup>2</sup>Cuu Long University, <sup>3</sup>Nam Can Tho University

| ARTICLE INFO                                                                                    | ABSTRACT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Received: 01/9/2024</b><br><b>Revised: 06/02/2025</b><br><b>Published: 07/02/2025</b>        | The study was conducted to select endophytic fungal strains in <i>Cleistocalyx operculatus</i> that have <i>in vitro</i> antioxidant capacity. The study isolated and preliminary identified the morphological characteristics of 31 strains of endophytic fungi in <i>Cleistocalyx operculatus</i> . The <i>in vitro</i> antioxidant activity of endophytic fungal strains in <i>Cleistocalyx operculatus</i> was determined using the method of reducing power and neutralizing free radicals 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, and 2,2-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid). In addition, the study also determined the content of polyphenols and flavonoids produced by endophytic fungal strains in <i>Cleistocalyx operculatus</i> based on Folin-Ciocalteu and alumi chloride reagents. Endophytic fungal strains in <i>Cleistocalyx operculatus</i> were capable of producing antioxidants with concentrations ranging from 0,92±0,33 to 91,70±4,99 mg TE/100 mL of supernatant. Endophytic fungal strains in <i>Cleistocalyx operculatus</i> were capable of producing polyphenols with concentrations ranging from 1,82±0,27 to 26,54±1,37 mg GAE/100mL of supernatant and flavonoids with concentrations ranging from 1,74±0,07 to 22,33±1,20 mg QE/100mL of supernatant. Research results show that the <i>in vitro</i> antioxidant activity of endophytic fungal strains in <i>Cleistocalyx operculatus</i> depends on polyphenol and flavonoid content. Endophytic fungal strains in <i>Cleistocalyx operculatus</i> show the potential to produce antioxidant secondary metabolites. |
| <b>KEYWORDS</b>                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| <i>Cleistocalyx operculatus</i><br>Flavonoids<br>Antioxidant<br>Polyphenols<br>Endophytic Fungi |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |

**PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI NẤM NỘI SINH CÂY VỎI  
(*Cleistocalyx operculatus*) CÓ KHẢ NĂNG CHỐNG OXY HÓA TRONG ống NGHIỆM**

Phan Ngọc Thùy Ngân<sup>1,2</sup>, Trần Chí Linh<sup>3</sup>, Trương Thị Phương Thảo<sup>1</sup>, Ngô Huỳnh Thúy Duy<sup>2</sup>, Nguyễn Cẩm Duyên<sup>2</sup>, Đại Thị Xuân Trang<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Cần Thơ, <sup>2</sup>Trường Đại học Cửu Long, <sup>3</sup>Trường Đại học Nam Cần Thơ

| THÔNG TIN BÀI BÁO                                                                                     | TÓM TẮT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Ngày nhận bài: 01/9/2024</b><br><b>Ngày hoàn thiện: 06/02/2025</b><br><b>Ngày đăng: 07/02/2025</b> | Nghiên cứu được thực hiện nhằm tuyển chọn các dòng vi nấm nội sinh trong cây vỏi có khả năng kháng oxy hoá <i>in vitro</i> . Nghiên cứu đã phân lập và nhận diện sơ bộ các đặc điểm hình thái của 67 dòng vi nấm nội sinh trong cây Vỏi. Hoạt tính chống oxy hóa <i>in vitro</i> của các dòng vi nấm nội sinh được xác định nhờ vào phương pháp năng lực khử, trung hòa gốc tự do 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl và 2,2-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid). Bên cạnh đó, nghiên cứu cũng đã xác định hàm lượng polyphenol, flavonoid do các dòng vi nấm nội sinh tạo ra dựa vào thuốc thử Folin-Ciocalteu và alumi clorua. Các dòng vi nấm nội sinh có khả năng sản sinh chất chống oxy hóa với hàm lượng dao động từ 0,92 ± 0,33 đến 91,70 ± 4,99 mg TE/100 mL dịch nuôi cấy. Các dòng vi nấm nội sinh trong cây vỏi có khả năng sản sinh polyphenol với hàm lượng dao động từ 1,82 ± 0,27 đến 26,54 ± 1,37 mg GAE/100mL dịch nuôi cấy và flavonoid với hàm lượng dao động từ 1,74 ± 0,07 đến 22,33 ± 1,20 mg QE/100mL dịch nuôi cấy. Kết quả nghiên cứu cho thấy hoạt tính chống oxy hóa <i>in vitro</i> của các dòng vi nấm nội sinh phụ thuộc vào hàm lượng polyphenol và flavonoid. Các dòng vi nấm nội sinh trong cây vỏi cho thấy tiềm năng sản sinh các hợp chất chuyển hóa thứ cấp có khả năng chống oxy hóa. |
| <b>TỪ KHÓA</b>                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Cây vỏi<br>Flavonoid<br>Chống oxy hóa<br>Polyphenol<br>Vi nấm nội sinh                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.11044>

\* Corresponding author. Email: dtxtrang@ctu.edu.vn

## 1. Giới thiệu

Vi nấm nội sinh (VNNS) là nhóm vi sinh vật cư trú bên trong tế bào hoặc mô khỏe mạnh của thực vật, có thể ở dạng cộng sinh, không gây ảnh hưởng đến sức sống của cây chủ [1]. Đã có nhiều chứng minh cho thấy VNNS tồn tại đa dạng bên trong các bộ phận của cây chủ. Nhờ mối quan hệ cộng sinh với VNNS, cây chủ có thể chống lại điều kiện sống bất lợi bằng cách sản xuất một số chất chuyển hóa chuyên biệt có đặc tính kháng nấm, kháng khuẩn; hoặc sản xuất một số độc tố, giúp bảo vệ cây chủ chống lại các mầm bệnh. VNNS sản xuất phytohormone giúp cây chủ tăng cường khả năng chịu hạn bằng cách tăng cường sản xuất enzyme chống oxy hóa [2], [3]. Ngoài khả năng giúp cây chủ phát triển tốt, VNNS còn có khả năng tạo ra những sản phẩm sinh học có ý nghĩa trong lĩnh vực y học. Chất chống oxy hóa được tạo bởi cây chủ và cả VNNS giúp thực vật có thể tồn tại trong những tình huống bất lợi như stress sinh học và phi sinh học [4]. Do đó việc bổ sung chất chống oxy hóa từ các nguồn tự nhiên đang được phát triển vì tính an toàn và có giá trị trị liệu.

Các nghiên cứu về VNNS trong và ngoài nước đa số được phân lập trên cây dược liệu nhằm tìm kiếm các hoạt chất có tính kháng khuẩn, kháng nấm và chống oxy hóa. Tại Việt Nam, trên một số cây dược liệu như cây Dừa cạn (*Catharanthus roseus*) và Bạch hoa xà thiệt thảo (*Scutellaria barbata*) đã phân lập được 5 chủng nấm nội sinh; từ cây Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serata*) đã phân lập được 45 dòng VNNS, và từ một số VNNS trong họ *Zingiberaceae* và *Rutaceae*. Đa số các dòng VNNS được nghiên cứu tập trung vào khả năng kháng những dòng vi khuẩn phổ biến như *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, kháng nấm *Candida albicans* bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Khả năng chống oxy hóa của 4 dòng VNNS phân lập từ cây Trang (*Kandelia candel*) được kiểm tra bằng phương pháp khảo sát năng lực khử và khảo sát hoạt tính ức chế quá trình peroxide hóa lipid [6] - [8]. Tuy nhiên ở Việt Nam, về mặt hàm lượng hợp chất polyphenol và flavonoid từ VNNS vẫn chưa có nhiều nghiên cứu. Trong số khoảng 300.000 loài thực vật bậc cao tồn tại trên trái đất, mỗi loài đều là vật chủ của một hoặc nhiều vi sinh vật nội sinh, nhưng chỉ một số ít trong số đó được nghiên cứu đầy đủ [9]. Cây Vối (*Cleistocalyx operculatus*) thuộc họ Sim (Myrtaceae), là cây thân gỗ cao nhỡ, thường thấy mọc dại hoặc được trồng ở Việt Nam, Lào, Thái Lan và Trung Quốc, được xem là cây dược liệu dân gian, và cũng đã có nhiều nghiên cứu chứng minh về hoạt tính chống oxy hóa và xác định nồng độ polyphenol trong các bộ phận của cây [10], [11]. Vối là nguồn cây chủ thích hợp để nghiên cứu về VNNS, nhưng đến nay vẫn chưa tìm thấy các nghiên cứu về VNNS trong các bộ phận của cây Vối trồng tại Việt Nam. Do đó, nghiên cứu này phân lập và tuyển chọn vi nấm nội sinh trong cây Vối (*cleistocalyx operculatus*) có khả năng chống oxy hóa, nhằm mục đích góp phần tìm kiếm và gia tăng nguồn VNNS có lợi.

## 2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Vật liệu

Cây Vối (*Cleistocalyx operculatus*) được thu thập vào tháng 5 năm 2023 tại Tiền Giang (Hình 1). Cây Vối đã được nhận diện dựa vào đặc điểm hình thái theo mô tả trong bộ sách cây cỏ Việt Nam [12].

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Phân lập và nuôi cấy *in vitro* VNNS trong cây Vối

Mẫu cây Vối sau khi thu thập được vận chuyển về phòng thí nghiệm, phân loại, chọn lọc mẫu lá, thân, hoa sạch bệnh và rửa sạch dưới vòi nước, sau đó tiến hành khử trùng bề mặt theo Sahu và cộng sự [13]. Mẫu lá, thân, chồi, nụ của cây Vối được cắt thành từng mảnh nhỏ bằng dụng cụ vô trùng. Đặt mẫu lên môi trường PDA xuất xứ Ấn Độ (200 g bột khoai tây/L, 20 g dextrose/L, 20 g agar/L) có bổ sung kháng sinh streptomycin nồng độ 100 mg/L [14] đã được khử trùng, ủ ở điều kiện nhiệt độ phòng hoặc nhiệt độ 30°C, trong 7 ngày, sau đó tiến hành quan sát sự phát

triển của nấm. Nấm mới phát triển từ mẫu được chuyển sang môi trường PDA mới. Các dòng vi nấm được phân lập dựa vào sự khác biệt đặc trưng về hình thái, màu sắc và đặc điểm bề mặt, hoa văn, sắc tố và bìa của khuẩn lạc vi nấm trên mặt thạch [17]. Quan sát sự phát triển của sợi nấm, bào tử của vi nấm bằng kính hiển vi ở độ phóng đại 40X và 100X (Nikon YS100, Nikon, Japan).



**Hình 1.** Cây Vôi, nụ và nhánh cây Vôi



**Hình 2.** Vị trí thu mẫu cây Vôi tại xã Hòa Hưng, huyện Cái Bè, Tiền Giang

Các dòng VNNS sau khi phân lập được nuôi tăng sinh trong môi trường khoai tây dextrose lỏng (PDB) theo mô tả của Huang và cộng sự [16] có bổ sung streptomycin nồng độ 100 mg/L. Dòng vi nấm thuần chủng được đặt vào bình erlenmeyer có chứa 100 mL PDB, lắc 150 vòng/phút, 7 ngày ở  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ . Sau đó, môi trường tăng sinh của từng loại VNNS được lọc qua giấy lọc, loại bỏ sợi nấm, để thu lấy phần dịch nuôi cấy. Phần dịch nuôi cấy của các dòng VNNS được đựng trong bình thủy tinh, bảo quản ở  $4^\circ\text{C}$ .

#### 2.2.2. Tuyển chọn các dòng VNNS có khả năng sản sinh polyphenol và flavonoid

Phần dịch nuôi cấy chiết xuất từ các dòng VNNS được tiến hành xác định hàm lượng polyphenol bằng phương pháp Folin-Ciocalteu theo mô tả Huang và cộng sự [16], có hiệu chỉnh. Phần dịch nuôi cấy 0,25 mL được thêm 0,25 mL thuốc thử Folin-Ciocalteu 0,5 N cho phản ứng xảy ra ở nhiệt độ phòng, lắc đều, tiếp tục phản ứng được trung hòa bằng thêm 0,25 mL  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  10%, ủ 30 phút ở  $40^\circ\text{C}$  trong bể điều nhiệt. Kết thúc phản ứng được đo độ hấp thụ quang phổ ở

bước sóng 756 nm. Hàm lượng polyphenol có trong dịch nuôi cấy của các dòng VNNS được xác định dựa trên phương trình đường chuẩn gallic axit (mg GAE/100 mL dịch nuôi cấy) có dạng:  $y = 0,0152x + 0,1357$  ( $R^2 = 0,9961$ ).

Phần dịch nuôi cấy chiết xuất từ các dòng VNNS được tiến hành xác định hàm lượng flavonoid với thuốc thử alumi clorua theo mô tả Praptiwi và cộng sự [19] có hiệu chỉnh. Hỗn hợp phản ứng gồm 1 mL nước cất, 1 mL dịch nuôi cấy, 0,2 mL  $\text{NaNO}_2$  5%, ủ hỗn hợp trong 5 phút, ở nhiệt độ phòng. Sau khi ủ, hỗn hợp được thêm 0,2 mL  $\text{AlCl}_3$  10%, lắc đều hỗn hợp, ủ trong 6 phút, thêm 2 mL  $\text{NaOH}$  1N, nước cất 0,6 mL và tiếp tục ủ trong 15 phút ở nhiệt độ phòng. Kết thúc phản ứng tiến hành đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 510 nm. Hàm lượng flavonoid có trong dịch nuôi cấy của các dòng VNNS được xác định dựa trên phương trình đường chuẩn quercetin (mg QE/100 mL dịch nuôi cấy) có dạng  $y = 0,0009x + 0,0462$  ( $R^2 = 0,9846$ ).

### 2.2.3. Tuyển chọn các dòng VNNS có hoạt tính chống oxy hóa in vitro

#### *Khảo sát khả năng trung hòa gốc tự do 2, 2-diphenyl- 1 - picrylhydrazyl*

Khả năng trung hòa gốc tự do DPPH được xác định dựa theo mô tả của Sharma và cộng sự [20] có hiệu chỉnh. Hỗn hợp phản ứng gồm 0,96 mL phần dịch nuôi cấy của VNNS và 0,04 mL DPPH (1000  $\mu\text{g/mL}$ , hòa tan trong methanol), sau đó phản ứng được diễn ra trong điều kiện tối ở  $30^\circ\text{C}$  trong 30 phút. Màu tím của DPPH bị thay đổi khi phản ứng với chất có khả năng chống oxy hóa, bước sóng 517 nm được sử dụng để xác định sự thay đổi màu sắc của DPPH còn lại sau phản ứng. Hàm lượng chất có năng lực khử trong dịch nuôi cấy của các dòng VNNS được xác định dựa trên phương trình đường chuẩn trolox (mg TE/100 mL dịch nuôi cấy) có dạng:  $y = -0,1158x + 1,3068$  ( $R^2 = 0,99$ ).

#### *Khảo sát năng lực khử*

Năng lực khử được đánh giá theo mô tả của Oyaizu [21] có hiệu chỉnh. Hỗn hợp phản ứng lần lượt gồm 0,1 mL phần dịch nuôi cấy của VNNS, 0,1 mL đệm phosphate (0,2 M, pH 6,6) và 0,1 mL  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  1%. Sau khi hỗn hợp phản ứng được ủ ở  $50^\circ\text{C}$  trong 20 phút, thêm 0,1 mL  $\text{CCl}_3\text{COOH}$  10%, ly tâm hỗn hợp với tốc độ 3000 vòng/ phút trong 10 phút. Phần dịch nuôi cấy sau khi ly tâm được rút 0,1 mL cho vào 0,1 mL nước và 0,1 mL  $\text{FeCl}_3$  0,1%, lắc đều. Độ hấp thụ quang phổ của hỗn hợp phản ứng được đo ở bước sóng 700 nm. Hàm lượng chất có năng lực khử trong dịch nuôi cấy của các dòng VNNS được xác định dựa trên phương trình đường chuẩn trolox (mg TE/100 mL dịch nuôi cấy) có dạng:  $y = 0,0927x + 0,0188$  ( $R^2 = 0,9976$ ).

#### *Khảo sát khả năng trung hòa gốc tự do 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic axit)*

Khả năng trung hòa gốc tự do ABST<sup>++</sup> được thực hiện theo mô tả của Nenadis và cộng sự [22] có hiệu chỉnh. Phản ứng được bắt đầu bằng cách cho 0,99 mL dung dịch nuôi cấy ABST<sup>++</sup> (500  $\mu\text{g/mL}$ ) phản ứng với 0,01 mL phần dịch nuôi cấy của VNNS. Sau đó, hỗn hợp được cho phản ứng trong điều kiện tránh ánh sáng 6 phút ở  $30^\circ\text{C}$ . Độ hấp thụ quang phổ của hỗn hợp phản ứng được xác định ở bước sóng 734 nm. Hàm lượng chất có năng lực khử trong dịch nuôi cấy của các dòng VNNS được xác định dựa trên phương trình đường chuẩn trolox (mg TE/100 mL dịch nuôi cấy) có dạng:  $y = -0,0751x + 0,8482$  ( $R^2 = 0,9973$ ).

### 2.2.4. Định danh một số dòng VNNS trong cây Vối

Các dòng VNNS có khả năng sản sinh polyphenol, flavonoid và chất chống oxy hóa tiềm năng được lựa chọn để định danh. DNA tổng số của VNNS được tách bằng cách sử dụng TE 1x theo quy trình của Roger [23]. Vùng gen *ITS-rDNA* của các dòng VNNS được khuếch đại bằng phản ứng PCR, sử dụng các đoạn mồi xuôi có trình tự gen là *ITS1* (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') và mồi ngược *ITS4* (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') để khuếch đại kích thước dự kiến ~600 (bp) [19]. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 2% và giải trình tự. Trình tự vùng ITS của các dòng VNNS được so sánh với các trình tự đã công bố trên GenBank thông qua BLAST. Cây phát sinh chủng loài của các dòng VNNS dựa vào trình

tự vùng ITS được xây dựng bằng phần mềm Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11.0.13 (MEGA 11.0.13).

### 2.2.5. Thống kê phân tích số liệu

Các số liệu trong nghiên cứu được trình bày dưới dạng MEAN $\pm$ SD. Kết quả được xử lý thống kê theo phương pháp ANOVA (kiểm định Tukey's) bằng phần mềm Minitab 16.0.

## 3. Kết quả và bàn luận

### 3.1. Kết quả phân lập và nuôi cấy *in vitro* vi nấm nội sinh trong cây Vối

Dựa trên sự khác biệt về hình dạng bề mặt, màu sắc của khuẩn lạc cùng sự khác biệt về hình dạng bào tử, cấu trúc sợi nấm, đã thu được 67 dòng VNNS từ các bộ phận thân, chồi, lá và nụ hoa của cây Vối. Trong đó, từ chồi phân lập được 20/67 dòng VNNS chiếm tỉ lệ 29,85%, từ lá phân lập được 28/67 chiếm tỉ lệ 41,79%, từ hoa phân lập được 9/67 chiếm tỉ lệ 13,43% và từ thân phân lập được 10/67 chiếm tỉ lệ 14,92%. Như vậy, kết quả cho thấy số lượng các dòng VNNS được phân lập từ lá hơn nhiều so với số lượng các dòng VNNS được phân lập từ chồi, hoa và thân cây Vối. Quan sát hình dạng khuẩn lạc trên bề mặt agar của các chủng nấm sau 4-7 ngày nuôi cấy và tiến hành quan sát màu sắc, hình dạng, đặc điểm sơ bộ của khuẩn lạc nấm bằng mắt thường. Nhóm nghiên cứu nhận thấy, các dòng VNNS trong cây Vối chủ yếu có màu xanh và trắng, hình tròn, bề mặt dạng hạt mịn và có bào tử hình tròn (Bảng 1). Các dòng VNNS được ký hiệu là Co.B.x, Co.L.x, Co.T.x, Co.F.x. Trong đó, Co là *Cleistocalyx operculatus*, B là chồi non, L là lá, T là thân, F là hoa, x là số thứ tự phân lập. VNNS hiện diện trên mọi loài thực vật, và sự đa dạng của chúng phụ thuộc vào nhiều yếu tố cả phi sinh học và sinh học. Trong số đó, điều kiện môi trường sống của thực vật là một trong những yếu tố quan trọng [24]. Các vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới tạo điều kiện cho VNNS đa dạng hơn môi trường ôn đới. Đáng chú ý, một chiếc lá riêng lẻ ở vùng nhiệt đới có thể phân lập được 90 loài nội sinh vật [18]. Điều kiện tự nhiên trong môi trường sống đã tạo nên sự đa dạng VNNS sống trong cây Vối *Cleistocalyx operculatus*.

**Bảng 1.** Thống kê đặc điểm hình thái khuẩn lạc, sợi nấm và bào tử của các dòng VNNS

| Chỉ tiêu     | Mô tả                    | Số lượng | Tỷ lệ (%) |
|--------------|--------------------------|----------|-----------|
| Hình dạng    | Tròn                     | 53       | 79,10     |
|              | Xẻ thùy                  | 7        | 10,45     |
|              | Không ổn định            | 7        | 10,45     |
| Đường kính   | <10 mm                   | 4        | 5,97      |
|              | 10-30 mm                 | 47       | 70,15     |
|              | >30 mm                   | 16       | 23,88     |
| Màu sắc      | Trắng                    | 18       | 26,87     |
|              | Xanh                     | 20       | 29,85     |
|              | Xám                      | 6        | 8,96      |
|              | Đen                      | 8        | 11,94     |
|              | Nâu, vàng, cam           | 15       | 22,39     |
| Bề mặt       | Hạt mịn                  | 37       | 55,22     |
|              | Tơ bông                  | 21       | 31,34     |
|              | Tơ nhung                 | 9        | 13,43     |
| Sợi khuẩn ty | Phân nhánh, có vách ngăn | 67       | 100,00    |
| Bào tử       | Hình tròn                | 46       | 68,66     |
|              | Hình trứng               | 15       | 22,39     |
|              | Hình trụ                 | 6        | 8,96      |

### 3.2. Kết quả tuyển chọn các dòng VNNS có khả năng sản sinh polyphenol và flavonoid

Polyphenol và flavonoid là những nhóm chất có hoạt tính sinh học có thể được chiết xuất từ nấm nội sinh. Các hợp chất thuộc nhóm polyphenol và flavonoid như: kaempferol, caffeic axit,

para-hydroxybenzoic axit, para-coumaric axit, vanillic axit, syringic axit, gallic axit, chlorogen axit, ferulic axit và rosmarinic axit đã được phân lập từ nhiều dòng VNNS khác nhau [15], [17]. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy có 32/67 dòng VNNS trong cây Vối có khả năng sản sinh polyphenol và flavonoid. Hàm lượng polyphenol của 32 dòng VNNS trong cây vối dao động từ  $1,82 \pm 0,27$  đến  $26,54 \pm 1,37$  mg GAE/100 mL dịch nuôi cấy và flavonoid với hàm lượng dao động từ  $1,74 \pm 0,07$  đến  $22,33 \pm 1,20$  mg QE/100 mL dịch nuôi cấy, tương đồng với kết quả nghiên cứu của Huang và cộng sự [16] về hàm lượng polyphenol trên các dòng VNNS từ 0,52 đến 13,95 mg GAE/100 mL dịch nuôi cấy. Kết quả hàm lượng polyphenol và flavonoid của 32 dòng VNNS trong cây vối được trình bày trong Bảng 2. Dòng vi nấm Co.B.18, Co.L.6, Co.F.9 có lượng polyphenol tổng số cao nhất (lần lượt là  $26,54 \pm 1,37$ ;  $19,08 \pm 1,32$ ;  $17,98 \pm 1,01$  mg GAE/100 mL dịch nuôi cấy). Kết quả định lượng flavonoid cũng chỉ ra rằng dòng vi nấm Co.B.18, Co.L.6, Co.F.9 có khả năng sản sinh flavonoid tổng số cao nhất, lần lượt là với  $22,33 \pm 1,20$ ;  $22,26 \pm 0,74$ ;  $19,26 \pm 1,28$  mg QE/100 mL dịch nuôi cấy. Hàm lượng polyphenol và flavonoid không được tìm thấy ở 35/67 dòng vi nấm gồm có dòng Co.B.2; Co.B.6; Co.B.10; Co.B.14; Co.L.1; Co.L.2; Co.L.4; Co.L.5; Co.L.7; Co.L.12-14; Co.L.16; Co.L.19; Co.L.22-28; Co.T.1; Co.T.2; Co.T.4-6; Co.T.8; Co.T.10; CoF1; CoF3-8.

### 3.3. Kết quả tuyển chọn các dòng VNNS có hoạt tính chống oxy hóa in vitro

Các gốc tự do là các hợp chất có các electron đơn lẻ phản ứng nhạy cảm với lipoprotein, lipid, carbohydrate, nucleic axit, protein và amin axit tự do. Các hợp chất chuyển hóa thứ cấp có nguồn gốc từ VNNS trong nghiên cứu của chúng tôi được chứng minh có khả năng trung hòa hoặc khử các gốc tự do/ phức kim loại độc. Hoạt tính chống oxy hóa của các dòng vi nấm nội sinh được xác định dựa vào hàm lượng chất chống oxy hóa được trình bày trong Bảng 2. Trong nghiên cứu của chúng tôi, phương pháp DPPH, ABTS<sup>•+</sup> và RP đã được sử dụng để đánh giá hoạt tính chống oxy hóa của các dòng VNNS, vì đây là những phương pháp phổ biến được sử dụng trong sàng lọc thuốc chống oxy hóa mới.

DPPH là một gốc tự do, có khả năng hình thành liên kết với các phân tử hydro của chất chống oxy hóa. Do đó, DPPH thường được sử dụng trong nghiên cứu sàng lọc tác nhân chống oxy hóa mới. Kết quả trình bày trong Bảng 2 cho thấy, phần dịch nuôi cấy của dòng vi nấm Co.B.18, Co.L.6, Co.F.9 có hàm lượng chất trung hòa gốc tự do DPPH nhiều nhất. Dòng vi nấm Co.B.18, Co.L.6, Co.F.9 có hàm lượng chất trung hòa gốc tự do DPPH lần lượt cao gấp 20,46; 19,84 và 17,9 lần so với dòng vi nấm Co.B.16 (là dòng vi nấm có hàm lượng chất trung hòa gốc tự do DPPH thấp nhất).

Phương pháp trung hòa gốc tự do ABTS<sup>•+</sup> tuy có cùng cơ chế hoạt động với phương pháp DPPH. Tuy nhiên, ABTS có bản chất không phải là gốc tự do sau khi bị khử bởi chất chống oxy hóa thành ( $K_2S_2O_8$ ) thì mới tạo thành ABTS<sup>•+</sup> có màu xanh dương. Nếu bị khử bởi chất có hoạt tính chống oxy hóa, ABTS<sup>•+</sup> sẽ chuyển về trạng thái ban đầu là ABTS không màu. Trong nghiên cứu của chúng tôi, phần dịch nuôi cấy của các dòng VNNS khả năng sản sinh chất có khả năng trung hòa gốc tự do ABTS<sup>•+</sup> với hàm lượng dao động từ  $0,98 \pm 0,23$  đến  $23,63 \pm 0,25$  mg TE/100 mL dịch nuôi cấy.

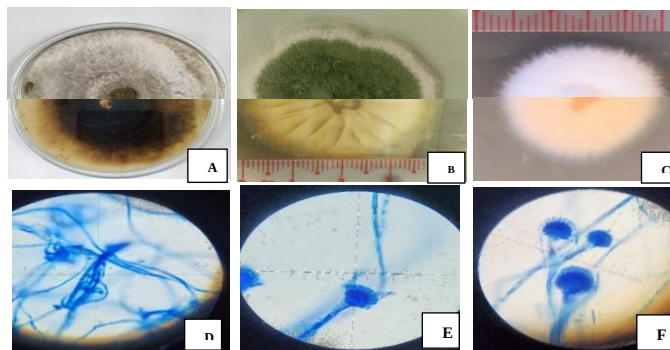
Phương pháp năng lực khử dựa trên nguyên tắc các chất có khả năng khử phản ứng với kali ferricyanide ( $Fe^{3+}$ ) tạo thành kali ferrocyanide ( $Fe^{2+}$ ), sau đó phản ứng với  $FeCl_3$  để tạo thành phức hợp  $Fe^{2+}$  có màu xanh lá. Năng lực khử của các dòng VNNS được xác định dựa vào hàm lượng chất có năng lực được trình bày trong Bảng 2. Kết quả nghiên cứu cho thấy, hàm lượng chất có năng lực khử của các dòng VNNS trong cây Vối dao động từ  $3,39 \pm 0,28$  đến  $91,70 \pm 4,99$  mg TE/100 mL dịch nuôi cấy. Dịch nuôi cấy của dòng vi nấm Co.B.18 có hàm lượng chất có năng lực khử cao gấp 27,05 lần so với dòng vi nấm Co.B.16 (đây là dòng VNNS có hàm lượng chất có năng lực khử thấp nhất).



**Bảng 2.** Hàm lượng polyphenol, flavonoid và chất kháng oxy hóa tương đương chất chuẩn

| STT | Dòng vi nấm | Định lượng                                  |                                           | Hàm lượng chất có hoạt tính chống oxy hóa <i>in vitro</i> (mg TE/100 mL dịch nuôi cấy) |                          |                          |
|-----|-------------|---------------------------------------------|-------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|--------------------------|
|     |             | Polyphenol<br>(mg GAE/100 mL dịch nuôi cấy) | Flavonoid<br>(mg QE/100 mL dịch nuôi cấy) | RP                                                                                     | DPPH                     | ABTS <sup>++</sup>       |
| 1   | Co.B.1      | 3,07 <sup>mo</sup> ±0,38                    | 2,70 <sup>qr</sup> ±0,13                  | 8,03 <sup>lp</sup> ±0,51                                                               | 1,12 <sup>kl</sup> ±0,16 | 1,65 <sup>in</sup> ±0,17 |
| 2   | Co.B.3      | 10,40 <sup>ef</sup> ±0,74                   | 12,89 <sup>ef</sup> ±0,70                 | 18,85 <sup>eg</sup> ±1,50                                                              | 6,37 <sup>de</sup> ±0,51 | 2,88 <sup>fg</sup> ±0,53 |
| 3   | Co.B.4      | 5,04 <sup>hk</sup> ±0,38                    | 10,74 <sup>hk</sup> ±0,64                 | 13,24 <sup>hk</sup> ±1,23                                                              | 3,13 <sup>hj</sup> ±0,33 | 2,29 <sup>gi</sup> ±0,84 |
| 4   | Co.B.5      | 3,74 <sup>k</sup> ±0,36                     | 6,85 <sup>mn</sup> ±0,23                  | 6,88 <sup>mp</sup> ±0,34                                                               | 1,21 <sup>kl</sup> ±0,26 | 1,40 <sup>in</sup> ±0,15 |
| 5   | Co.B.7      | 4,08 <sup>in</sup> ±0,48                    | 8,11 <sup>lm</sup> ±0,62                  | 7,09 <sup>mp</sup> ±0,60                                                               | 1,36 <sup>kl</sup> ±0,20 | 1,69 <sup>hn</sup> ±0,18 |
| 6   | Co.B.8      | 5,66 <sup>hi</sup> ±0,35                    | 9,30 <sup>kl</sup> ±0,39                  | 16,19 <sup>fi</sup> ±1,56                                                              | 3,08 <sup>hj</sup> ±2,35 | 2,33 <sup>gi</sup> ±0,33 |
| 7   | Co.B.9      | 3,44 <sup>ln</sup> ±0,27                    | 5,89 <sup>no</sup> ±0,22                  | 8,28 <sup>ko</sup> ±0,60                                                               | 1,22 <sup>kl</sup> ±0,26 | 1,51 <sup>in</sup> ±0,34 |
| 8   | Co.B.11     | 5,75 <sup>h</sup> ±0,42                     | 11,04 <sup>hj</sup> ±1,03                 | 15,69 <sup>fo</sup> ±1,23                                                              | 3,79 <sup>hi</sup> ±0,42 | 2,37 <sup>gi</sup> ±0,27 |
| 9   | Co.B.12     | 4,96 <sup>hl</sup> ±0,33                    | 9,85 <sup>ik</sup> ±0,72                  | 11,73 <sup>im</sup> ±1,34                                                              | 1,86 <sup>jk</sup> ±0,25 | 2,17 <sup>gm</sup> ±0,40 |
| 10  | Co.B.13     | 3,51 <sup>kn</sup> ±0,38                    | 5,18 <sup>op</sup> ±0,46                  | 9,68 <sup>in</sup> ±0,27                                                               | 1,27 <sup>kl</sup> ±0,25 | 1,26 <sup>ln</sup> ±0,34 |
| 11  | Co.B.15     | 9,21 <sup>fg</sup> ±0,66                    | 11,70 <sup>th</sup> ±0,68                 | 19,36 <sup>ef</sup> ±1,12                                                              | 6,01 <sup>ef</sup> ±0,36 | 1,06 <sup>n</sup> ±0,20  |
| 12  | Co.B.16     | 1,82 <sup>o</sup> ±0,27                     | 1,74 <sup>r</sup> ±0,07                   | 3,39 <sup>pq</sup> ±0,28                                                               | 0,92 <sup>kl</sup> ±0,33 | 0,98 <sup>no</sup> ±0,23 |
| 13  | Co.B.17     | 3,88 <sup>kn</sup> ±0,57                    | 9,44 <sup>il</sup> ±0,59                  | 8,28 <sup>kp</sup> ±0,67                                                               | 1,91 <sup>jk</sup> ±0,41 | 2,17 <sup>gm</sup> ±0,38 |
| 14  | Co.B.18     | 26,54 <sup>a</sup> ±1,37                    | 22,33 <sup>a</sup> ±1,20                  | 91,70 <sup>a</sup> ±4,99                                                               | 18,82 <sup>a</sup> ±1,67 | 23,63 <sup>a</sup> ±0,25 |
| 15  | Co.B.19     | 5,61 <sup>hj</sup> ±0,31                    | 10,07 <sup>ik</sup> ±0,13                 | 14,05 <sup>gj</sup> ±4,72                                                              | 2,40 <sup>ik</sup> ±0,62 | 2,22 <sup>gl</sup> ±0,44 |
| 16  | Co.B.20     | 11,29 <sup>f</sup> ±0,83                    | 14,55 <sup>d</sup> ±1,06                  | 25,90 <sup>d</sup> ±2,20                                                               | 7,65 <sup>de</sup> ±0,48 | 4,13 <sup>de</sup> ±0,17 |
| 17  | Co.L.3      | 3,29 <sup>mo</sup> ±0,40                    | 5,67 <sup>no</sup> ±0,40                  | 14,54 <sup>fi</sup> ±1,43                                                              | 1,51 <sup>jl</sup> ±0,28 | 15,93 <sup>b</sup> ±0,75 |
| 18  | Co.L.6      | 19,08 <sup>b</sup> ±1,32                    | 22,26 <sup>a</sup> ±0,74                  | 49,27 <sup>b</sup> ±2,76                                                               | 18,25 <sup>a</sup> ±0,48 | 4,35 <sup>d</sup> ±0,71  |
| 19  | Co.L.8      | 11,71 <sup>c</sup> ±1,05                    | 13,26 <sup>df</sup> ±1,03                 | 23,38 <sup>de</sup> ±2,26                                                              | 6,40 <sup>df</sup> ±0,48 | 1,29 <sup>kn</sup> ±0,44 |
| 20  | Co.L.9      | 8,33 <sup>g</sup> ±0,76                     | 11,18 <sup>gi</sup> ±0,83                 | 18,21 <sup>fh</sup> ±1,98                                                              | 5,55 <sup>fg</sup> ±0,93 | 2,66 <sup>fh</sup> ±0,50 |
| 21  | Co.L.10     | 16,62 <sup>c</sup> ±1,07                    | 14,63 <sup>d</sup> ±1,08                  | 48,63 <sup>b</sup> ±1,98                                                               | 11,07 <sup>c</sup> ±0,85 | 1,40 <sup>in</sup> ±0,38 |
| 22  | Co.L.11     | 3,38 <sup>mo</sup> ±0,41                    | 5,30 <sup>np</sup> ±0,42                  | 11,52 <sup>im</sup> ±0,60                                                              | 1,31 <sup>kl</sup> ±0,50 | 1,35 <sup>in</sup> ±0,31 |
| 23  | Co.L.15     | 2,92 <sup>mo</sup> ±0,34                    | 3,70 <sup>pq</sup> ±0,34                  | 8,46 <sup>ko</sup> ±0,65                                                               | 1,17 <sup>kl</sup> ±0,33 | 3,15 <sup>eg</sup> ±0,41 |
| 24  | Co.L.17     | 16,45 <sup>c</sup> ±1,14                    | 16,52 <sup>c</sup> ±0,89                  | 35,36 <sup>c</sup> ±1,84                                                               | 7,89 <sup>d</sup> ±0,79  | 2,29 <sup>gi</sup> ±0,23 |
| 25  | Co.L.18     | 2,59 <sup>mo</sup> ±0,20                    | 2,44 <sup>qr</sup> ±0,22                  | 5,01 <sup>nq</sup> ±0,66                                                               | 1,12 <sup>kl</sup> ±0,20 | 3,37 <sup>df</sup> ±0,60 |
| 26  | Co.L.20     | 3,51 <sup>kn</sup> ±0,38                    | 4,63 <sup>op</sup> ±0,23                  | 11,55 <sup>im</sup> ±1,00                                                              | 1,86 <sup>jk</sup> ±0,46 | 1,71 <sup>hn</sup> ±0,47 |
| 27  | Co.L.21     | 3,18 <sup>mo</sup> ±0,23                    | 4,63 <sup>op</sup> ±0,23                  | 12,42 <sup>il</sup> ±0,82                                                              | 1,76 <sup>jk</sup> ±0,28 | 1,55 <sup>in</sup> ±0,29 |
| 28  | Co.T.3      | 13,82 <sup>d</sup> ±0,66                    | 14,29 <sup>de</sup> ±0,13                 | 25,18 <sup>d</sup> ±1,29                                                               | 7,61 <sup>de</sup> ±0,58 | 3,62 <sup>df</sup> ±0,20 |
| 29  | Co.T.7      | 6,36 <sup>in</sup> ±0,40                    | 12,67 <sup>fg</sup> ±0,78                 | 18,73 <sup>eg</sup> ±2,73                                                              | 4,24 <sup>gh</sup> ±0,38 | 2,26 <sup>gk</sup> ±0,37 |
| 30  | Co.T.9      | 4,15 <sup>im</sup> ±0,23                    | 9,81 <sup>ik</sup> ±0,74                  | 16,19 <sup>fi</sup> ±2,90                                                              | 2,36 <sup>ik</sup> ±0,45 | 5,46 <sup>c</sup> ±0,45  |
| 31  | Co.F.2      | 2,55 <sup>no</sup> ±0,16                    | 1,85 <sup>r</sup> ±0,07                   | 4,29 <sup>oq</sup> ±0,53                                                               | 1,07 <sup>kl</sup> ±0,19 | 1,24 <sup>mn</sup> ±0,30 |
| 32  | Co.F.9      | 17,98 <sup>bc</sup> ±1,01                   | 19,26 <sup>b</sup> ±1,28                  | 52,51 <sup>b</sup> ±5,37                                                               | 16,47 <sup>b</sup> ±0,77 | 15,73 <sup>b</sup> ±0,18 |

Ghi chú: Các giá trị có mẫu tự (a, b, c, d) theo sau giống nhau trong cùng một phương pháp thì khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ( $p > 0,05$ )



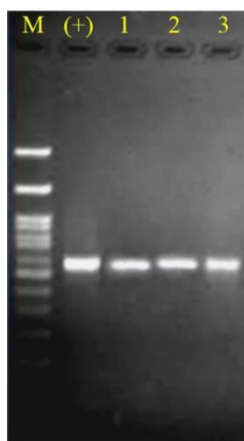
**Hình 3.** Đặc điểm hình thái của 3 dòng VNNS trong cây Vối có kết quả chống oxy hóa cao  
A, D: vi nấm Co.F.9; B, E: vi nấm Co.L.6; C, F: vi nấm Co.B.18

Kết quả nghiên cứu cho thấy, các dòng VNNS trong cây vối có khả năng sản sinh các chất có khả năng chống được nhiều gốc tự do. Trong đó, các dòng VNNS trong cây vối cho thấy hiệu quả trung hòa gốc tự do DPPH hiệu quả hơn các gốc tự do còn lại. Kết quả nghiên cứu của Abo Nahas và cộng sự [21] cho thấy rằng hoạt tính chống oxy hóa của các dòng VNNS có liên quan đến sự hiện diện của các hợp chất chuyển hóa thứ cấp thuộc nhóm polyphenol mà các dòng vi nấm sản sinh ra trong quá trình sinh trưởng. Dựa vào kết quả định lượng polyphenol, flavonoid và chất chống oxy hóa nhóm nghiên cứu đã chọn dòng vi nấm Co.B.18, Co.L.6, Co.F.9 để định danh.

### 3.4. Kết quả định danh một số dòng vi nấm nội sinh trong cây Vối

Các dòng vi nấm nội sinh có hoạt tính nổi trội, được tiến hành ly trích DNA và điện di kiểm tra sản phẩm PCR trình tự vùng ITS (Hình 4). Kết hợp đặc điểm hình thái của 3 dòng VNNS Co.B.18, Co.L.6, Co.F.9 (Hình 2) với kết quả giải trình tự gene *ITS-rDNA* và so sánh dữ liệu với Trung tâm Thông tin Công nghệ sinh học Quốc gia (NCBI) nhận thấy tỷ lệ tương đồng cao với dòng nấm *Aspergillus* sp., *Aspergillus flavus* và *Nigrospora* sp. với tỷ lệ tương đồng lần lượt là 99,66; 100 và 100%. Đồng thời, nhóm nghiên cứu cũng xây dựng cây phát sinh chủng loài cho các dòng nấm *Aspergillus* sp., *Aspergillus flavus* và *Nigrospora oryzae* trình bày trong Hình 3. Nghiên cứu của Yadav và cộng sự [22]; Vig và cộng sự [24] cũng đã chứng minh dòng VNNS thuộc chi *Aspergillus* sp. và chi *Nigrospora* sp. có khả năng sản sinh polyphenol và flavonoid. Nhiều loài *Aspergillus flavus* có thể sản sinh ra độc tố gây nguy hại cho người, và giảm năng suất của các loại cây trồng ngũ cốc. Tuy nhiên, nhiều bằng chứng cũng chỉ ra rằng *Aspergillus flavus* nội sinh có khả năng sản xuất các hợp chất chuyển hóa thứ cấp có hoạt tính sinh học. Ví dụ, *Aspergillus flavus* nội sinh vỏ quả Na (*Annona squamosa*) có tác dụng kháng khuẩn, chống lại các chủng *Staphylococcus* và HCoV 229E—*in vitro* [25]. Ngoài ra, *Aspergillus flavus* nội sinh từ *Aegle marmelos* thể hiện khả năng chống oxy hóa do có hàm lượng polyphenol tổng và flavonoid tổng lần lượt là 65,77 mg GAE/ml và 158,33 mg quercetin/ml dịch nuôi cấy [26].

Các trình tự được thu thập từ kết quả BLAST của 3 dòng vi nấm trong nghiên cứu với cơ sở dữ liệu ITS của nhóm nấm. Tiến hành giống cột (multiple sequence alignment) bằng phần mềm Bioedit phiên bản 7.2.1, chiều dài trình tự sau giống cột là 463 nucleotides. Chương trình MEGA X [27] được sử dụng để xây dựng giản đồ phát sinh loài theo phương pháp Maximum Likelihood với mô hình tiến hóa Kimura 2-parameter [28], độ tin cậy của giản đồ được kiểm định bằng phương pháp bootstrap với 1000 lần lặp lại.



**Hình 4.** Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR trình tự vùng ITS (khoảng 650 bp)

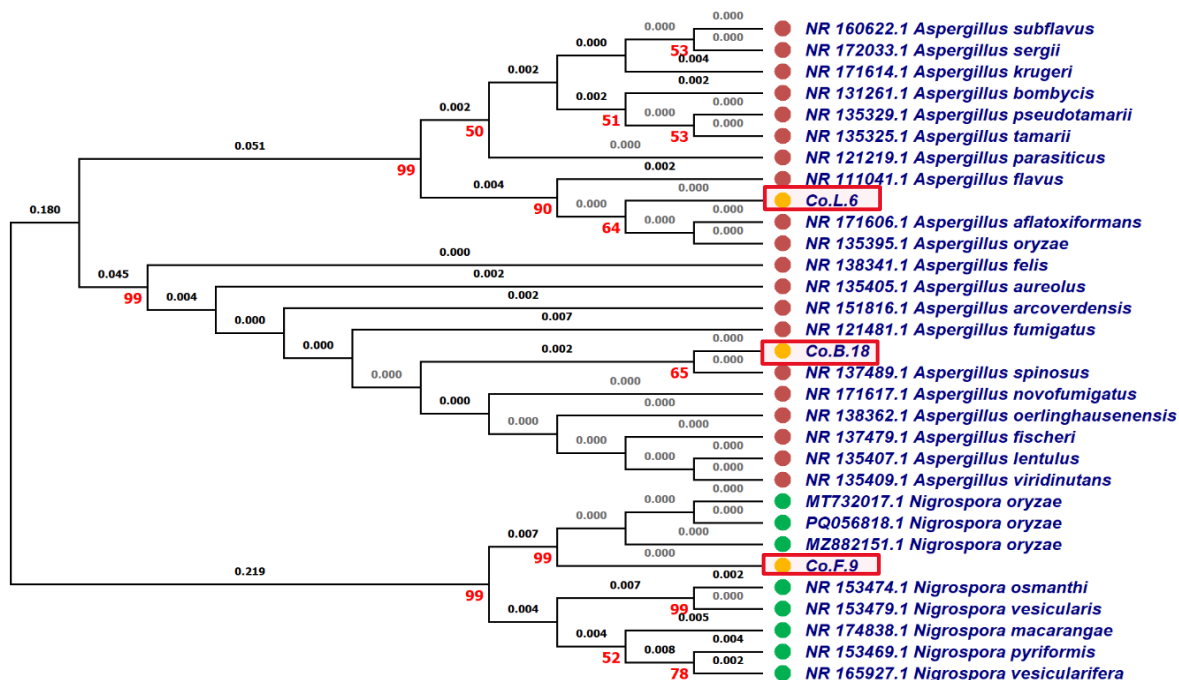
Ghi chú: M: Thang chuẩn 100bp (Bioline, Anh), (+): Đối chứng dương,

1: mẫu Co.B.18; 2: mẫu Co.L.6; 3: mẫu Co.F.9



**Bảng 3.** Kết quả nhận diện các dòng vi nấm nội sinh trong cây Vối

| Dòng    | Loài tương đồng                         | Chiều dài đoạn gene | Độ phủ (%) | Mức độ tương đồng (%) | Accession number |
|---------|-----------------------------------------|---------------------|------------|-----------------------|------------------|
| Co.B.18 | <i>Aspergillus</i> sp.                  | 618                 | 100        | 99,66                 | OM831107.1       |
| Co.L.6  | <i>Aspergillus flavus</i> strain ZMXR27 | 598                 | 100        | 100                   | MT645322.1       |
| Co.F.9  | <i>Nigrospora</i> sp.                   | 557                 | 100        | 100                   | MZ882151.1       |

**Hình 5.** Giản đồ phát sinh loài của các dòng vi nấm dựa trên trình tự ITS

Dựa trên trình tự ITS, mối quan hệ di truyền của 3 dòng vi nấm gồm CoL6, CoB18 và Co.F.9 với các loài trên cơ sở dữ liệu NCBI được thể hiện qua giản đồ phả hệ. Các loài nấm được phân thành 2 nhánh tương ứng với 2 chi *Aspergillus* và *Nigrospora*, với khoảng cách di truyền là 3,99%. Trong nhóm *Aspergillus*, dòng Co.L.6 có quan hệ di truyền gần với *A. oryzae*, *A. aflatoxiformans* và *A. flavus*, độ tin cậy của phân nhóm được thể hiện qua tỷ lệ bootstrap 90%. Bên cạnh đó, dòng Co.B.18 có độ tương đồng di truyền cao với *A. spinosus*, *A. novofumigatus*, *A. oerlinghausenensis*, *A. fischeri*. Ở chi *Nigrospora*, dòng Co.F.9 đồng nhất về mặt di truyền với *N. oryzae* (Hình 5).

#### 4. Kết luận

Trong nghiên cứu này, tổng cộng có 67 VNNS lần đầu tiên được phân lập từ các bộ phận khác nhau của cây Vối: chồi, lá, thân và nụ hoa. Tất cả các chủng đều được xác định sơ bộ bằng hình thái khuẩn lạc và kiểm tra bằng kính hiển vi ở độ 100X. Mô chồi và lá cây Vối đã phân lập được số lượng VNNS nhiều hơn ở mô thân và nụ hoa. Các dòng VNNS được xác định hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng bằng phản ứng màu, đã sàng lọc được 32/67 dòng có tiềm năng sản xuất polyphenol và flavonoid với hàm lượng dao động từ  $1,82 \pm 0,27$  đến  $26,54 \pm 1,37$  mg GAE/100mL dịch nuôi cấy và  $1,74 \pm 0,07$  đến  $22,33 \pm 1,20$  mg QE/100mL dịch nuôi cấy, cao nhất ở dòng Co.B.18; Co.L.10 và Co.F.9. VNNS được xem là nguồn cung cấp hợp chất chống oxy hóa tự nhiên, các dòng VNNS cây Vối được kiểm tra khả năng sản sinh chất chống oxy hóa bằng 3 phương pháp thông dụng là DPPH, ABTS và RP cho thấy hàm lượng chất có hoạt tính chống oxy hóa cao ở ba dòng Co.B.18; Co.L.10 và Co.F.9. Dựa vào kết quả giải trình tự và hình dạng

đại thể vi thể của VNNS đã xác định được 3 loài VNNS trong cây Vôi có khả năng sản sinh ra chất chống oxy hóa tốt nhất là *Aspergillus* sp., *Aspergillus flavus* và *Nigrospora* .sp. Tóm lại nghiên cứu đã cho thấy VNNS trong cây Vôi có tiềm năng trong việc sản xuất các hoạt chất sinh học và do các dòng vi nấm này có thể nuôi cấy nhanh chóng và dễ dàng trong môi trường nhân tạo nên việc sản xuất các hoạt chất sinh học rất có giá trị.

#### Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được hỗ trợ bởi nguồn kinh phí từ Trường Đại học Cửu Long.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] H. Nisa, A. N. Kamili, I. A. Nawchoo, S. Shafi, N. Shameem, and S. A. Bandh, "Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products: A review," *Microbial pathogenesis*, vol. 82, pp. 50-59, 2015.
- [2] J. Javed, M. Rauf, M. Arif, M. Hamayun, H. Gul, A. Ud-Din, and I. J. Lee, "Endophytic fungal consortia enhance basal drought-tolerance in *Moringa oleifera* by upregulating the antioxidant enzyme (APX) through Heat shock factors," *Antioxidants*, vol. 11, no. 9, 2022, Art. no. 1669.
- [3] A. T. Morales-Vargas, V. López-Ramírez, C. Álvarez-Mejía, and J. Vázquez-Martínez, "Endophytic Fungi for Crops Adaptation to Abiotic Stresses," *Microorganisms*, vol. 12, no. 7, 2024, Art. no. 1357.
- [4] J. Jin, Q. Zhao, X. M. Zhang, and W. J. Li, "Research progress on bioactive products from endophytes," *Journal of Microbiology*, vol. 38, pp. 103-113, 2016.
- [5] A. V. Snezhkina, A. V. Kudryavtseva, O. L. Kardymon, M. V. Savvateeva, N. V. Melnikova, G. S. Krasnov, and A. A. Dmitriev, "ROS generation and antioxidant defense systems in normal and malignant cells," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2019, no. 1, 2019, Art. no. 6175804.
- [6] T. M. D. Tran, N. P. Nguyen, H. T. Nguyen, and T. H. Duong, "A study of lipid peroxidation inhibition of endophytic fungi isolated from *Kandelia candel* derived from Can Gio mangrove," *Journal of Science*, vol. 17, no. 12, 2020, Art. no. 2273.
- [7] T. N. M. Võ, V. T. Nguyen, and D. N. Nguyen, "Isolation and screening of the endophytes possessing antioxidant activity from Rutaceae and Zingiberaceae plants," *Science and Technology Development Journal*, vol. 19, no. 3, pp. 57-64, 2016.
- [8] T. T. H. Trinh, T. H. Pham, T. Y. Hoàng, and T. M. T. Le, "Biological activity research of endophytic fungi on *Huperzia javanica* plant with application orientation in the circular economy," *Environment Journal*, vol. 1, pp. 52-57, 2024.
- [9] G. Strobel, B. U. Daisy, and J. Harper, "Natural products from endophytic microorganisms," *J. Nat. Prod.*, vol. 67, pp. 257-268, 2004.
- [10] L. T. Do, *Vietnamese medicinal plants and herbs*. Medical publisher, 2006, p. 423.
- [11] C. Wang, P. Wu, S. Tian, J. Xue, L. Xu, H. Li, and X. Wei, "Bioactive pentacyclic triterpenoids from the leaves of *Cleistocalyx operculatus*," *Journal of Natural Products*, vol. 79, no. 11, pp. 2912-2923, 2016.
- [12] H. H. Pham, *Plants of Vietnam*. Young Publishing House, Ho Chi Minh City, 1999.
- [13] P. K. Sahu, J. Tilgam, S. Mishra, S. Hamid, A. K. J. Gupta, S. K. Verma, and R. N. Kharwar, "Surface sterilization for isolation of endophytes: Ensuring what (not) to grow," *Journal of Basic Microbiology*, vol. 62, no. 6, pp. 647-668, 2022.
- [14] S. K. Soni, R. Singh, N. K. Ngpoore, A. Niranjana, P. Singh, A. Mishra, and S. Tiwari, "Isolation and characterization of endophytic fungi having plant growth promotion traits that biosynthesizes bacosides and withanolides under in vitro conditions," *Brazilian journal of microbiology*, vol. 52, pp. 1791-1805, 2021.
- [15] H. L. Barnett and B. B. Hunter, *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*, 4th Edition, APS Press, (1998), 218.
- [16] W. Huang, Y. Cai, H. Corke, K. D. Hyde, and M. Sun, "Bioactivities and major constituents of metabolites produced by endophytic fungi from *Nerium oleander*," *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 23, no. 9, pp. 1253-1263, 2007.
- [17] Praptiwi, A. Fathoni, and M. Ilyas, "Diversity of endophytic fungi from *Vernonia amygdalina*, their phenolic and flavonoid contents and bioactivities," *Biodiversitas*, vol. 21, no. 2, pp. 436-441, 2020.

- 
- [18] P. Bayman, "Diversity, scale and variation of endophytic fungi in leaves of tropical plants", in *Microbial ecology of aerial plant surfaces*, M.J. Bailey, A.K. Lilley, T.M. Timms-Wilson and P.T.N. Spencer-Phillips. Centre for Ecology & Hydrology, pp. 37-50, 2006.
- [19] M. Zarrin, F. Ganj, and S. Faramarzi, "Analysis of the rDNA internal transcribed spacer region of the *Fusarium* species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism," *Biomedical Reports*, vol. 4, no. 4, pp. 471-474, 2016.
- [20] S. K. Deshmukh, M. K. Gupta, V. Prakash, and S. Saxena, "Endophytic fungi: A source of potential antifungal compounds," *Journal of Fungi*, vol. 4, p. 707, 2018.
- [21] H. H. Abo Nahas, "Endophytic fungi: A gold mine of antioxidants," *Microbial Biosystems*, vol. 4, no. 1, pp. 58-79, 2019.
- [22] M. Yadav, A. Yadav, and J. P. Yadav, *In vitro* antioxidant activity and total phenolic content of endophytic fungi isolated from *Eugenia jambolana* Lam," *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, vol. 7, pp. S256-S261, 2014.
- [23] S. O. Rogers and A. J. Bendich, "Extraction of DNA from plant tissues." In: *Plant Molecular Biology Manual*. Springer, Dordrecht, 1988, doi: 10.1007/978-94-009-0951-9\_6.
- [24] R. Vig, F. Bhadra, S. K. Gupta, K. Sairam, and M. Vasundhara, "Neuroprotective effects of quercetin produced by an endophytic fungus *Nigrospora oryzae* isolated from *Tinospora cordifolia*," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 132, no. 1, pp. 365-380, 2022.
- [25] N. Fathallah, W. M. Elkady, S. A. Zahran, K. M. Darwish, S. S. Elhady, and Y. A. Elkhawas, "Unveiling the Multifaceted Capabilities of Endophytic *Aspergillus flavus* Isolated from *Annona squamosa* Fruit Peels against *Staphylococcus* Isolates and HCoV 229E—In Vitro and In Silico Investigations," *Pharmaceuticals*, vol. 17, no. 5, p. 656, 2024.
- [26] M. P. Patil, R. H. Patil, V. L. Maheshwari, "Biological activities and identification of bioactive metabolite from endophytic *Aspergillus flavus* L7 isolated from *Aegle marmelos*," *Current Microbiology*, vol. 71, pp. 39-48, 2015.
- [27] S. Kumar, G. Stecher, M. Li, C. Knyaz, and K. Tamura, "MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms," *Molecular Biology and Evolution*, vol. 35, pp. 1547-1549, 2018.
- [28] M. Kimura, "A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences," *Journal of Molecular Evolution*, vol. 16, pp. 111-120, 1980.