

PHÂN TÍCH LOÀI NẤM LINH CHI ĐEN MỚI PHÁT HIỆN ĐƯỢC Ở VƯỜN QUỐC GIA CÁT TIỀN, ĐỒNG NAI - LÂM ĐỒNG

LÊ XUÂN THẨM, NGUYỄN LÊ QUỐC HÙNG

Trung tâm Hạt nhân Tp. Hồ Chí Minh

ĐẶNG NGỌC QUANG

Trường đại học Sư phạm Hà nội

BÙI THỊ LƯƠNG

Đại học Quốc gia Hà nội

Họ Linh chi Ganodermataceae là một họ tương đối trẻ và đang phân hóa, có nhiều loài được định danh khi thì thuộc chi *Ganoderma*, khi thì thuộc chi *Amauroderma*. Thực ra nếu phân tích chi tiết cấu tạo của bào tử và thể quả thì có thể nhận thấy có một nhóm loài trung gian giữa hai chi *Ganoderma* và *Amauroderma*. Về cơ bản ý tưởng về sự giao hòa của các chi từ thập niên trước đã phân tích trong quá trình phân hóa dạng sống của chúng [16]. Loài nấm linh chi đen - *Amauroderma subresinosum* (Murr.) Corner cũng hiếm gặp [1, 2], được phát hiện lần đầu ở Vườn quốc gia Cát Tiên vào cuối mùa mưa năm 2004, có nhiều nét phân hóa như những dạng trung gian giữa 2 chi: *Ganoderma* và *Amauroderma*. Trong công trình này, chúng tôi bổ sung các dẫn liệu hình thái giải phẫu các bộ mẫu vật bản địa Việt Nam, mới thu thập trong các đợt khảo sát tại VQG Cát Tiên, kiểm tra danh pháp và lần đầu tiên tiến hành phân tích cấu trúc gen ri-bô-xôm (các vùng chuyên biệt ITS và D), tích hợp các kết quả thu được và thảo luận về hệ thống học phân tử chủng loại phát sinh. Các đặc điểm thành phần hóa sinh đã được phân tích, lần đầu tiên xác định được acid béo và nhiều sterôn - dẫn chất từ triterpenoit trong loài linh chi này [13].

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nghiên cứu hình thái của nấm

Mẫu vật được phát hiện lần đầu ở Nam Cát Tiên - tuyến Tà Lài, vào cuối mùa mưa (11/2004). Liên tiếp những năm sau (2005-2008) chúng tôi tiếp tục thu mẫu và giám định

theo Steyaert (1972) [15], Ryvarden & Johansen (1980) [14], Corner (1983) [3] và Zhao (1989) [20]; mô tả chi tiết, chụp ảnh bào tử dưới vật kính dầu ($\times 100$), trên cơ sở phân tích các kiểu bào tử đặc trưng, tách phân lập giống và nuôi trồng theo quy trình của chúng tôi [18, 19].

2. Nghiên cứu phân hóa cấu trúc của DNA

Theo các quy trình chuẩn quốc tế đã được áp dụng rộng rãi trong nghiên cứu hệ thống học phân tử nấm [5, 11], chúng tôi tiến hành các thực nghiệm tại Viện Công nghệ sinh học vi sinh, thuộc Đại học quốc gia Hà Nội. Để đọc trình tự DNA và xây dựng cây phân loại, các bước tiến hành lần lượt là: tách DNA trực tiếp từ sinh khối của hệ sợi nấm nuôi cấy thuần khiết, với các bộ mồi đặc hiệu cho phản ứng PCR, chạy phản ứng PCR, làm tinh sạch DNA sau khi thực hiện phản ứng PCR, cuối cùng khuếch đại DNA để giải trình tự (sequencing). Trình tự của vùng ITS1/ITS2 và vùng D1/D2 rDNA 26S của chủng nấm được đọc trực tiếp trên máy đọc trình tự tự động 3100 Avant. Sau đó, kết quả trình tự được so sánh với các trình tự của các loài đã được xác định trong Ngân hàng gen.

Xây dựng cây phân loại sử dụng phần mềm ClustalX 1.83. Nghiên cứu cấu trúc rDNA các vùng ITS và vùng D1/2, kiểm tra trên Ngân hàng gen, so sánh với kết quả kinh điển và gần đây nhất [5].

3. Nghiên cứu thành phần hoạt chất

Bằng các phương pháp chiết, tách xác định các nhóm xêrôn (triterpenoit), acid béo... bằng sắc ký, phổ kế khối lượng và cộng hưởng từ hạt

nhân, so sánh với các tư liệu về *Ganoderma* đã biết. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân được đo bằng máy Varian Unity 600 NMR spectrometer (600 MHz) trong dung môi CD_3OD và CD_3Cl . Phổ khối đo trên máy JEOL JMS AX-500 spectrometer. Phổ hồng ngoại ghi trên máy Perkin Elmer Spectrum one FT-IR Spectrometer. Sắc ký cột dùng SiO_2 (60-100 μm) và sắc ký bản mỏng của hãng Merck. Sắc ký khí-khối phổ liên hợp (GC-MS) của hãng Hewlett-Packard Mass selective detector và GC system HP 6890 series, chương trình nhiệt độ từ 70°C được giữ trong 3 phút, tăng dần với tốc độ 10°C/phút lên đến 250°C và giữ đẳng nhiệt 5 phút. Tổng thời gian chạy là 26 phút. Các dung môi CHCl_3 , MeOH, EtOAc được sử dụng trong quá trình chiết tách. Nấm linh chi đen *A. subresinosum* (12,6 g) được làm khô tự nhiên, sau đó thái nhỏ và chiết bằng dung môi EtOAc (300 ml), sau đó chiết lại với MeOH (300 ml). Dịch chiết được cô cạn bằng hệ thống cất quay áp suất giảm và thu được hai cặn chiết với khối lượng tương ứng là 116,9 mg và 476,9 mg. Sau đó sử dụng hệ thống sắc ký cột nhồi bằng sicca gel và rửa giải bằng dung môi CHCl_3 có tăng dần hàm lượng MeOH từ 1 đến 10% để phân tích cặn chiết EtOAc (116,9 mg) và thu được hai phân đoạn, một phân đoạn là các steroid (12,5 mg) còn phân đoạn kia là các axit béo (83,2 mg). Các axit béo (2 mg) được methyl hóa bằng $(\text{CH}_3)_3\text{SiN}_2\text{CH}$ (0,5 ml) trong dung môi MeOH (0,5 ml) tại nhiệt độ 5°C trong thời gian 3 giờ, sau đó phân tích bằng GC-MS.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Mô tả mẫu

Bao gồm khoảng 15 thể quả lớn nhỏ, với ký hiệu CT LXT-D04-24.

Linh chi đen - *Amauroderma subresinosum* (Murr.) Corner Beih. Nova Hedwigia 75: 93, 1983 [3].

Fomes subresinosum Murrill, Bull. Torrey Bot. Club 35: 410, 1908; *Ganoderma subresinosum* (Murr.) Humphrey, Mycologia 30: 332, 1938; *Magoderna subresinosum* (Murr.) Steyaert, Persoonia 7: 112-114, 1972; *Trachyderma subresinosum* (Murr.) Imaz., Bull. Govt. Forest Exp. Stn. Japan No. 57: 119, 1952; *Ganoderma simulans* Wakef., Bull. misc. Inf.

Kew 1922: 161; *Polyporus mameliporus* Beeli, Bull. Soc. R. Bot. Belg. 42: 62, 1929.

Tuy nhiên, trường hợp danh pháp: *Amauroderma subresinosum* (Murr.) Teixeira, Rev. Bras. Bot. 15: 125, 1992: Nomen illegit. non Corner 1983, lại có ý nghĩa riêng. Nghĩa là Teixeira nhằm chỉ một taxon khác. Theo các tài liệu kinh điển, loài này được xác định là *Amauroderma subresinosum* [2, 3, 20], hoặc như Humphrey (1938) xác lập: *Ganoderma subresinosum*. Phân bố chủ yếu ở Đông Nam Á: Phi-lip-pin, In-đô-nê-xia, Ma-lai-xia, Mi-an-ma, Việt Nam, miền Nam Trung Quốc, Ấn Độ, Xri-Lan-ka, vùng quần đảo Sô-lô-mông và ở châu Phi: Công-gô, Zaire, Kê-nia. Imazeki (1952) [7, 8] xác lập chi *Trachyderma* (cùng với loài chuẩn lấy từ *Ganoderma tsunodae*) và Steyaert (1972) [15] lại đề xuất tách ra chi *Magoderna* độc lập và chọn loài này làm chuẩn, cùng 2 loài nữa: *Magoderna infundibuliforme* và *M. vansteenisi*. Tuy nhiên các tác giả kinh điển này mới chỉ dựa trên đặc điểm giải phẫu lớp vỏ tán và lớp mô lân cận - những đặc điểm này dễ biến động theo các điều kiện sinh thái môi trường, chưa đủ tính ổn định. Loài này chúng tôi phát hiện lần đầu tiên ở tuyến Tà Lài vào tháng 11 năm 2004, liên tục các năm sau đều thu được mẫu khắp vùng Lâm Đồng - Đồng Nai.

Thể quả mọc hàng năm, trên các thân cây gỗ, từng tán riêng lẻ song cụm thành đám 3-5, đôi khi có 2 tán mọc chồng lên nhau, thường có màu đen nhánh như sơn dầu. Tuy nhiên, cũng có một số thể quả có lớp vỏ trên không láng nhẵn, mà mờ đục, đen đục, song mặt dưới và cấu trúc bào tử thì rất tương đồng với nhau. Tán nấm có đường kính dao động từ 3,5-7,5 cm, thường hình thận gần tròn, có thể xòe rộng như dạng quạt tới 20 × 12 cm, dày tới 1,8-2,7 cm, nhất là ở VQG Cát Tiên và Pù Mát. Đôi khi, có những mẫu sưu tập đơn lẻ có kích thước rất lớn (20-26 cm). Mép tán nguyên hoặc hơi phân thùy, mặt trên thường nhăn nheo thành rãnh tỏa đều từ gốc dính vào giá thể. Nhìn chung hình thái thể quả biến động đa dạng, đôi khi gây khó khăn cho việc định loại (hình 2, 3).

Lớp vỏ tán mỏng (0,3-0,5 mm), khi ấn vào dễ dập vỡ, thường láng bóng, màu đen nhánh, đường vòng quanh mép có thể hơi nâu đỏ (nhất là khi còn non, sắc nâu đỏ kiểu *Ganoderma* rất rõ).

Lớp thịt nấm chất nạc đặc trắng tươi, khi khô ngả màu kem nhạt - xám nhạt, dày 4,4-12,4 mm, có thể thấy rất khác biệt so với các loài *Ganoderma* và cả với các loài *Amauroderma* khác, đây có thể coi là đặc điểm chẩn đoán loài thuận tiện.

Những loài *Amauroderma* có lớp vỏ láng đen bóng (laccate) hoặc láng nhẵn (sublaccate) không phổ biến như trong chi *Ganoderma*, chỉ được ghi nhận vài loài trong công trình [20, 21]. Lớp thịt trắng tươi rất đặc trưng (có lẽ cực hiếm trong các loài *Amauroderma* và *Ganoderma*), dày khoảng 4,4-12,6 mm, thể hiện rõ tia sợi nấm tỏa theo 2 hướng: phần hướng lên trên tiếp giáp vào lớp vỏ tán và phần hướng xuống dưới. Phần gốc các hệ tia sợi thụ cứng, dày. Hệ sợi thể hiện 3 kiểu (trimitic) rõ. Lớp thịt nấm (context) chất nạc đặc trắng tươi, khi khô ngả màu kem nhạt - xám nhạt, hơi giống chất pho mát trắng (cheesy - creamy), sau chuyển màu ngà vàng, đôi khi có mầu rất dày, tầng thịt nấm tới 3,5-4,5 cm, nhất là ở vùng gốc dính vào giá thể, có thể thấy rất khác biệt so với các loài *Ganoderma* và cả với các loài *Amauroderma* khác, đây có thể coi là đặc điểm chẩn đoán loài thuận tiện. Tuy màu sắc hơi giống mô thịt của nấm hoàng chi *G. colossum* và *Haddowia* song cấu trúc của mô thịt nấm *A. subresinosum* chắc đặc và nặng hơn nhiều, khi khô rắn chắc.

Lớp ống thẳng khá dày, tới 6,6-16,8 mm, khi tươi màu trắng kem, khi khô ngả xám vàng - xám kem hơi nâu. Bề mặt lớp ống có lỗ tròn mịn, màu trắng kem - xám kem. Khi còn non bề mặt lỗ ống thường được phủ kín bởi lớp mô sợi tầng trưởng rất mạnh tràn lên. Lỗ tròn, có 3-4 lỗ/mm, thành lỗ (dissepiment) khá dày.

Nhìn chung, dựa trên các đặc điểm hình thái thể quả nhiều tác giả dễ dàng xếp vào chi *Ganoderma*, song chất thịt nấm trắng tươi là rất khác biệt (hình 2, 3).

Hình thái bào tử lại thể hiện như dạng trung gian: có mấu dính ở đáy bào tử song phần lỗ này mầu không phân hóa rõ, chỉ thể hiện là vùng vỏ mỏng đi, nhẵn, hơi lõm thành bờ mép đôi khi phồng dày ở chóp bào tử.

Tuy nhiên, vẫn nhận thấy dễ dàng vùng lỗ này mầu (aperture) là đầu thuôn của bào tử. Thực vậy, bào tử hình trứng thuôn, hầu như trong suốt, có kích thước khá lớn: 14,2-17,8 ×

9,9-12,7 μ m. Đáy tròn bầu của bào tử thể hiện rõ mầu dính trên tiểu bính. Tuy nhiên, chưa thấy tác giả nào ghi nhận và mô tả đặc điểm này. Đầu đối diện thuôn dài, vỏ mỏng rất trong, phồng lên hình chòm tròn - vùng lỗ nảy mầm (germpore). Chính giữa, thấy có giọt nội chất hình tròn, mầu đậm vàng nâu. Đôi khi do trương nước mạnh giọt nội chất này bị tan thoát ra. Theo hình dạng chung thì bào tử loài này dễ được xác định thuộc kiểu ganodermoid, nghĩa là thuộc chi *Ganoderma*, song hầu như các tác giả đều không nhận thấy mấu dính trên đáy bầu tròn, mà chỉ thể hiện đầu thuôn chóp - dễ cho rằng thuộc kiểu amaurodermoid, nghĩa là thuộc chi *Amauroderma*. Thêm nữa, hầu hết các tác giả cho rằng kiểu lớp vỏ bào tử không phải dạng kép, vì rất mỏng, và bề mặt tán mầu đen đặc trưng thuộc *Amauroderma*.

Có thể ghi nhận đây là trường hợp hiếm loài trong chi *Amauroderma* có bào tử với sự định vị lỗ nảy mầm và mấu dính trên tiểu bính riêng biệt nhau. Nhiều tác giả chưa coi trọng đặc điểm này, hầu hết đều vẽ mô tả bào tử đơn điệu, các chi tiết không chính xác, không thể hiện mấu dính ở đáy bào tử (nếu quan sát kỹ dưới vật kính dầu: × 100 hầu như lúc nào cũng có thể nhận thấy cấu trúc này và lớp bề mặt dạng gờ mụn cóc mịn). Kết quả của chúng tôi khẳng định luôn luôn tồn tại đặc điểm cấu trúc này, nghĩa là cần phải xếp vào kiểu ganodermoid (hình 1 a,b).

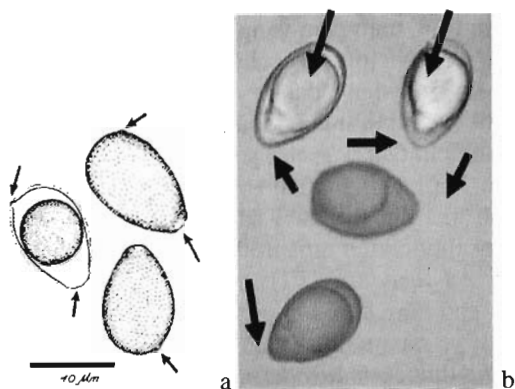
Hiểu đúng và vẽ rõ các cấu trúc bào tử ganodermoid là Furtado (1967) [4] và Perreau (1973) [12], tuy nhiên các kiểu trung gian với amaurodermoid chưa được nhận xét và thảo luận kỹ.

Trong trường hợp loài này, các tác giả không thể hiện sự định vị lỗ nảy mầm và mấu dính trên tiểu bính riêng biệt nhau và vì lớp vỏ mỏng mịn nên cho rằng thuộc *Amauroderma*. Như vậy cũng có thể nhận định rằng đây là dạng trung gian về bào tử với *Ganoderma*.

Thực ra nếu phân tích các chi tiết cấu tạo của bào tử và thể quả thì có thể nhận thấy có một nhóm loài trung gian giữa hai chi *Ganoderma* và *Amauroderma*. Vì lẽ tự nhiên là trong thực tế ranh giới giữa các taxon nhiều khi rất khó tách bạch, mà xen phủ chồng lấn ở một hoặc một số đặc điểm giám định. Điều này cũng phản ánh tiến trình phân hóa có tính liên tục của các taxon. Về cơ bản, ý tưởng về sự giao hòa

của các chi thuộc họ Ganodermataceae Donk từ thập niên trước đã được phân tích trong quá trình phân hóa dạng sống của chúng [16, 17]. Và nay, rõ ràng loài nấm linh chi đen

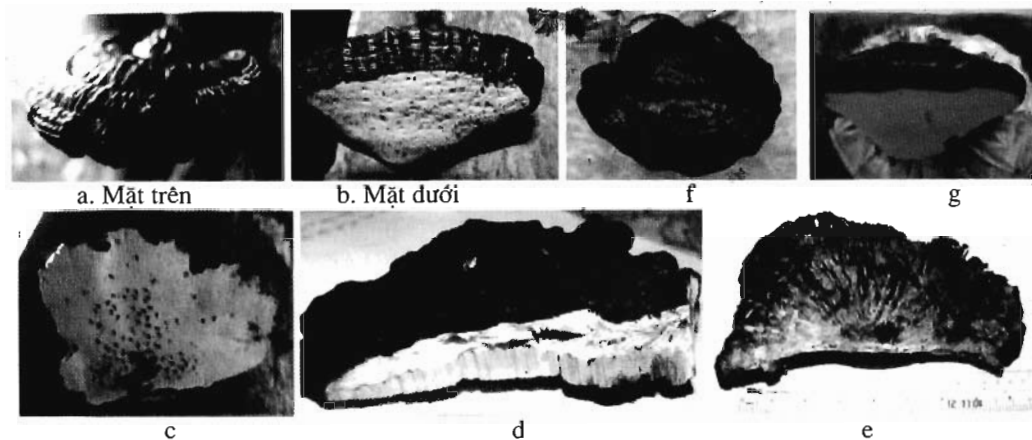
A. subresinosum là một minh chứng đặc sắc. Đáng lưu ý là vùng lỗ nảy mầm đã tiêu biến khá mạnh, chỉ còn là vùng mỏng đi rõ rệt của lớp vỏ ngoài bào tử, với viền bờ mép hơi dày lên.



Hình 1. a. Bào tử linh chi đen bóng *Amauroderma subresinosum*; b. Bào tử đảm dạng trứng kiểu trung gian amaurodermoid - ganodermoid (chụp trên kính hiển vi x100, các mũi tên chỉ rõ mấu đỉnh đáy bào tử đối diện với lỗ nảy mầm)



Hình 2. Thể quả non cho thấy rõ lớp vỏ láng màu đỏ nâu và sẫm màu dần



Hình 3. Thể quả linh chi đen bóng *Amauroderma subresinosum*
a-e. Mặt trên đen bóng, lớp thịt trắng, ống bào tử xám nâu nhạt; f-g. Thể quả nuôi trồng ở Long Khánh, tp. Hồ Chí Minh, Cát Tiên và Đà Lạt.

Do vậy, việc Steyaert (1972) [15] đề nghị: *Magoderna subresinosum* (Murr.) Steyaert, Persoonia 7: 112-114, 1972, hoặc [7, 8] ngay từ 1952 Imazeki đề xuất: *Trachyderma subresinosum* (Murr.) Imazeki, Bull. Govt. Forest Exp. Stn. Japan No. 57: 119, có thể cần xem xét lại như là những quan điểm mới. Trở lại với lịch sử của *Magoderna* (theo đảo ngữ anagram: từ *Ganoderma* của Steyaert - hoặc là

chi *Magoderna* Steyaert (1972), hoặc là phân chi, hoặc như Imazeki đề nghị: *Trachyderma*. Điều này cần phải được nghiên cứu sâu hơn với những dẫn liệu hiện đại. Do đó chúng tôi tiếp tục khảo cứu bổ sung về phương diện phân hóa phổ hoạt chất và phân hóa cấu trúc DNA: các vùng gene ribosome của loài nấm dược liệu đặc sắc này.

Khi khô nấm khá cứng rắn và nặng (chắc đặc). Mối báo cáo gặp ở châu Á và châu Phi nhiệt đới, có lẽ được nghiên cứu kỹ nhất là ở Việt Nam, gặp ở Thừa Thiên - Huế.... Đã tách phân lập giống nguyên chủng và nuôi trồng hoàn chỉnh trên cơ chất tổng hợp. Thể quả phát triển tốt sau 70-80 ngày, hoàn chỉnh cả ở vùng nóng (Cát Tiên, Long Khánh, Đồng Nai) và vùng lạnh (Đà Lạt, Lâm Đồng). Khả năng này cho phép nuôi trồng rộng rãi (hình 3 f, g).

2. Nghiên cứu phân hóa cấu trúc của DNA

a. Kết quả phân tích *A. subresinosum* (ký hiệu *A. sub_I*)

Đặc trưng cấu trúc gen ri-bô-xôm (các vùng ITS và D) cho thấy nhiều khác biệt với các loài *Ganoderma*. Kết quả tương tự về phân tích rDNA - ITS cũng được các tác giả ở Tasmania, Ôx-trây-li-a và In-đô-nê-xia thu nhận được [5].

D1/D2 26S *Ganoderma colossum*: thật lý thú khi thấy rằng độ tương đồng tới ~ 97,5% (597/612 bp) với *Amauroderma subresinosum* (AUS) và rất tách biệt với *Ganoderma* spp. Kết quả tương tự về phân tích rDNA - ITS nấm hắc chi (đã báo cáo sơ bộ tại Đại hội Nấm học châu Á, Chiba, Nhật Bản, 6/2006), cũng phù hợp với kết quả được các tác giả ở Tasmania, Ôx-trây-li-a và In-đô-nê-xia thu nhận được [5].

Trình tự rDNA của vùng ITS (5.8S):

```
GGCCTTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTC
ATCCACTCTACACCTGTGCACCTTACTGTGGGT
TCAATGCGTGGAATGAGGCCCTTACGGGCTCG
TGAAGCGGGTTGTGCCTGCGTTTATTACAAAC
ACTATAAAGTATAAGAACGTGTATTGCGATGT
AACGCATCTATATACAACCTTTCAGCAACGGAT
CTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGC
GAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAT
TCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTT
GCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGT
TTGAGTGTGCATGAAATCTTCAATCTACAAACC
TTTGCGGGTTTTCAGATTGGACTTGGAGGC
TTTGCCGCCCCGGTCCGGTCTCTTAAATGCATT
AGCTTGGTTCCTTGC GGATCGGCTTACGGTGT
GATAATTGTCTACGCCGCGACCGTGAACGTTT
GGCCAACCTTCCAACCGTCTCGTTGAAGACTCC
TAAGTACCTCTGACCTCAAATCAGGTAGGAC
TACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGCGG
AGGAAAAGAAA
```

Trình tự rDNA của vùng ITS của loài tương đồng rất lớn với ITS (chỉ sai khác 1 nucleotide) đã đăng ký trong Ngân hàng gen của

Amauroderma subresinosum. Nghĩa là kết quả phân tích ở Việt Nam có độ chính xác và tin cậy cao.

Trình tự rDNA của vùng D1/D2 (26S):

```
AAACTAACAAGGATTCCCCTAGTAACTGC
GAGTGAAGCGGGAAGAGCTCAAATTTAAAAT
CTGGCGGTCTTTGGCCGCTCCGAGTTGTAGTCT
GGAGAAGTGCTTTCCGCGCTGGACCGTGTATA
AGTCTCTTGGAAACAGAGCGTCATAGAGGGTG
AGAATCCCGTCTTTGACACGGACTACCAAGTGC
TTTGTGATGCGCTCTCAAAGAGTCGAGTTGTT
TGGAATGCAGCTCAAAAATGGGTGGTGAATT
CCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCG
ATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGA
AAAGCACTTGGAAAGAGAGTTAAACAGTAC
GTGAAATTGCTGAAAGGGAAACGCTTGAAGT
CAGTCGCGTCGTTTAGAACTCAGCCTTGCTTTT
GCTTGGTGCACCTTCTAGATGACGGGGCAGCA
TCGATTTTGAACCGTCGGAAAAGGGCTAGGGTA
ATGTGGCACCTCCGGGTGTGTTATAGACTCTA
GTGCATACGGCGGTTGGGATCGAGGAACGC
AGCGCGCCGCAAGGCAGGGGTTCCGCCACTTT
CGCGCTTAGGATGCTGGCATAATGGCTTTAAA
CGACCCGCTTGAACACGGACC
```

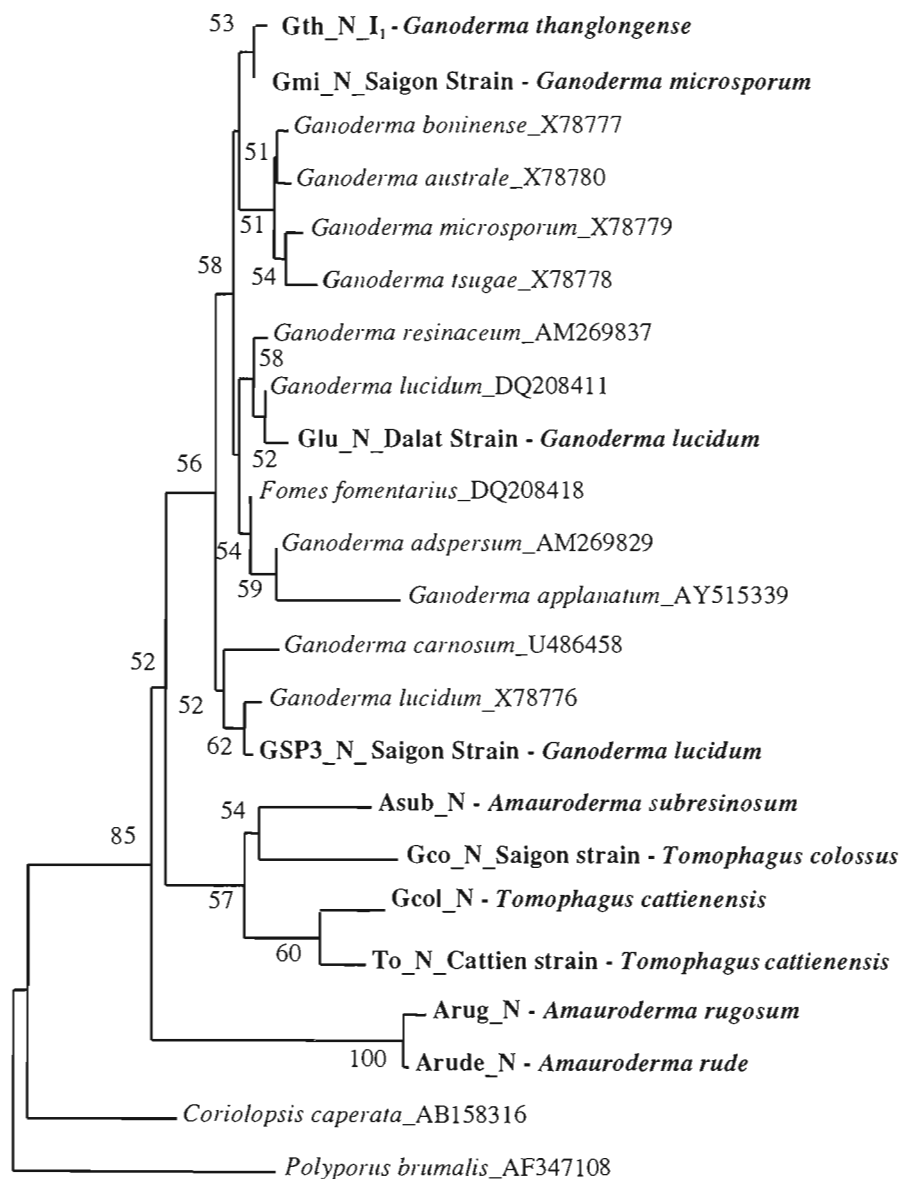
Khi phân tích so sánh cả 2 loài hắc chi *Amauroderma rude* và *A. rugosum* cũng thu được kết quả lý thú. Trình tự rDNA của vùng D1/D2 26S của loài *A. subresinosum* (*A. sub*) cũng tương đồng tới 99,8% (611/612 bp) với vùng D1/D2 của AUS trong Ngân hàng dữ liệu (Genbank) - nghĩa là kết quả phân tích có độ tin cậy cao. Đặc biệt tương đồng tới 97,7% (598/612 bp) với vùng D1/D2 của *G. colossum*. Với độ tương đồng với *A. subresinosum* gần 3%, rõ ràng *G. colossum* thể hiện sự tách ly khá lớn với nhóm *Ganoderma* và phù hợp với nghiên cứu nhận định của Moncalvo và cs. 1997, Hong & Jung (2004) cho rằng nên tách và khôi phục chi *Tomophagus* Murr [6]. Vấn đề này sẽ được trình bày trong công trình sau. Chính những phân hóa tách ly và tương đồng trong vùng D cho phép phác họa các mối quan hệ chủng loại phát sinh của các nhóm hệ thống (hình 4).

Theo trình tự vùng D của rDNA của hai loài linh chi đen và linh chi vàng có quan hệ rất gần cận với nhóm *Amauroderma* (hắc chi: *amauroderma* nghĩa là đen) và phân ly xa với các nhóm *Ganoderma*. Điều này Moncalvo và Ryvarden, (1997) đã nêu ra và chỉ rõ vị trí độc lập của chi *Amauroderma* Murr. và cần phải khôi phục chi *Tomophagus* Murr [6]. Tuy nhiên,

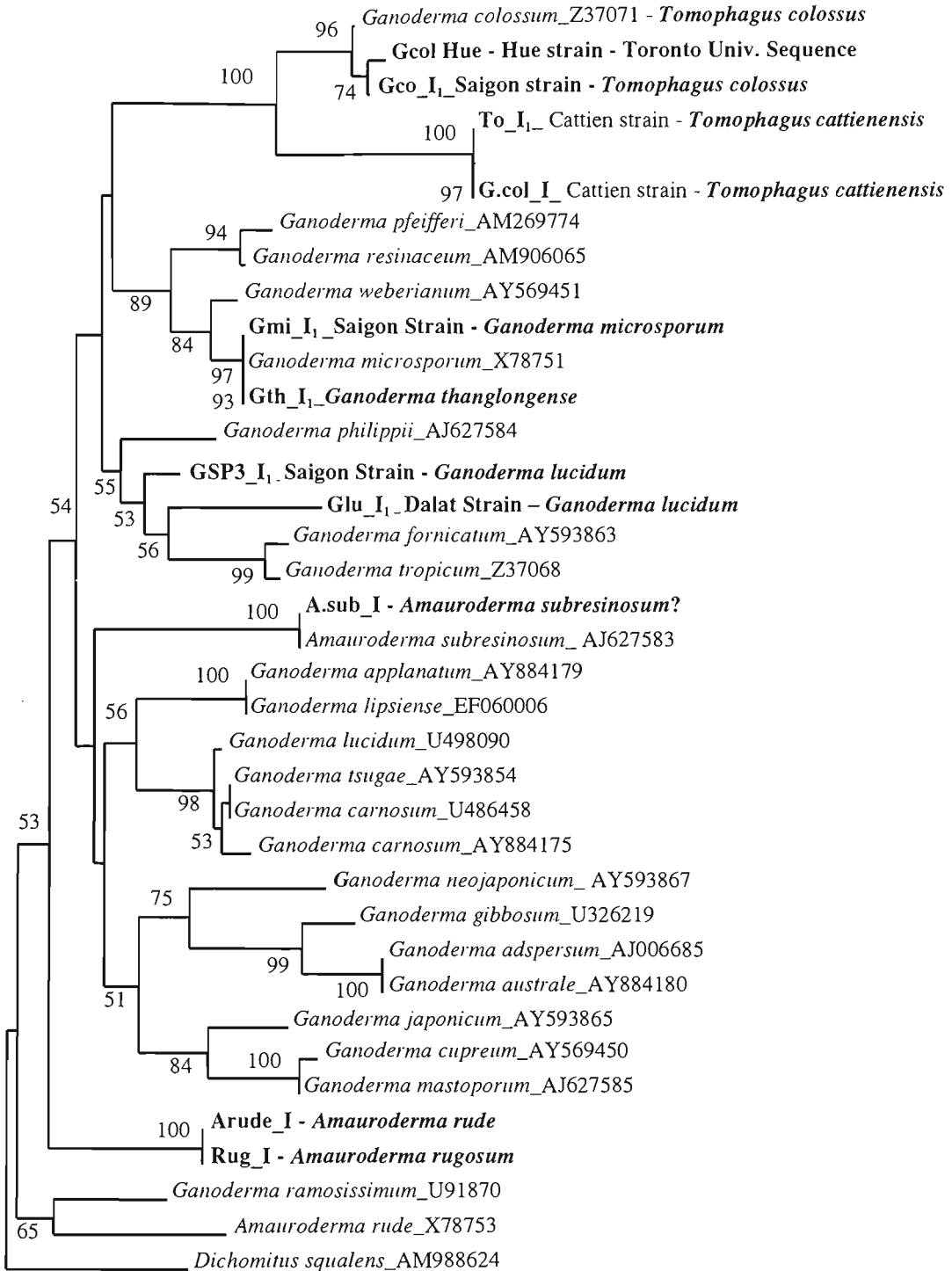
khi ấy mới chỉ có 1 loài: *Amauroderma rude* và *Tomophagus colossus* được khảo cứu. Gần đây, Glen và cs. (2006) đã khảo cứu thêm 2 loài: *A. rugosum* và *A. subresinosum*. Kết quả rất phù hợp với chúng tôi và đặc biệt khi so sánh trình tự vùng ITS1 và ITS2 riêng rẽ. Trong khi vùng ITS2 chỉ rõ độ phù hợp với vùng D1/2 và cho

thấy vị trí hợp lý: *A. subresinosum*, thì vùng ITS1 lại cho thấy loài này nằm trong nhóm các loài *Ganoderma* - Dẫn liệu này luận giải vì sao một số tác giả xác định là: *Ganoderma subresinosum*. Nghĩa là xếp vào chi nào cũng có cơ sở hợp lý (hình 5, 6). Rõ ràng đây là một taxon trung gian.

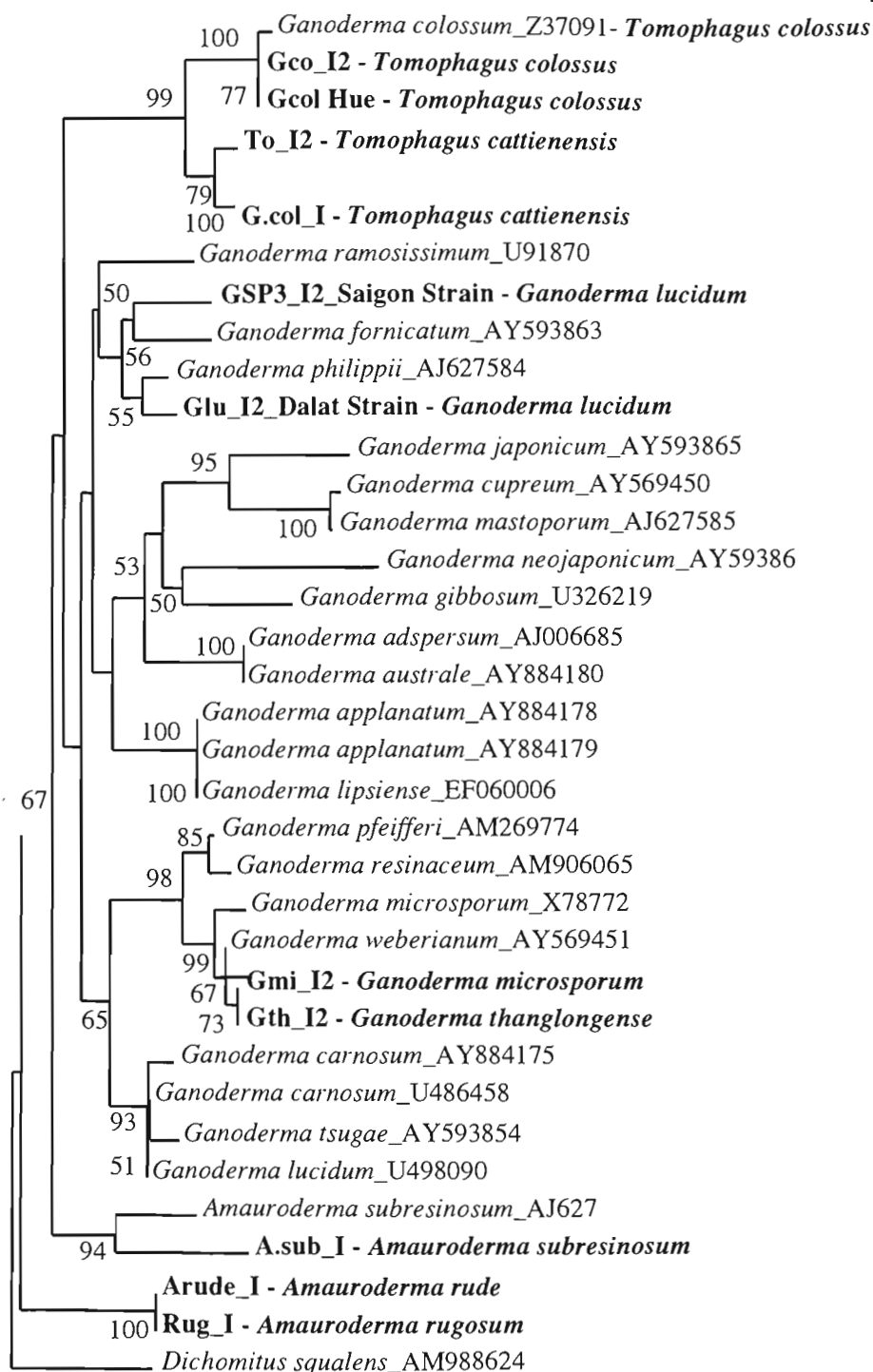
0,01



Hình 4. Quan hệ chủng loại phát sinh của các loài linh chi có quan hệ gần theo dẫn liệu ADNr 26S D1/D2 (600bp)



Hình 5. Quan hệ chủng loại phát sinh của *Amauroderma subresinosum* với các loài *Ganoderma* quan hệ gần dựa vào ADNr ITS1 (218bp)



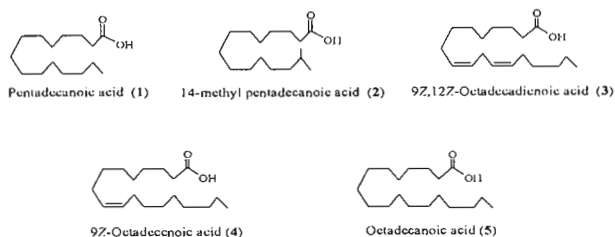
Hình 6. Quan hệ chủng loại phát sinh của *Amauroderma subresinosum* với các loài *Amauroderma* quan hệ gần dựa vào ADN_r ITS2 (218bp)

3. Nghiên cứu thành phần hoạt chất

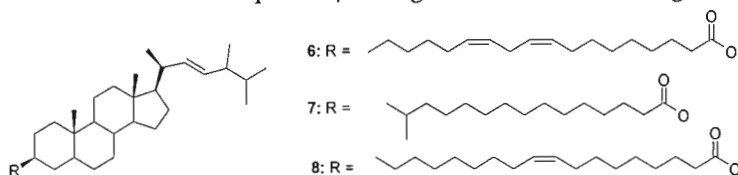
Qua việc phân tích sơ bộ phổ cộng hưởng từ hạt nhân ($^1\text{H-NMR}$) của hai phân đoạn tách cho thấy chúng có chứa các axit béo và một số steroid. Phân đoạn có chứa axit béo có xuất hiện dải hấp thụ từ 2500-3400 nm. Ngoài ra không có nhóm methoxyl trong phổ $^1\text{H-NMR}$. Các axit béo tiếp tục bị methyl hóa thành hỗn hợp các ex-te và sau đó phân tích bằng GC-MS, 5 ex-te đã được xác định có phổ khối trùng hợp tới 99% so với thư viện phổ. Xác định được các axit béo là axit pentadecanoic ($\text{C}_{15}\text{H}_{30}\text{O}_2$) (4%), axit 14-Methyl pentadecanoic ($\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$) (24 %), axit 9,12-Octadecadienoic ($\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2$) (19%), axit 9-Octadecenoic ($\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$) (42%) và axit Octadecanoic ($\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}_2$) (10%). Phân đoạn có

chứa các steroid là một hỗn hợp có cấu trúc tương tự nhau. Phân lập sơ bộ chúng là các steroid có gắn với các axit béo dưới dạng các ex-te có khối lượng phân tử là m/z 662, 660 và 636. Trong cận chiết bằng MeOH, chúng tôi đã phân tích phổ $^1\text{H-NMR}$ thì thấy chúng là hỗn hợp của một số loại đường, có thể là các đơn phân tử hoặc có thêm các polysaccharite, vốn rất phổ biến trong nấm linh chi *Ganoderma* sp., nghĩa là rất có giá trị dược liệu [18, 19].

Như vậy, lần đầu tiên, chúng tôi đã phân lập và xác định được năm axit béo, hỗn hợp các xê-rôn (thực chất là các dẫn chất của khung triterpenoit, rất phổ biến trong các loài *Ganoderma*) và đường trong nấm linh chi đen *A. subresinosum* thu hái tại Việt Nam (hình 7, 8).



Hình 7. Các axit béo lần đầu tiên phát hiện trong nấm linh chi đen bóng *A. subresinosum*



Hình 8. Một số dẫn xuất xêrôn trên khung triterpenoit

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ngô Anh, 2004: Nghiên cứu thành phần loài Nấm lớn Thừa Thiên - Huế. Luận án tiến sỹ.
2. Aoshima K., 1971: Bull. Nat. Sci. Mus. Tokyo, 14: 428-437.
3. Corner E. J. H., 1983: Beihefte Zur. Nov. Hedw., 75: 1-182.
4. Furtado J. S., 1962: Rickia, 1: 1-22.
5. Glen M., K. Potter and P. Sulistyawati, 2006: Canberra. ACIAR Proceedings, 124: 55-59.
6. Hong S. G., Jung H. S., 2004: Mycologia, 96: 742-755.
7. Imazeki R., 1943: Bull. Tokyo Sci. Mus., 6: 1-111.
8. Imazeki R., 1952: Bull. Govt. Forest. Exp. St. Tokyo, 57: 67-128.
9. Trịnh Tam Kiệt, 2001: Danh lục Thực vật Việt Nam. Nxb. Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
10. Moncalvo J. M. & L. Ryvardeen, 1997: Synopsis Fungorum, 11: 1-114.
11. Moncalvo J. M. and Buchanan P. K., 2008: Mycologia: 426-436.
12. Perreau J., 1972: Rev. Mycol. Tome, XXXVII: 241-252.
13. Quang, D. N. Tham, L. X. Yen, L. T. H. Hop D. V., 2007: Inter. J. Med. Mus., 9: 343-344.
14. Ryvardeen L. & Johansen I., 1980: Preliminary polypore flora of East Africa. Fungiflora.

15. Steyaert R. L., 1972: Persoonia, 7: 55-118.
16. Lê Xuân Thám, 1996: Tạp chí Dược học, 10: 11-15.
17. Le Xuan Tham, 1998: Mycotaxon, 69: 1-12.
18. Lê Xuân Thám, 2005: Nấm Linh chi Ganodermataceae - Tài nguyên dược liệu quý ở Việt Nam. Nxb. Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
19. Le Xuan Tham et al., 2007: Representatives of Precious Lingzhi of Haddowia, Humphreya, Magoderma, Amauroderma and Tomophagus recorded from South Vietnam and derived from Ganoderma? Asian Mycol. Conference, Penang, Malaysia.
20. Zhao J. D., 1989: Biblioth. Mycol., 132: 1-176.
21. Zhao J. D. & X.Q. Zhang, 2000: Flora Fungorum Sinicorum, 18: 1-204.

ANALYSIS OF THE BLACK LINGZHI NEWLY-FOUND FROM NATIONAL PARK OF CAT TIEN, SOUTH VIETNAM

LE XUAN THAM, NGUYEN LE QUOC HUNG, DANG NGOC QUANG, BUI THI LUONG

SUMMARY

1. Systematic based on morphology

Basing on morphological characters of fruit bodies the treatment of taxonomy of a rare Black Lingzhi fungus, either *Ganoderma subresinosum* (Murr.) Humphrey, *Magoderma subresinosum* (Murr.) Steyaert, *Trachyderma subresinosum* (Murr.) Imazeki, [8, 15], or *Amauroderma subresinosum* (Murr.) Corner, based on *Fomes subresinosum* Murril [3, 10, 21] was carried out with authentic specimens just collected in Central and South Vietnam. Characteristics in basidiospore structures are well shown typically intermediate between amaurodermoid and ganodermoid forms: subglobose with minimized or non-aperture (germ pore) and very thin quite non-double wall, but with a hillum on the bottom (attachment to sterigma on basidia). Basidiocarps annual, sessile, corky to woody, sometimes substipitate, up to 3.5-16.5 (20-22.5) × 2-8.5 (4.5-12.5) × 1.5-3.5 cm. Upper surface black, sublaccate, the context is quite ivory white, whitish later becoming faintly pinkish brown and the layer of tubes is quite whitish yellow or cinnamon. Pore surface whitish and becoming whitish grey. Small spores (very rare) colorless, unitunicate, and quite subglobose-ovate. This species as the type of the genus *Magoderma* (using an anagram from *Ganoderma*) was shown as an intermediate form between genera *Ganoderma* and *Amauroderma* with some transient taxa significant in phylogeny.

2. Speciations in rDNA: Molecular analysis of D1,D2 and ITS1,2 (rDNA)

Molecular examinations of rDNA with nearly complete sequencing D1, D2 regions (26S) have revealed that this taxon is separated from the *Ganoderma* species. The sequences of rDNA 26S are quite similar to *Tomophagus* and *Amauroderma* species. However, the sequences of ITS1 and ITS2 (5.8S) are so diverse. While the ITS1 shares high similarity with *Ganoderma* species, the ITS2 shows very close relationship with *Amauroderma*. It should be explained that this taxon would be an intermediate speciation derived from *Ganoderma* and *Magoderma* Stey., if revised and recovered, should evolved similar species and placed in the transient position between genera *Amauroderma* and *Ganoderma*.

3. Characterisations in Composition of bioactive ingredients

For the first time, phytochemical compositions of the fruit bodies of *Amauroderma subresinosum* have led to the isolation and structural elucidation of five fatty acids as Pentadecanoic acid (C₁₅H₃₀O₂) (4%), 14-Methyl pentadecanoic acid (C₁₆H₃₂O₂) (24%), 9,12-Octadecadienoic acid (C₁₈H₃₂O₂) (19%), 9-Octadecenoic acid (C₁₈H₃₄O₂) (42%) and Octadecanoic acid (C₁₈H₃₆O₂) (10%), unknown from any *Ganoderma* species up to date, together with a mixture of steroids and sugars, and some derivatives of triterpenoids. Their structures were elucidated by a combination of 1D NMR and GC-MS. These results support a new and further taxonomy of the Ganodermataceae family, in which *A. subresinosum* is designated in the distinctive genus *Amauroderma*, separated from *Ganoderma*, due to mainly poor derivatives of triterpenoids, that are commonly found from *Ganoderma* species, particularly in *G. lucidum* complex.

Ngày nhận bài: 21-3-2008