

Xây dựng mô hình chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* cho nấm dược liệu *Cordyceps militaris* G12

Trần Văn Tuấn^{1,2*}, Vũ Xuân Tạo^{2,3}

¹Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

²Phòng thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein,
Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

³Trung tâm Sinh học Thực nghiệm, Viện Ứng dụng Công nghệ, Bộ KH&CN

Ngày nhận bài 25/3/2020; ngày gửi phản biện 27/3/2020; ngày nhận phản biện 24/4/2020; ngày chấp nhận đăng 29/4/2020

Tóm tắt:

Cordyceps militaris là một loài nấm dược liệu quý và đã được chứng minh là có chứa nhiều hoạt chất có lợi cho sức khỏe, như adenosine, cordycepin, pentostatin, polysaccharide, carotenoid. Do đó, loài nấm này gần đây được coi là mô hình triển vọng để nghiên cứu cơ chế phân tử của quá trình hình thành quả thể và sinh tổng hợp các chất có hoạt tính sinh học. Phát triển các hệ thống chuyển gen hiệu quả ở *C. militaris* sẽ góp phần quan trọng trong việc thực hiện các nghiên cứu cải biến di truyền loài nấm dược liệu này. Trong nghiên cứu hiện tại, một chủng *C. militaris* thu thập tại Việt Nam được định danh chính xác về mặt phân loại dựa trên các đặc điểm hình thái và giải trình tự cùng ITS của rDNA. Chủng này được đặt tên là *C. militaris* G12 và được sử dụng để nghiên cứu chuyển gen. Chủng *C. militaris* G12 được đánh giá về mức độ miễn cảm với ba loại kháng sinh phổ biến dùng trong chuyển gen là hygromycin, nourseothricin và phleomycin. Kết quả cho thấy chủng *C. militaris* G12 chỉ bị ức chế bởi hygromycin ở nồng độ 200 µg/ml. Hiệu quả chuyển gen vào chủng *C. militaris* G12 nhờ vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* với marker chọn lọc là gen kháng hygromycin đạt trung bình 800 thể chuyển gen/10⁶ bào tử. Việc chuyển thành công gen chỉ thị *DsRed* và *GFP* vào hệ gen của *C. militaris* G12 đã được xác nhận bằng PCR với các cặp mồi đặc hiệu.

Từ khóa: chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*, *Cordyceps militaris*, marker kháng hygromycin, vector nhệ thể.

Chỉ số phân loại: 4.6

Đặt vấn đề

Cordyceps militaris là một loài nấm ký sinh, được sử dụng nhiều trong y học cổ truyền như một loại dược liệu quý. Có hơn 400 loài *Cordyceps* đã được tìm thấy và mô tả. Tuy nhiên chỉ một số loài nhất định được nuôi trồng phổ biến ở điều kiện nhân tạo để sản xuất sinh khối quả thể [1-3]. Nấm *C. militaris* đã được chứng minh là có khả năng kháng khuẩn, kháng nấm, kháng ung thư, kháng viêm, điều hòa miễn dịch, chống oxy hóa... [1-6]. Điều đó mở ra nhiều tiềm năng ứng dụng cho loài nấm này phục vụ chăm sóc sức khỏe con người. Gần đây, hai hợp chất có hoạt tính kháng ung thư là cordycepin và pentostatin do một nhóm các gen chuyên biệt chịu trách nhiệm sinh tổng hợp đã được phát hiện có mặt trong hệ gen của *C. militaris* [7]. Tuy nhiên, năng lực sinh tổng hợp các chất có lợi của các chủng tự nhiên thường tương đối thấp. Việc can thiệp vào hệ gen

nấm bằng kỹ thuật di truyền có thể giúp tăng hiệu suất sinh tổng hợp các chất có hoạt tính sinh học mong muốn. Một trong những phương pháp chuyển gen phổ biến hỗ trợ cho kỹ thuật chỉnh sửa hệ gen ở nấm là phương pháp chuyển thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. Phương pháp này đã được chứng minh là rất hiệu quả đối với nhiều loài nấm sợi khác nhau [8]. Cho đến nay, một số nghiên cứu về chuyển gen vào nấm *C. militaris* sử dụng vi khuẩn *A. tumefaciens* đã được thực hiện thành công ở Trung Quốc. Tuy nhiên, hiệu quả chuyển gen vào *C. militaris* chưa cao và còn tùy thuộc vào chủng nấm được sử dụng [9, 10]. Trong nghiên cứu này, chủng nấm *C. militaris* G12 phân lập tại Việt Nam được xác nhận chính xác về mặt phân loại để phục vụ cho nghiên cứu chuyển gen. Việc chuyển gen vào chủng *C. militaris* G12 đã thành công với phương pháp chuyển gen nhờ vi khuẩn *A. tumefaciens* sử dụng marker chọn lọc là gen kháng kháng sinh hygromycin.

* Tác giả liên hệ: Email: tuantran@vnu.edu.vn

Establishment of an *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer approach for the medicinal fungus *Cordyceps militaris* G12

Van Tuan Tran^{1,2*}, Xuan Tao Vu^{2,3}

¹Faculty of Biology, University of Science, Vietnam National University, Hanoi

²Key Laboratory of Enzyme and Protein Technology, University of Science, Vietnam National University, Hanoi

³Center of Experimental Biology, National Center for Technological Progress, Ministry of Science and Technology

Received 25 March 2020; accepted 29 April 2020

Abstract:

Cordyceps militaris is a valuable edible and medicinal mushroom, which has been demonstrated to possess beneficial ingredients such as adenosine, cordycepin, pentostatin, polysaccharides, and carotenoids. Therefore, this fungus represents a promising cell factory for investigating the molecular mechanism of fruiting body formation and biosynthesis of bioactive metabolites. The development of efficient transformation systems in *C. militaris* plays an important role in the genetic manipulation of this fungus. In the present study, a commercial strain of *C. militaris* isolated in Vietnam has been identified on the basis of morphological characteristics and the ITS (internal transcribed spacer) sequence of ribosomal DNA. This strain was designated as G12 and employed for the genetic transformation. Assays for antifungal sensitivity of the *C. militaris* G12 strain towards three antifungal compounds including hygromycin, nourseothricin, and phleomycin revealed that this *C. militaris* strain was inhibited only by hygromycin at the concentration of 200 µg/ml. Under optimised conditions for the genetic transformation of the strain G12 using the hygromycin resistance marker and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation method, the transformation efficiency could reach about 800 transformants per 10⁶ spores. Further, the transfer of the *DsRed* and *GFP* reporter genes into the genome of *C. militaris* G12 has been demonstrated to be successful by PCR analyses with the gene-specific primers.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, binary vectors, *Cordyceps militaris*, hygromycin resistance marker.

Classification number: 4.6

Vật liệu và phương pháp

Vật liệu nghiên cứu

Mẫu quả thể nấm (ký hiệu G12) thu thập từ cơ sở nuôi trồng nấm *C. militaris* ở Hà Nội được dùng để phân lập chủng nấm thuần khiết dùng cho nghiên cứu.

Vector nhị thể pPK2-Red [11] và pGreen2 [12] mang cấu trúc gen kháng hygromycin và gen chỉ thị *DsRed* hoặc *GFP* dưới sự điều hòa của promoter *gpdA* từ nấm *Aspergillus nidulans* được cung cấp bởi Phòng Genomic, Phòng thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.

Các cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu này được liệt kê chi tiết trong bảng 1.

Bảng 1. Các mồi sử dụng trong nghiên cứu.

Tên mồi	Trình tự (5'-3')	Kích thước sản phẩm (bp)	Nguồn tham khảo
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	~550	[13]
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC		
GFP-F	ATGGTGAGCAAGGGCGAG	720	[14]
GFP-R	TCACCTGTACAGCTCGTCCATGC		
DsRed-F	AACCTCGAGCACGTGCTTAAGGAT ATCATGGCCTCCTCCGAGG	729	[14]
DsRed-R	AAGGATCCCCGCGGAGCTCGAT ATCCTACAGGAACAGGTGGTGGC		
HPH-F	CCGGTGACTCTTTCTGGC	1890	[11]
HPH-R	CTATTCCTTGCCCTCGG		

Phân lập và quan sát hình thái

Tách 1 phần sợi quả thể nấm, làm sạch sơ bộ bằng nước cất và khử trùng bề mặt quả thể bằng cồn. Sau đó phân sợi quả thể được cắt bỏ ở hai đầu, phần giữa được cắt thành các lát nhỏ và đặt lên môi trường PDA (potatose dextrose agar) chứa chloramphenicol (100 µg/ml). Kháng sinh chloramphenicol có tác dụng ức chế sinh trưởng của vi khuẩn. Đĩa được ủ ở 23°C trong tối 5 ngày. Hệ sợi nấm màu trắng xuất hiện từ các lát quả thể được thuần khiết bằng phương pháp tách bào tử đơn và cấy chuyển sang đĩa môi trường PDA mới. Chủng thuần khiết được nuôi cấy trực tiếp trên tiêu bản hiển vi vô trùng có chứa môi trường PDA để quan sát hình thái của hệ sợi nấm và cuống sinh bào tử dưới kính hiển vi quang học [11].

Xác nhận chủng G12 bằng giải trình tự vùng ITS

Chủng nấm G12 được nuôi trong môi trường dịch thể PDB (potato dextrose broth) để thu hệ sợi dùng cho tách chiết DNA tổng số. Việc tách chiết DNA tổng số được thực hiện theo quy trình nhóm nghiên cứu đã công bố trước đây [14]. DNA tổng số được dùng làm khuôn để khuếch đại

vùng ITS của rDNA bằng PCR với cặp mồi đa năng ITS1/ITS4 (bảng 1). Sản phẩm PCR tinh sạch được giải trình tự bởi công ty 1st BASE (Singapore). Trình tự ITS được so sánh với dữ liệu trong Ngân hàng gen quốc tế (GenBank) sử dụng chương trình BLAST và phân tích vẽ cây phát sinh chủng loại bằng phần mềm MEGA7.

Đánh giá mức độ miễn cảm kháng sinh của chủng G12

Môi trường PDA được bổ sung kháng sinh hygromycin (50, 100, 150, 200 µg/ml), nourseothricin (50, 100, 200 và 300 µg/ml) hoặc phleomycin (50, 100, 200, 300 µg/ml). Nhỏ 10 µl dịch bào tử nấm (10^6 bào tử/ml) lên môi trường và đĩa được ủ ở 23°C trong 7 ngày. Nồng độ kháng sinh ức chế hoàn toàn sự sinh trưởng của chủng G12 sẽ được sử dụng để chuyển gen.

Chuyển gen và xác nhận các thể chuyển gen

Quy trình chuyển gen vào *C. militaris* G12 nhờ vi khuẩn *A. tumefaciens* được tiến hành theo Zheng và cộng sự (2011) [9] với sự điều chỉnh về thời gian đồng nuôi cấy là 2,5 ngày. Cụ thể như sau: vector nhũ thể pPK2-Red (hoặc pGreen2) được biến nạp vào chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* AGL1 bằng xung điện sử dụng hệ thống Bio-Rad Gene Pulse Xcell™ Electroporation System. Vi khuẩn *A. tumefaciens* AGL1 mang vector pPK2-Red được sử dụng cho chuyển gen vào *C. militaris* G12. Dịch vi khuẩn AGL1 được pha loãng và nuôi cấy trong môi trường có bổ sung acetosyringone (200 µM) để đạt mật độ quang (OD) khoảng 0,6-0,8. Vi khuẩn sau đó được trộn với bào tử nấm (10^6 bào tử/ml) theo tỷ lệ 1:1 và được trải đều lên màng giấy lọc cellulose phủ sẵn trên đĩa môi trường cấy ứng. Đĩa được ủ trong tối ở 23°C trong 2,5 ngày để kích hoạt quá trình chuyển gen từ *A. tumefaciens* sang chủng *C. militaris* G12. Màng giấy lọc sau đó được chuyển sang môi trường PDA có bổ sung kháng sinh hygromycin (200 µg/ml) để chọn lọc các khuẩn lạc nấm chuyển gen và bổ sung kháng sinh cefotaxime (300 µg/ml) để diệt vi khuẩn *A. tumefaciens*. Đĩa được ủ ở nhiệt độ 23-25°C trong 7 ngày.

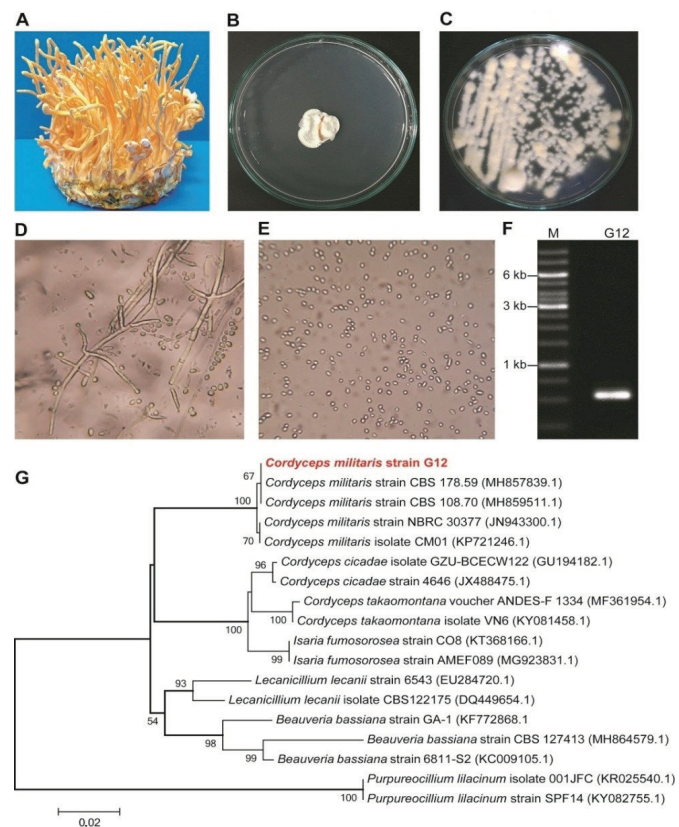
Các thể chuyển gen sau đó được thuần khiết và DNA tổng số được tách chiết phục vụ cho xác nhận thể chuyển gen bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu HPH-F/HPH-R và DsRed-F/DsRed-R hoặc GFP-F/GFP-R (bảng 1).

Kết quả và thảo luận

Chủng G12 được xác nhận thuộc loài *C. militaris*

Từ mẫu quả thể (hình 1A), chủng G12 đã được phân lập ở dạng thuần khiết. Sau 5 ngày nuôi cấy trên môi trường PDA, chủng nấm sinh trưởng tạo hệ sợi màu trắng. Quan sát dưới kính hiển vi, hệ sợi bao gồm cấu trúc phân đốt bởi các vách ngăn (hình 1B, C, D). Sau 7 ngày nuôi cấy, chủng G12 hình thành bào tử dạng trứng (hình 1E). Dựa

trên mẫu quả thể màu vàng điển hình và các đặc điểm hình thái quan sát được có thể khẳng định chủng G12 thuộc chi *Cordyceps* [15, 16]. Để đảm bảo độ chính xác của chủng G12 dùng cho nghiên cứu chuyển gen, chúng tôi tiến hành giải trình tự vùng ITS của rDNA. So với các gen 18S rRNA và 28S rRNA của rDNA thì vùng ITS (gồm ITS1; 5,8S rRNA; ITS2) ở nấm có mức độ biến đổi cao hơn giữa các loài có quan hệ gần gũi với nhau. Do đó, vùng trình tự này được sử dụng phổ biến trong phân loại nấm [17]. Khuếch đại vùng ITS với cặp mồi ITS1/ITS4 (bảng 1) từ DNA tổng số của chủng G12 chỉ cho một băng DNA duy nhất với kích thước khoảng 550 bp (hình 1F). Trình tự ITS của chủng G12 tương đồng 100% với các trình tự ITS của *C. militaris* có trong cơ sở dữ liệu GenBank. Phân tích mô phỏng cây phát sinh chủng loại với phần mềm MEGA7 xác nhận chủng thuộc loài *C. militaris* (hình 1G).

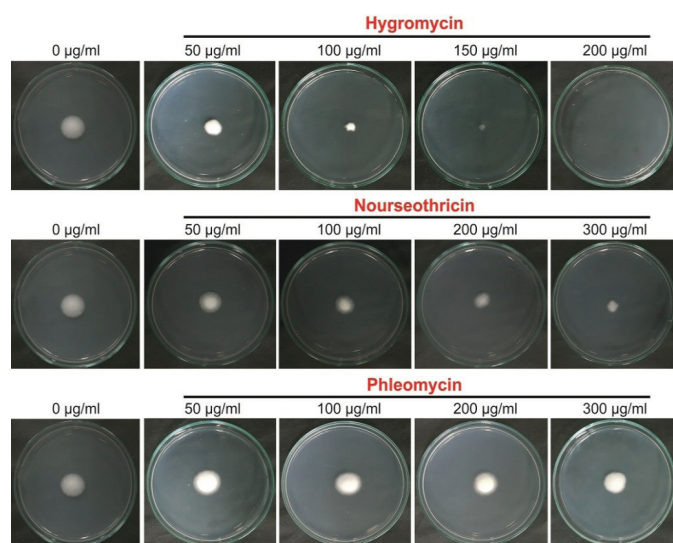


Hình 1. Phân lập và định danh chủng *C. militaris* G12. (A) Quả thể nấm; (B, C) Chủng G12 trên môi trường PDA; (D, E) Cấu trúc hệ sợi và bào tử; (F, G) Phân tích phát sinh chủng loại chủng G12 dựa trên trình tự ITS của rDNA.

Chủng *C. militaris* G12 miễn cảm với kháng sinh hygromycin

Để lựa chọn được loại kháng sinh cũng như nồng độ kháng sinh thích hợp sử dụng trong sàng lọc các thể chuyển gen, chủng *C. militaris* G12 được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung kháng sinh hygromycin, nourseothricin hoặc

phleomycin với các nồng độ khác nhau. Cả ba kháng sinh này đều là những kháng sinh được sử dụng phổ biến trong nghiên cứu chuyển gen ở nấm [8, 9, 11, 12, 18, 19]. Sau 7 ngày nuôi ở nhiệt độ 25°C, chủng *C. militaris* G12 kháng với nourseothricin và phleomycin ở các nồng độ tương đối cao là 50, 100, 200 và 300 µg/ml. Tuy nhiên, sự sinh trưởng của chủng G12 bị ức chế hoàn toàn bởi hygromycin ở nồng độ 200 µg/ml (hình 2). Các nghiên cứu gần đây cho thấy nhiều chủng thuộc loài *C. militaris* kháng với kháng sinh hygromycin, nhưng một số chủng lại mẫn cảm với hygromycin [9, 10]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi chỉ ra rằng chủng *C. militaris* G12 mẫn cảm với hygromycin ở nồng độ 200 µg/ml và kháng sinh này phù hợp để sử dụng cho các thí nghiệm chuyển gen vào chủng G12.

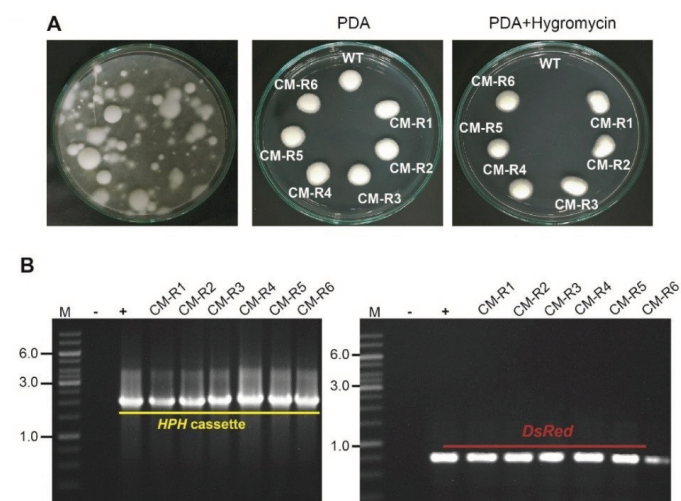


Hình 2. Khả năng mẫn cảm kháng sinh của chủng *C. militaris* G12.

Chuyển gen vào chủng *C. militaris* G12 sử dụng vi khuẩn *A. tumefaciens*

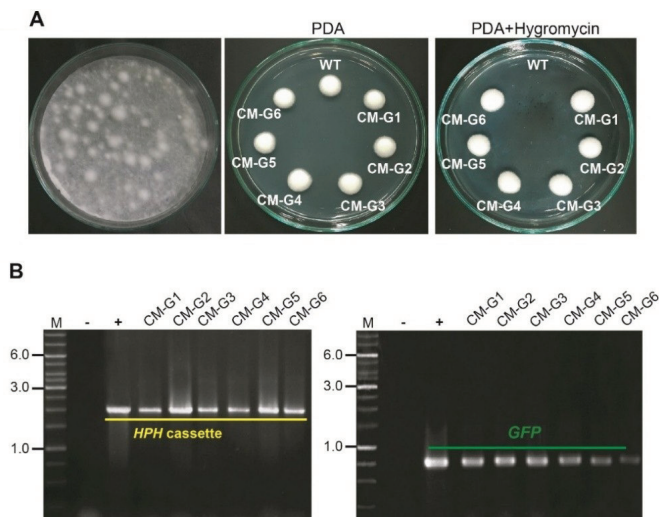
Để thử nghiệm chuyển gen vào chủng G12 nhờ *A. tumefaciens*, vector nhị thể pPK2-Red được sử dụng. Sau quy trình chuyển gen, chúng tôi đã thu được rất nhiều khuẩn lạc xuất hiện trên môi trường chọn lọc PDA có bổ sung kháng sinh hygromycin (hình 3A). Sáu khuẩn lạc ngẫu nhiên (ký hiệu CM-R1 đến CM-R6) được chọn để thuần khiết, xác nhận lại khả năng kháng hygromycin. DNA tổng số của 6 chủng được tách chiết để dùng cho PCR xác nhận sự chuyển gen thành công. Hai cặp mồi HPH-R/HPH-F đặc hiệu cho gen kháng hygromycin và DsRed-F/DsRed-R đặc hiệu cho gen chỉ thị *DsRed* (bảng 1) được sử dụng cho PCR. Kết quả nuôi cấy trên môi trường chọn lọc xác nhận cả 6 chủng chuyển gen đều kháng với hygromycin (hình 3A). Thêm vào đó, kết quả PCR cũng chỉ ra rằng gen kháng hygromycin là *HPH* và gen chỉ thị *DsRed* từ vi khuẩn *A. tumefaciens* đã được chuyển và tích hợp thành công vào

hệ gen của cả 6 chủng với sự xuất hiện của các băng DNA có kích thước tương ứng (hình 3B). Như vậy, chúng tôi đã thành công trong việc chuyển gen vào chủng *C. militaris* G12 sử dụng vi khuẩn *A. tumefaciens* với marker chọn lọc là gen kháng hygromycin. Hiệu quả chuyển gen trong nghiên cứu này đạt trung bình 800 thể chuyển gen cho 10^6 bào tử và cao hơn 1,3 lần so với công bố của Zheng và cộng sự (2011) [9]. Kết quả đạt được cao hơn nghiên cứu trước đây có thể là do thời gian đồng nuôi cấy trong quy trình chuyển gen này kéo dài hơn 0,5 ngày và chủng G12 có lẽ cho hiệu quả chuyển gen tốt hơn. Một ưu điểm nữa của chủng G12 là nồng độ hygromycin sử dụng cho chuyển gen thấp hơn 2 lần so với chủng *C. militaris* JM4 trong nghiên cứu của Zheng và cộng sự (2011).



Hình 3. Xác nhận thể chuyển gen *DsRed*. (A) Kết quả chuyển gen *DsRed* vào chủng *C. militaris* G12 sử dụng vi khuẩn *A. tumefaciens*; (B) Xác nhận chuyển gen thành công bằng PCR với cặp mồi HPH-R/HPH-F và DsRed-F/DsRed-R, trong đó (-) là đối chứng âm, (+) là đối chứng dương.

Kết quả tương tự cũng nhận được khi thực hiện chuyển gen *GFP* vào chủng *C. militaris* G12 sử dụng vector nhị thể pGreen2 (hình 4A). Các chủng (ký hiệu CM-G1 đến CM-G6) được xác nhận chuyển gen thành công bằng PCR sử dụng cặp mồi HPH-F/HPH-R và GFP-F/GFP-R. Kết quả chỉ ra rằng, cả 6 chủng chuyển gen được lựa chọn ngẫu nhiên đều xuất hiện 2 băng DNA tương ứng với gen kháng hygromycin *HPH* và gen chỉ thị *GFP* (hình 4B). Như vậy, kết quả đã khẳng định việc chuyển gen thành công vào chủng *C. militaris* G12 khi sử dụng gen kháng kháng sinh hygromycin. Mô hình chuyển gen thiết lập cho chủng *C. militaris* G12 có nguồn gốc Việt Nam sẽ là cơ sở quan trọng hỗ trợ cho các nghiên cứu tiếp theo nhằm kích hoạt khả năng sinh tổng hợp các hoạt chất có lợi ở loài nấm được liệu quan trọng này.



Hình 4. Xác nhận thể chuyển gen GFP. (A) Kết quả chuyển gen GFP vào chủng *C. militaris* G12 sử dụng vi khuẩn *A. tumefaciens*; (B) Xác nhận chuyển gen thành công bằng PCR với cặp mồi HPH-F/HPH-R và GFP-F/GFP-R.

KẾT LUẬN

Chủng G12 phân lập tại Việt Nam được xác nhận chính xác thuộc loài *Cordyceps militaris* dựa trên đặc điểm hình thái và giải trình tự vùng ITS của rDNA. Chủng *C. militaris* G12 bị ức chế hoàn toàn bởi kháng sinh hygromycin ở nồng độ 200 µg/ml và không mẫn cảm với kháng sinh nourseothricin và phleomycin. Nghiên cứu này đã chứng minh việc chuyển gen thành công vào chủng G12 có nguồn gốc Việt Nam nhờ vi khuẩn *A. tumefaciens* với marker chọn lọc là gen kháng hygromycin. Hiệu quả chuyển gen vào chủng *C. militaris* G12 đạt trung bình 800 thể chuyển gen/10⁶ bào tử.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được hỗ trợ kinh phí bởi Đại học Quốc gia Hà Nội thông qua đề tài mã số QG.20.19 “Nghiên cứu phát triển công nghệ mới để lai tạo, phục hồi và duy trì các chủng nấm dược liệu *Cordyceps militaris* có hiệu suất cao về hình thành quả thể và sinh tổng hợp cordycepin”. Các tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] S.K. Das, M. Masuda, A. Sakurai, M. Sakakibara (2010), “Medicinal uses of the mushroom *Cordyceps militaris*: current state and prospects”, *Fitoterapia*, **81**(8), pp.961-968.
- [2] R.R. Paterson (2008), “*Cordyceps*: a traditional Chinese medicine and another fungal therapeutic biofactory?”, *Phytochemistry*, **69**(7), pp.1469-1495.
- [3] B. Shrestha, S.K. Han, W.H. Lee, S.K. Choi, J.O. Lee, J.M. Sung (2005), “Distribution and *in vitro* fruiting of *Cordyceps militaris* in Korea”, *Mycobiology*, **33**(4), pp.178-181.
- [4] K. Yue, M. Ye, Z. Zhou, W. Sun, X. Lin (2013), “The genus *Cordyceps*: a chemical and pharmacological review”, *Journal of Pharmacy and*

Pharmacology, **65**(4), pp.474-493.

- [5] Y. Ohta, J.B. Lee, K. Hayashi, A. Fujita, D.K. Park, T. Hayashi (2007), “*In vivo* anti-influenza virus activity of an immunomodulatory acidic polysaccharide isolated from *Cordyceps militaris* grown on germinated soybeans”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**(25), pp.10194-10199.

- [6] P. Qin, X. Li, H. Yang, Z.Y. Wang, D. Lu (2019), “Therapeutic potential and biological applications of *Cordycepin* and metabolic mechanisms in *Cordycepin*-producing fungi”, *Molecules*, **24**(12), pp. 2231.

- [7] Y. Xia, F. Luo, Y. Shang, P. Chen, Y. Lu, C. Wang (2017), “Fungal cordycepin biosynthesis is coupled with the production of the safeguard molecule pentostatin”, *Cell Chemical Biology*, **24**(12), pp.1479-1489.

- [8] C.B. Michielse, P.J. Hooykaas, C.A. van den Hondel, A.F. Ram (2005), “*Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi”, *Current Genetics*, **48**(1), pp.1-17.

- [9] Z. Zheng, C. Huang, L. Cao, C. Xie, R. Han (2011), “*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in medicinal fungus *Cordyceps militaris*”, *Fungal Biology*, **115**(3), pp.265-274.

- [10] B.X. Chen, T. Wei, Z.W. Ye, F. Yun, L.Z. Kang, H.B. Tang, L.Q. Guo, J.F. Lin (2018), “Efficient CRISPR-Cas9 gene disruption system in edible-medicinal mushroom *Cordyceps militaris*”, *Frontiers in Microbiology*, **9**, pp.1157.

- [11] T.X. Vu, T.T. Ngo, L.T.D. Mai, T.T. Bui, D.H. Le, H.T.V. Bui, H.Q. Nguyen, B.X. Ngo, V.T. Tran (2018), “A highly efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system for the postharvest pathogen *Penicillium digitatum* using *DsRed* and *GFP* to visualize citrus host colonization”, *Journal of Microbiological Methods*, **144**, pp.134-144.

- [12] V.T. Tran, S.A. Braus-Stromeier, H. Kusch, M. Reusche, A. Kaever, A. Kühn, O. Valerius, M. Landesfeind, K. Aßhauer, M. Tech, K. Hoff, T. Pena-Centeno, M. Stanke, V. Lipka, G.H. Braus (2014), “*Verticillium* transcription activator of adhesion Vta2 suppresses microsclerotia formation and is required for systemic infection of plant roots”, *New Phytologist*, **202**(2), pp.565-581.

- [13] T.J. White, T. Bruns, S.J.W.T. Lee, J. Taylor (1990), “Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics”, *PCR protocols: a guide to methods and applications*, **18**(1), pp.315-322.

- [14] K.T. Nguyen, Q.N. Ho, T.H. Pham, T.N. Phan, V.T. Tran (2016), “The construction and use of versatile binary vectors carrying *pyrG* auxotrophic marker and fluorescent reporter genes for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Aspergillus oryzae*”, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **32**(12), pp.204-212.

- [15] H.L. Barnett, B.B. Hunter (1972), *Illustrated genera of imperfect fungi*, Publishing Company.

- [16] J.J. Luangsa-ard, K. Tasanathai, S. Mongkolsamrit, N.L. Hywel-Jones (2008), *Atlas of invertebrate-pathogenic fungi of Thailand*, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Thailand.

- [17] J. Curran, F. Driver, J.W.O. Ballard, R.J. Milner (1994), “Phylogeny of *Metarhizium*: analysis of ribosomal DNA sequence data”, *Mycological Research*, **98**(5), pp.547-552.

- [18] M.J. De Groot, P. Bundock, P.J. Hooykaas, A.G. Beijersbergen (1998), “*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi”, *Nature Biotechnology*, **16**(9), pp.839-842.

- [19] P.J. Punt, C.A. van den Hondel (1992), “Transformation of filamentous fungi based on hygromycin B and phleomycin resistance markers”, *Methods in Enzymology*, **216**, pp.447-457.