

Nghiên cứu xác định gen giới tính *MAT*, năng suất và hàm lượng cordycepin của một số chủng nấm dược liệu *Cordyceps militaris* đang được nuôi trồng tại Việt Nam

Vũ Xuân Tạo^{1*}, Trần Bảo Trâm¹, Nguyễn Thị Mến^{1,2}, Trương Thị Chiên¹, Trần Bình Minh¹,
Thái Hạnh Dung², Trần Văn Tuấn², Nguyễn Quang Huy²

¹Trung tâm Sinh học Thực nghiệm, Viện Ứng dụng Công nghệ, C6, khu tập thể Thanh Xuân Bắc, quận Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

²Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 334 Nguyễn Trãi, phường Thanh Xuân Trung, quận Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 9/5/2022; ngày chuyển phản biện 13/5/2022; ngày nhận phản biện 24/6/2022; ngày chấp nhận đăng 28/6/2022

Tóm tắt:

Cordyceps militaris là một loài nấm dược liệu quý và đang được nuôi trồng với quy mô lớn tại Việt Nam. Tuy nhiên, việc nuôi trồng loài nấm này đang gặp các vấn đề về thoái hóa giống làm giảm năng suất và hàm lượng hoạt chất cordycepin trong quả thể. Hệ thống gen giới tính *MAT* giữ vai trò quan trọng trong việc hình thành quả thể ở nấm *C. militaris*. Các dữ liệu về gen giới tính *MAT* và năng suất, chất lượng của các chủng nấm *C. militaris* đang được nuôi trồng tại Việt Nam là cơ sở quan trọng cho việc nghiên cứu và đưa ra các giải pháp khắc phục vấn đề thoái hóa giống. Nghiên cứu này đã phân lập và định danh được 8 chủng nấm *C. militaris* từ các mẫu quả thể nấm được nuôi trồng tại Việt Nam dựa trên đặc điểm hình thái và trình tự vùng ITS của rDNA. 8 chủng nấm đã được xác định gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1*, cụ thể: 5 chủng nấm (QN6, HL11, HL12, TN01 và TN02) mang cả 2 gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1*, 3 chủng nấm (SH03, HL13 và HN01) chỉ mang gen giới tính *MAT1-1-1*. Cả 8 chủng nấm đều có khả năng hình thành quả thể, trong đó chủng *C. militaris* SH03 mang gen giới tính đơn (*MAT1-1-1*) cho năng suất và chất lượng cao nhất (năng suất quả thể tươi trung bình đạt 31 g/hộp, năng suất sinh học đạt 13,77% và hàm lượng cordycepin đạt 12,5 mg/g quả thể khô), có tiềm năng ứng dụng trong sản xuất.

Từ khóa: Cordycepin, *Cordyceps militaris*, *MAT1-1-1*, *MAT1-2-1*, năng suất.

Chỉ số phân loại: 4.6

1. Đặt vấn đề

Các loài nấm thuộc chi *Cordyceps* đã được biết đến từ rất lâu như một loại dược liệu quan trọng trong y dược truyền thống của Trung Quốc nói riêng và một số nước châu Á nói chung [1, 2]. Mặc dù hơn 400 loài nấm *Cordyceps* đã được mô tả, nhưng chỉ có khoảng 36 loài đã được nuôi trồng quả thể thành công [3]. Loài nấm được biết đến đầu tiên trong chi nấm này là *C. sinensis*. Tuy nhiên, loài nấm được nuôi trồng thương mại phổ biến hiện nay lại là *C. militaris*. Quả thể loài nấm này thường có màu vàng cam, dễ dàng nuôi cấy nhân tạo và chúng được coi là nguồn thay thế cho nấm *C. sinensis* do có thành phần hóa học và dược chất tương tự [4, 5]. Hiện nay, quả thể loài *C. militaris* được nuôi trồng nhân tạo với quy mô công nghiệp ở nhiều nước châu Á như Trung Quốc, Hàn Quốc, Thái Lan, Việt Nam... đem lại lợi ích lớn về kinh tế.

Thời gian gần đây, cơ chế phân tử của quá trình hình thành quả thể và thoái hóa giống ở nấm *C. militaris* đang được quan tâm nghiên cứu. Quả thể của nấm *C. militaris* được hình thành theo cơ chế chính là sinh sản hữu tính và được điều hòa bởi hệ thống gen giới tính *MAT*. Liên quan đến hệ thống gen giới tính, những nghiên cứu về sinh học phân tử đã chứng minh các gen giới tính ở *C. militaris* bao gồm *MAT1-1* và *MAT1-2* [6]. Locus giao phối *MAT1-1* bao gồm *MAT1-1-1* và *MAT1-1-2*, còn ở locus *MAT1-2* thì chỉ có *MAT1-2-1*, trong đó 2 gen *MAT1-1-1*

và *MAT1-2-1* được xác định giữ vai trò quan trọng trong sự hình thành quả thể [7]. Biến dị di truyền dường như phổ biến ở *C. militaris* và có thể có liên quan tới sự mất ổn định hệ thống giao phối thông qua sự tái tổ hợp các gen giới tính nêu trên [8]. Điều này có thể là nguyên nhân dẫn đến thoái hóa giống trong nuôi cấy quả thể quy mô lớn. Vấn đề thoái hóa giống đang gây nhiều khó khăn cho việc sản xuất nấm *C. militaris* quy mô công nghiệp. Sự thoái hóa được biểu hiện là sự giảm năng suất quả thể, thay đổi về hình dạng và kích thước quả thể, cũng như giảm hàm lượng các hoạt chất mong muốn. Sự thoái hóa giống ở nấm *C. militaris* được xác định có liên quan đến nhiều yếu tố, trong đó hệ thống gen giới tính *MAT* được ghi nhận giữ vai trò quan trọng [9, 10].

Ở Việt Nam, việc nuôi trồng nhân tạo *C. militaris* đang khá phát triển với nhiều cơ sở sản xuất cung ứng cho thị trường trong và ngoài nước. Các nghiên cứu chủ yếu tập trung vào việc tối ưu điều kiện nuôi trồng, phát triển các sản phẩm chăm sóc sức khỏe từ nguồn nấm này. Tuy nhiên, việc nuôi trồng nấm *C. militaris* đang phải đối mặt với sự thoái hóa nghiêm trọng của các chủng giống, dẫn đến giảm hoặc mất khả năng hình thành quả thể và làm giảm năng suất. Hơn nữa, vấn đề chất lượng nguồn nấm này tại Việt Nam vẫn chưa được đánh giá chi tiết. Nghiên cứu này tập trung xác định gen giới tính *MAT*, năng suất quả thể và hàm lượng cordycepin của một số

*Tác giả liên hệ: Email: taovx.tsa@gmail.com

Identification of mating-type (*MAT*) gene, productivity and cordycepin content in medicinal *Cordyceps militaris* strains cultivated in Vietnam

Xuan Tao Vu^{1*}, Bao Tram Tran¹, Thi Men Nguyen^{1,2},
Thi Chien Truong¹, Binh Minh Tran¹,
Hanh Dung Thai², Van Tuan Tran², Quang Huy Nguyen²

¹Center of Experimental Biology, National Center for Technological Progress,
C6 Thanh Xuan Bac Apartment Complex, Thanh Xuan District, Hanoi, Vietnam

²Faculty of Biology, University of Science, Vietnam National University - Hanoi,
334 Nguyen Trãi Street, Thanh Xuan Trung Ward, Thanh Xuan District, Hanoi, Vietnam

Received 9 May 2022; revised 24 June 2022; accepted 28 June 2022

Abstract:

Cordyceps militaris is a valuable medicinal fungus and has been widely cultivated. However, its frequent degeneration during continuous maintenance in culture leads to a dramatic reduction in productivity and cordycepin content in the fruiting body. Mating-type (*MAT*) genes play an important role in the formation of the fruiting body in *C. militaris*. The data of *MAT* genes, the productivity and quality of *C. militaris* strains being cultivated in Vietnam are the foundations for providing solutions to overcome the problem. In this study, eight strains were isolated and identified based on morphological characteristics and the ITS sequence of rDNA. *MAT1-1-1* and *MAT1-2-1* genes were determined in the 8 isolates, including 5 strains (QN6, HL11, HL12, TN01, and TN02) that possessed both *MAT1-1-1* and *MAT1-2-1* genes and the others (SH03, HL13, and HN01) has only *MAT1-1-1* gene. All identified strains were able to form a fruiting body, especially, the SH03 strain performed the highest productivity and quality (fruiting body yield 31 g/box, biological efficiency 13.77% and cordycepin content 12.5 mg/g dried fruiting body). This fungal strain with a single mating-type gene is a promising candidate for applying to *C. militaris* production.

Keywords: Cordycepin, *Cordyceps militaris*, *MAT1-1-1*, *MAT1-2-1*, productivity.

Classification number: 4.6

chúng nấm được liệu *C. militaris* đang được nuôi trồng tại Việt Nam làm căn cứ cho các nghiên cứu tiếp theo về việc xây dựng giải pháp công nghệ giúp giải quyết vấn đề hàm lượng hoạt chất và thoái hóa giống ở loài nấm này.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Các mẫu quả thể nấm *C. militaris* được thu thập tại các đơn vị nuôi trồng thương mại nấm *C. militaris* tại Hà Nội, Bắc Ninh, Thái Nguyên và Quảng Ngãi (8 mẫu quả thể được ký hiệu: QN6, SH03, HL11, HL12, HL13, TN01, TN02 và HN01). Các mẫu được giữ nguyên trạng và đựng trong các túi nilon sạch. Sau khi thu thập, mẫu được đưa ngay về phòng thí nghiệm để phân lập các chủng nấm. Các chủng nấm đang được lưu giữ tại Phòng thí nghiệm của Trung tâm Sinh học Thực nghiệm, Viện Ứng dụng Công nghệ.

Các cặp mồi đặc hiệu dùng cho phản ứng PCR sử dụng trong nghiên cứu này được liệt kê ở bảng 1.

Bảng 1. Các mồi đặc hiệu sử dụng trong nghiên cứu.

Tên mồi	Trình tự (5'-3')	Kích thước sản phẩm (bp)	Nguồn tham khảo
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	550	[11]
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC		
MAT1-1-1-F	ATGGAACACAGATCGAGCGACAC	457	[12]
MAT1-1-1-R	ATATACCTTCGCGATCATTGCCAG		
MAT1-2-1-F	TGTTTGT CGCGATGGTTCTGG	368	[12]
MAT1-2-1-R	CCTCTGGAGGTTCTGCATTCCA		

2.2. Phương pháp phân lập chủng nấm *C. militaris* từ mẫu quả thể

Một phần quả thể từ mẫu quả thể nấm thu thập được tách ra và tiến hành khử trùng bề mặt bằng nước cất vô trùng và cồn. Sau khi khử trùng bề mặt, phần quả thể được cắt thành các lát nhỏ và đặt lên bề mặt môi trường PDA (Potatose dextrose agar) có bổ sung kháng sinh kháng khuẩn chloramphenicol với nồng độ 100 µg/ml. Địa môi trường chứa mẫu quả thể được ủ ở 22-25°C trong điều kiện tối hoàn toàn. Sau 3 ngày, từ các lát quả thể xuất hiện hệ sợi nấm màu trắng, hệ sợi nấm tiếp tục được cấy chuyển sang đĩa môi trường PDA mới để thuần khiết [13].

2.3. Xác nhận các chủng nấm phân lập bằng giải trình tự vùng ITS của rDNA

Các chủng nấm sau khi phân lập được nuôi trong môi trường PDB (lắc 200 vòng/phút ở 22-25°C trong tối), sau 3-4 ngày tiến hành thu hệ sợi nấm sử dụng cho việc tách chiết DNA tổng số. Quy trình tách chiết DNA tổng số từ hệ sợi nấm được thực hiện theo quy trình của nhóm nghiên cứu đã công bố [14]. Mẫu DNA tổng số được sử dụng cho phản ứng PCR khuếch đại vùng ITS của rDNA sử dụng cặp mồi đặc hiệu ITS1/ITS4 (bảng 1). Sản phẩm PCR sau khi được kiểm tra bằng cách điện di trên gel agarose 0,7% sẽ được tinh sạch sử dụng bộ kit tinh sạch của Hãng Promega. Sản phẩm sau tinh sạch được giải trình tự bởi

Công ty 1st BASE (Singapore). Sử dụng chương trình BLAST để so sánh trình tự ITS thu được với dữ liệu trong Ngân hàng gen quốc tế (GenBank). Phân tích và vẽ cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự ITS sử dụng phần mềm MEGA7.

2.4. Xác định gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1* ở các chủng nấm được liệu *C. militaris*

DNA tổng số của 8 chủng nấm phân lập được sử dụng cho phản ứng PCR khuếch đại gen *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1* sử dụng cặp mồi đặc hiệu tương ứng là MAT1-1-1-F/MAT1-1-1-R và MAT1-2-1-F/MAT1-2-1-R (bảng 1). Xác định gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1* ở các chủng nấm được liệu *C. militaris* dựa trên kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 0,7%.

2.5. Đánh giá khả năng hình thành quả thể và năng suất quả thể của các chủng nấm

Để đánh giá khả năng hình thành quả thể và năng suất quả thể của các chủng nấm *C. militaris* phân lập được, các chủng nấm được nuôi trồng dựa theo quy trình của N. Kang và cs (2017) [12] có cải tiến. Các chủng giống được nuôi trên môi trường PDA ở 25°C sau 5-7 ngày để hệ sợi nấm phát triển. Cắt 2-3 cm² hệ sợi nấm trên môi trường PDA chuyển vào bình nuôi giống lồng chứa 500 ml môi trường PDB có bổ sung 0,1% pepton. Giống lồng được nuôi lắc 150 vòng/phút trong 3 ngày trong tối ở 22-25°C. 4-5 ml dịch giống được cấy đều lên bề mặt giá thể đựng trong hộp nhựa hình trụ có thể tích 650 ml. Thành phần giá thể trong 1 hộp nuôi (hộp nhựa trong hình trụ có thể tích 650 ml) gồm: 30 g gạo lứt huyết rồng và 60 ml dịch dinh dưỡng. Thành phần 1 l dịch dinh dưỡng gồm: dịch chiết 200 g khoai tây, 15 g glucose, 15 g sucrose, 1 g MgSO₄, 1 g KH₂PO₄, 1 g pepton, 100 g nhộng tằm. Giá thể sau khi cấy giống được đặt trong tối 5-7 ngày, ở 22-25°C để hệ sợi nấm phát triển toàn bộ bề mặt giá thể. Sau đó, hộp nuôi nấm được chuyển ra nuôi trong điều kiện chiếu sáng 12 giờ/ngày (500-700 lux) ở 22-23°C, độ ẩm 85-90% trong 60 ngày. Chỉ tiêu theo dõi gồm: khối lượng quả thể tươi/hộp nuôi thể tích 650 ml và năng suất sinh học (Biological efficiency - BE). Năng suất sinh học được xác định theo B. Shrestha và cs (2012) [15] như sau:

$$BE (\%) = (\text{khối lượng quả thể khô} / \text{khối lượng cơ chất}) \times 100$$

2.6. Xác định hàm lượng cordycepin bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)

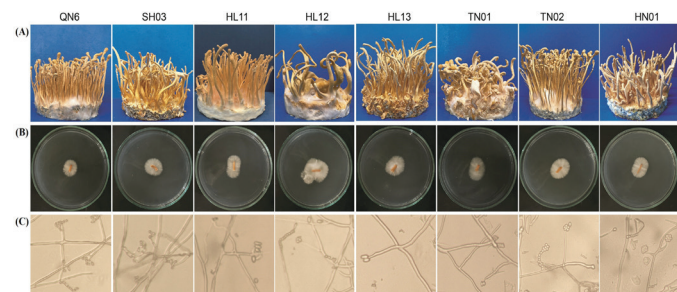
Mẫu quả thể tươi sau khi nuôi cấy 65 ngày được thu và sấy khô bằng máy sấy thăng hoa ở -40°C tới khi độ ẩm đạt 5-7%. Hàm lượng cordycepin được xác định theo L. Huang và cs (2009) [5]. Cân chính xác 0,2 g mẫu quả thể (đã xay nhỏ), chuyển vào bình nón (50 ml), thêm 10 ml methanol 80%, cân xác định khối lượng ban đầu, tiến hành chiết hồi lưu trong 30 phút, sau đó để yên ở nhiệt độ phòng, bổ sung khối lượng đã mất bằng methanol 80%. Dịch chiết được lọc qua màng cellulose acetat 0,45 µm để thu được dung dịch mẫu dùng cho phân tích HPLC. Sử dụng hệ thống thống HPLC (Hãng Shimadzu, Nhật Bản) gồm: bơm LC 20AD, Detector SPD 20A, bộ tiêm mẫu tự

động SIL-20A HT. Sử dụng cột C18 của Hãng Agilent, kích thước cột là 250x4,6 mm, kích thước hạt 5 µm. Tốc độ rửa giải là 0,5 ml/phút. Detector UV được đặt quan sát tại bước sóng 260 nm. Thể tích tiêm mẫu vào cột là 10 µl. Pha động gồm 2 dung môi là nước và acetonitril.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Phân lập và xác nhận các chủng *C. militaris* bằng giải trình tự vùng ITS của rDNA

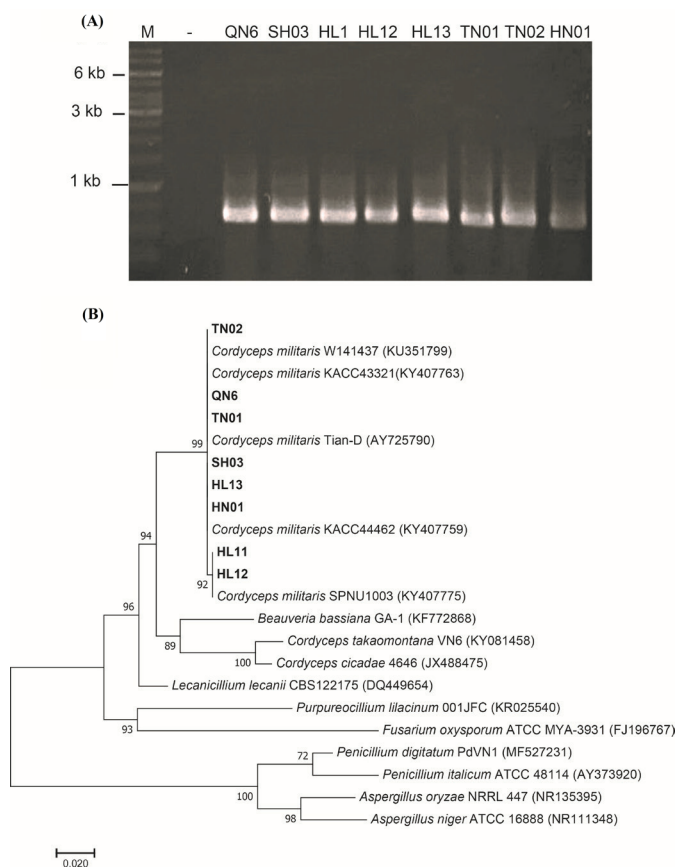
Trong nghiên cứu này, 8 mẫu quả thể nấm đã được thu thập từ các xưởng nuôi trồng nấm tại Hà Nội, Bắc Ninh, Thái Nguyên và Quảng Ngãi, bao gồm các mẫu quả thể được ký hiệu là QN6, SH03, HL11, HL12, HL13, TN01, TN02 và HN01 (hình 1A). Các chủng nấm được phân lập từ một phần quả thể. Sau 3 ngày nuôi cấy trên môi trường PDA ở điều kiện nhiệt độ 22-25°C trong tối hoàn toàn, các chủng nấm đã sinh trưởng tạo hệ sợi màu trắng (hình 1B). Quan sát hệ sợi dưới kính hiển vi cho thấy, hệ sợi nấm phát triển kéo dài, trên hệ sợi hình thành cấu trúc cuống sinh bào tử, bào tử hình thành tách ra có dạng hình trứng (hình 1C). Dựa trên hình thái mẫu quả thể thu thập, các đặc điểm về hệ sợi và cấu trúc sinh bào tử cho thấy đây là những đặc điểm điển hình của loài nấm *C. militaris* [7, 16].



Hình 1. Phân lập các chủng nấm từ các mẫu quả thể *C. militaris* đang được nuôi trồng tại Việt Nam. (A) Các mẫu quả thể nấm thu thập; (B) Phân lập chủng nấm từ một phần quả thể; (C) Cấu trúc hệ sợi và cuống sinh bào tử.

Để đảm bảo độ chính xác của các chủng nấm đã phân lập dùng cho các nghiên cứu tiếp theo, chúng tôi tiến hành giải trình tự vùng ITS của 8 chủng nấm đã phân lập. Trong phân loại nấm, trình tự vùng ITS thường được sử dụng nhiều hơn so với các gen 18S rRNA và 28S rRNA do vùng trình tự này (gồm ITS1, 5,8S rRNA, ITS2) có sự biến đổi cao hơn giữa các loài nấm có quan hệ gần gũi [17]. DNA tổng số của 8 chủng nấm (QN6, SH03, HL11, HL12, HL13, TN01, TN02 và HN01) được sử dụng cho phản ứng PCR khuếch đại vùng ITS sử dụng cặp mồi đặc hiệu ITS1/ITS4 (bảng 1). Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR cho một băng DNA duy nhất có kích thước khoảng 550 bp (hình 2A). Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng kit tinh sạch của Hãng Promega và được giải trình tự bởi Công ty 1st BASE (Singapore). Sử dụng chương trình BLAST so sánh trình tự ITS của 8 chủng nấm trong nghiên cứu này cho thấy, các trình tự thu được tương đồng 99-100% với các trình tự ITS của nấm *C. militaris* có trong cơ sở dữ liệu GenBank. Phân

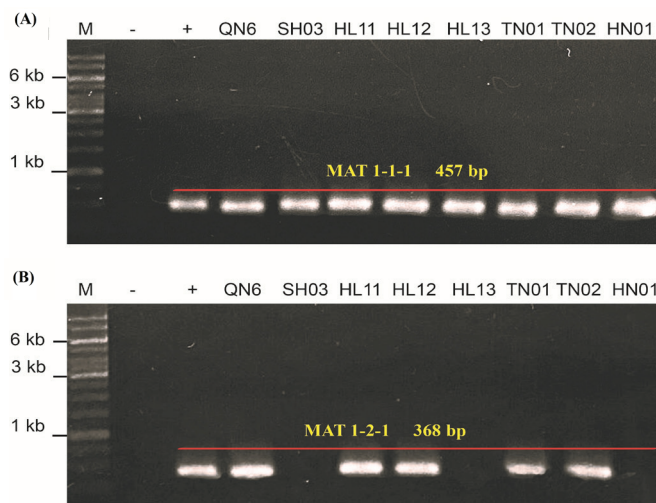
tích và xây dựng cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự ITS với phần mềm MEGA7 xác nhận cả 8 chủng nấm đã phân lập đều thuộc loài *C. militaris* (hình 2B).



Hình 2. Định danh các chủng nấm phân lập dựa trên trình tự vùng ITS của rDNA. (A) Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR vùng ITS; **(B)** Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự vùng ITS của rDNA; (-): đối chứng âm; M: DNA marker 1 kb.

3.2. Xác định gen giới tính MAT1-1-1 và MAT1-2-1 ở 8 chủng nấm *C. militaris*

Hai gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1* được xác định giữ vai trò quan trọng đối với sự hình thành quả thể và thoái hóa giống ở nấm *C. militaris* [7, 8]. Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu nào xác định 2 gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1* của các chủng nấm *C. militaris* đang được nuôi trồng tại Việt Nam. Trong nghiên cứu này, 8 chủng nấm *C. militaris* được xác định gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1* bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu cho 2 gen trên (bảng 1). Kết quả điện di sản phẩm PCR (hình 3) cho thấy, 5 chủng nấm (QN6, HL11, HL12, TN01 và TN02) mang cả 2 gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1*. Trong khi đó, 3 chủng nấm bao gồm SH03, HL13 và HN01 chỉ mang gen giới tính *MAT1-1-1*. Như vậy có thể thấy, các chủng nấm nghiên cứu mang cả 2 gen giới tính hoặc chỉ mang gen giới tính *MAT1-1-1*, không ghi nhận chủng nấm nào chỉ mang gen *MAT1-2-1*.

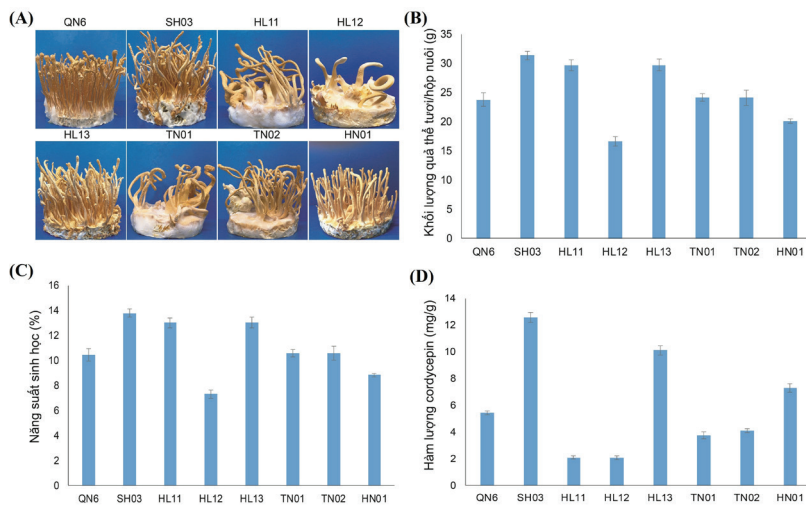


Hình 3. Xác định gen giới tính MAT1-1-1 và MAT1-2-1 ở 8 chủng nấm *C. militaris*. (A) Kết quả điện di sản phẩm PCR gen *MAT1-1-1*; **(B)** Kết quả điện di sản phẩm PCR gen *MAT1-2-1*; M: DNA marker 1 kb; (-): đối chứng âm; (+): đối chứng dương.

3.3. Khả năng hình thành quả thể, năng suất và hàm lượng cordycepin của 8 chủng nấm *C. militaris*

Sau khi xác định gen giới tính *MAT* của 8 chủng nấm (QN6, SH03, HL11, HL12, HL13, TN01, TN02 và HN01), cả 8 chủng nấm này được đánh giá khả năng hình thành quả thể, năng suất và hàm lượng cordycepin. Kết quả cho thấy, cả 8 chủng nấm nghiên cứu đều hình thành quả thể. Hình thành quả thể là hình thức sinh sản hữu tính ở nấm *C. militaris* khi có sự phối hợp theo kiểu dị tần lưỡng cực (bipolar heterothallism) của các gen giới tính *MAT* khác nhau [18]. Như vậy, 5 chủng nấm QN6, HL11, HL12, TN01 và TN02 mang cả 2 gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1* hình thành quả thể theo cách sinh sản hữu tính thông thường. Năm 2005, L. Yue và cs (2005) [19] nhận thấy rằng, khi chỉ mang gen giới tính đơn, hầu hết các chủng *C. militaris* không có khả năng tạo quả thể, một số ít các chủng tạo ra những dạng quả thể bất thường.

Bên cạnh đó, điểm mới của nghiên cứu này là cung cấp thêm dữ liệu về 3 chủng nấm SH03, HL13 và HN01 chỉ mang gen giới tính *MAT1-1-1* có khả năng hình thành quả thể. Quả thể của 3 chủng nấm SH03, HL13 và HN01 có hình thái hoàn toàn bình thường (hình 4A). Đặc biệt, trong nghiên cứu này đã ghi nhận chủng SH03 mang gen giới tính đơn *MAT1-1-1* cho năng suất và hàm lượng cordycepin cao nhất (đạt trung bình 31 g quả thể tươi/hộp nuôi, năng suất sinh học đạt 13,77% và hàm lượng cordycepin đạt 12,5 mg/g trong mẫu quả thể khô) (hình 4B, 4C, 4D). Hàm lượng hoạt chất cordycepin trong quả thể nấm *C. militaris* là chỉ tiêu luôn được các nhà nghiên cứu quan tâm. Theo nghiên cứu của D.T. Bach và cs (2017) [20], hàm lượng cordycepin trong quả thể nấm *C. militaris* nuôi trồng ở điều kiện các tác giả tối ưu đạt 4,33 mg/g quả thể khô. Kết quả nghiên cứu của P.T. Lan và cs (2016) [21] cho thấy hàm lượng cordycepin trong quả thể chủng nấm *C. militaris* NBRC100741 đạt 4,54 mg/g khô. Như vậy, chủng *C. militaris* SH03 là chủng nấm tiềm năng cho nuôi trồng ở quy mô công nghiệp.



Hình 4. Năng suất và hàm lượng cordycepin của 8 chủng nấm *C. militaris* phân lập. (A) Quả thể của 8 chủng nấm; (B) Khối lượng quả thể tươi/hộp nuôi thể tích 650 ml; (C) Năng suất sinh học của 8 chủng nấm; (D) Hàm lượng cordycepin trong mẫu quả thể sấy thăng hoa đạt độ ẩm 5-7%.

4. Kết luận

Nghiên cứu này đã phân lập và định danh được 8 chủng nấm *C. militaris* từ các mẫu quả thể nấm đang được nuôi trồng tại Việt Nam dựa trên đặc điểm hình thái và trình tự vùng ITS của *rDNA*. Các chủng nấm đã được xác định gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1*. Trong đó, 5 chủng nấm gồm QN6, HL11, HL12, TN01 và TN02 được xác định mang cả 2 gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1*; 3 chủng nấm gồm SH03, HL13 và HN01 chỉ mang gen giới tính *MAT1-1-1*. Cả 8 chủng nấm đều có khả năng hình thành quả thể, trong đó chủng *C. militaris* SH03 cho năng suất và hàm lượng cordycepin cao nhất, cụ thể: năng suất quả thể tươi trung bình đạt 31 g/hộp thể tích 650 ml, năng suất sinh học đạt 13,77% và hàm lượng cordycepin đạt 12,5 mg/g quả thể khô. Có thể thấy, đây là chủng nấm *C. militaris* mang gen giới tính đơn rất tiềm năng cho các nghiên cứu sâu hơn để ứng dụng vào sản xuất.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện với sự hỗ trợ về kinh phí từ nhiệm vụ “Ứng dụng kỹ thuật di truyền trong chọn giống nấm *C. militaris* mang đơn gen giới tính có năng suất và chất lượng cao phục vụ phát triển một số sản phẩm, thực phẩm bảo vệ sức khỏe” do Bộ Khoa học và Công nghệ quản lý. Nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] J. Martel, Y.F. Ko, J.C. Liao, et al. (2017), “Myths and realities surrounding the mysterious caterpillar fungus”, *Trends in Biotechnology*, **35**(11), pp.1017-1021, DOI: 10.1016/j.tibtech.2017.06.011.
- [2] X.H. Qiu, L. Cao, R.C. Han (2016), “The progress, issues and perspectives in the research of *Ophiocordyceps sinensis*”, *Journal of Environmental Entomology*, **38**(1), pp.1-23.
- [3] L. Chun-Ru, S.H. Nam, D.G. Geng, et al. (2006), “Artificial culture of seventeen *Cordyceps* spp.”, *Mycosystema*, **25**(4), pp.639-645.
- [4] C.L. Gong, Z.H. Pan, X.J. Zheng, et al. (2006), “Anti-oxidation of cultured *Cordyceps militaris* growing on silkworm pupa”, *International Journal of Industrial Entomology*, **12**(1), pp.1-5.

- [5] L. Huang, Q. Li, Y. Chen, et al. (2009), “Determination and analysis of cordycepin and adenosine in the products of *Cordyceps* spp.”, *African Journal of Microbiology Research*, **3**(12), pp.957-961.

- [6] E. Yokoyama, M. Arakawa, K. Yamagishi, et al. (2006), “Phylogenetic and structural analyses of the mating-type loci in *Clavicipitaceae*”, *FEMS Microbiology Letters*, **264**(2), pp.182-191, DOI: 10.1111/j.1574-6968.2006.00447.x.

- [7] P. Zheng, Y. Xia, G. Xiao, et al. (2012), “Genome sequence of the insect pathogenic fungus *Cordyceps militaris*, a valued traditional Chinese medicine”, *Genome Biology*, **12**(11), pp.1-22, DOI: 10.1186/gb-2011-12-11-r116.

- [8] T.C. Wen, J.C. Kang, M.F. Li, et al. (2009), “A molecular genetic study on the fruiting-body formation of *Cordyceps militaris*”, *KSM News*, **21**(2), pp.76-95.

- [9] S.J. Sun, C.H. Deng, L.Y. Zhang, et al. (2017), “Molecular analysis and biochemical characteristics of degenerated strains of *Cordyceps militaris*”, *Archives of Microbiology*, **199**(6), pp.939-944, DOI: 10.1007/s00203-017-1359-0.

- [10] J. Yin, X.D. Xin, Y.J. Weng, et al. (2018), “Genotypic analysis of degenerative *Cordyceps militaris* cultured in the pupa of *Bombyx mori*”, *Entomological Research*, **48**(3), pp.137-144, DOI: 10.1111/1748-5967.12246.

- [11] T.J. White, T. Bruns, S. Lee, et al. (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, DOI: 10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1.

- [12] N. Kang, H.H. Lee, I. Park, et al. (2017), “Development of high cordycepin-producing *Cordyceps militaris* strains”, *Mycobiology*, **45**(1), pp.31-38, DOI: 10.5941/MYCO.2017.45.1.31.

- [13] T.V. Tuan, V.X. Tao (2020), “Establishment of an *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer approach for the medicinal fungus *Cordyceps militaris* G12”, *Vietnam Journal of Science and Technology - MOST*, **62**(5), pp.60-64 (in Vietnamese).

- [14] V.T. Tran, T.B.X.L. Do, T.K. Nguyen, et al. (2017), “A simple, efficient and universal method for the extraction of genomic DNA from bacteria, yeasts, molds and microalgae suitable for PCR-based applications”, *Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering*, **59**(4), pp.66-74, DOI: 10.31276/VJSTE.59(4).66.

- [15] B. Shrestha, S.K. Han, J.M. Sung, et al. (2012), “Fruiting body formation of *Cordyceps militaris* from multi-ascospore isolates and their single ascospore progeny strains”, *Mycobiology*, **40**(2), pp.100-106, DOI: 10.5941/MYCO.2012.40.2.100.

- [16] J.J. Luangsa-ard, K. Tasanathai, S. Mongkolsamrit, et al. (2008), *Atlas of Invertebrate-Pathogenic Fungi of Thailand*, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Thailand, 88pp.

- [17] J. Curran, F. Driver, J.W.O. Ballard, et al. (1994), “Phylogeny of *Metarhizium*: Analysis of ribosomal DNA sequence data”, *Mycological Research*, **98**(5), pp.547-552, DOI: 10.1016/S0953-7562(09)80478-4.

- [18] X. Gao (2008), “Mating system of *Cordyceps militaris*”, *Acta. Edulis. Fungi.*, **15**(1), pp.6-10.

- [19] L. Yue, Z. Guo-Zhen, A. Mo-Ping, et al. (2005), “*Cordyceps militaris*: Ascospore germination and cultural characteristics of progeny population”, *Mycosystema*, **24**(4), pp.525-532.

- [20] D.T. Bach, V.H. Nam, M.T. Trang, et al. (2017), “Evaluation on cultivation techniques to fruiting body formation of *Cordyceps militaris*”, *TNU Journal of Science and Technology*, **161**(1), pp.113-118 (in Vietnamese).

- [21] P.T. Lan, D.H. Lan, N.T.H. Hanh, et al. (2016), “Research on the effects of temperature and light on growth, development and cordycepin active ingredient content of *Cordyceps militaris* NBRC100741 fungus on silkworm pupae”, *VNU Journal of Science*, **32**(2), pp.63-72 (in Vietnamese).