

Phát hiện loài nấm *polycephalomyces nipponicus* ký sinh trên ấu trùng ve sầu tại thị trấn Ea Knốp, Tỉnh Đắk Lắk, Việt Nam

Identification of entomopathogenic *polycephalomyces nipponicus* on cicada nymph in Ea Knop town, Dak Lak Province, Vietnam

Trịnh Văn Hạnh^{1*}, Lao Đức Thuận², Lê Huyền Ái Thúy², Thiều Hồng Huệ², Vương Lợi³, Lê Anh Duy³, Trương Bình Nguyên⁴, Đinh Minh Hiệp⁵

¹Trường Đại học Khoa Học Tự Nhiên, ĐHQG-HCM, Việt Nam

²Trường Đại học Mở Thành Phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

³Viện Công Nghệ Ứng Dụng, Trường Đại học Thủ Dầu Một, Việt Nam

⁴Trường Đại Học Đà Lạt, Việt Nam

⁵Sở Nông nghiệp và phát triển nông thôn Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

*Tác giả liên hệ, Email: trinhvanhanh220293@gmail.com

THÔNG TIN	TÓM TẮT
DOI:10.46223/HCMCOUJS.tech.vi.17.2.1940.2022 Ngày nhận: 16/06/2021 Ngày nhận lại: 19/07/2021 Duyệt đăng: 22/07/2021 Từ khóa: <i>cordyceps nipponica</i>; định danh hình thái; định danh phân tử; nấm ký sinh côn trùng Keywords: <i>cordyceps nipponica</i>; morphological analysis; phylogenetic analysis; entomopathogenic fungi	Mẫu nấm H022, ký sinh trên ấu trùng ve sầu, được phát hiện ở khu vực thị trấn Ea Knốp - Tỉnh Đắk Lắk. Mẫu nấm được thu nhận, đưa về phòng thí nghiệm để giải phẫu hình thái nhằm xác định tên loài. Đồng thời, DNA bộ gene được thu nhận bằng phương pháp phenol/chloroform để tiến hành khuếch đại các gene mục tiêu <i>nrSSU</i>, <i>ITS</i>, <i>nrLSU</i>, <i>Rpb1</i>, <i>Tef1</i> bằng kỹ thuật PCR. Sản phẩm khuếch đại được giải trình tự và tiến hành phân tích phát sinh loài phân tử để hỗ trợ việc định danh. Kết quả phân tích hình thái khẳng định rằng mẫu H022 chính là loài <i>Polycephalomyces nipponicus</i> (Kobayasi) (Kepler & ctg., 2013). Kết quả phân tích phát sinh loài phân tử cho thấy mẫu H022 hình thành nhóm đơn huyết thống với trình tự loài <i>Polycephalomyces nipponicus</i> với giá trị bootstrap lần lượt là 100/100/100 (Neighbor-Joining (NJ), Maximum Parsimony (MP), and Maximum Likelihood (ML)). Kết quả giải phẫu hình thái và phát sinh loài phân tử đều khẳng định mẫu nấm H022 là loài <i>Polycephalomyces nipponicus</i> (Kobayasi) (Kepler & ctg., 2013). Ngoài ra, đây là ghi nhận đầu tiên loài <i>Polycephalomyces nipponicus</i> tại Đắk Lắk. ABSTRACT A fungus parasitized on cicada nymph, labeled as H022, was discovered in Ea Knop town, Dak Lak province. Subsequently, the fungus specimen was transferred to our laboratory for morphological and genetic analyses to identify species. The genomic DNA was isolated using the phenol/chloroform method and used as a template for PCR to amplify the <i>nrSSU</i>, <i>ITS</i>, <i>nrLSU</i>, <i>Rpb1</i>, and <i>Tef1</i> genes. Next, the PCR products were sequenced for phylogenetic analysis. Based on the morphological analysis, H022

was indicated as *Polycephalomyces nipponicus* (Kobayasi) (Kepler et al., 2013). Moreover, the phylogenetic analysis revealed that the H022 fungus formed a monophyletic group with the reference *Polycephalomyces nipponicus* with a high bootstrap value of 100/100/100 (NJ/MP/ML). These morphological and phylogenetic analyses confirm that the H022 fungus *Polycephalomyces nipponicus* that is firstly recorded in Vietnam.

1. Giới thiệu

Ve sầu hay ấu trùng thuộc họ *Cicadidae* (ve sầu) là một trong những ký chủ chính của *Cordyceps* s.l. Cho đến nay, có 20 đơn vị phân loài (taxa) đã được tìm thấy phân bố ở nhiều khu vực khác nhau, khu vực châu Á, khu vực châu Âu, khu vực Bắc Mỹ, ... (Kobayasi, 1939, 1941; Kobayasi & Shimizu, 1963, 1982; Kobayashi & Shimizu, 1983). Châu Á có 03 loài thuộc chi *Metarhizium*, 11 loài thuộc chi *Ophiocordyceps*, 05 loài thuộc chi *Polycephalomyces*, 01 loài thuộc chi *Purpureocillium* và 03 loài thuộc chi *Tolypocladium*. *Polycephalomyces nipponicus* (Kobayasi) (Kepler & ctg., 2013) (tên khác *Cordyceps nipponica*) kí sinh chủ yếu trên ấu trùng ve sầu *Graptopsaltria nigrofuscata* (Kobayasi, 1939). Loài này được đánh giá có các hoạt chất sinh học có khả năng kháng khuẩn (ở cả hai nhóm vi khuẩn Gram dương và Gram âm) (K. Sangdee, Seephonkai, Buranrat, Surapong, & Sangdee, 2016), hoạt tính chống lại ký sinh trùng sốt rét (*P. falciparum*) (Isaka, Tanticharoen, Kongsaree, & Thebtaranonth, 2001), gây độc tế bào MCF-7 (dòng tế bào ung thư vú) (K. Sangdee & ctg., 2016). Những nghiên cứu này cho thấy tiềm năng trong việc phát triển các sản phẩm chiết xuất từ *P. nipponicus* để ứng dụng trong y học.

Dựa trên giá trị y học của *P. nipponicus* được mô tả ở trên thì định danh chính xác loài bằng giải phẫu hình thái hay phát sinh loài phân tử là yếu tố ưu tiên hàng đầu (Jaihan, Sangdee, & Aphidech, 2021). Vì vậy, các đặc điểm hình thái bao gồm: vật chủ, thể đệm, quả thể, bào tử, túi bào tử, bào tử phân và hệ sợi nấm được sử dụng để định danh. Nhưng sự biến đổi đặc điểm hình thái chỉ có thể quan sát ở một số trường hợp (A. Sangdee, Sangdee, Seephonkai, Jaihan, & Kanyaphum, 2017). Kết quả nghiên cứu phát sinh loài phân tử của Sung, Sung, Jones, và Spatafora (2007) phù hợp với các phân tích hình thái giải phẫu dựa trên việc phân tích các dữ liệu từ 05 - 07 gene bao gồm: *nrSSU* (nuclear ribosomal small subunit), *nrLSU* (nuclear ribosomal large subunit), *Tef1* (elongation factor 1 α), *Rpb1* (largest subunit of RNA polymerase II), *Rpb2* (second largest subunit of RNA polymerase II), *Tub* (β tubulin) và *Atp6* (mitochondrial ATP6) của 162 taxon. Kết quả các nhóm nấm này được chia thành họ Clavicipitaceae với các chi *Metacordyceps*, *Hypocrella*, *Regiocrella* và *Torrubiella*; họ Cordycipitaceae với chi *Cordyceps*; họ Ophiocordycipitaceae mới hình thành với 02 chi *Ophiocordyceps* và *Elaphocordyceps*. Ngoài ra, theo Kepler và cộng sự (2013), sử dụng khối dữ liệu gồm 06 gene (*ITS*, *nrSSU*, *nrLSU*, *Tef1*, *Rpb1*, *Rpb2*), đã tái hình thành chi *Polycephalomyces* nằm trong họ Ophiocordycipitaceae bao gồm các loài nấm hữu tính và vô tính. Năm 2021, Jaihan và cộng sự (2021) đã sử dụng dữ liệu 05 gene (*ITS*, *nrSSU*, *nrLSU*, *Tef1*, *Rpb1*) để định danh 44 mẫu nấm kí sinh trên ấu trùng ve sầu. Kết quả phát sinh loài giúp xác định rõ ràng các loài *P. nipponicus*, *O. longissima*, *O. sobolifera*, *Simplicillium obclavatum* và *Metacordyceps chlamydosporia*.

Mặt khác, nhiều loài nấm kí sinh trên ấu trùng ve sầu có sự nhầm lẫn về hình dạng dẫn đến việc đặt tên không đúng khi quan sát hình thái đại thể của chúng (Jaihan & ctg., 2021). Theo mô tả về đặc điểm các loài trong chi *Paecilomyces* của tác giả Samson (1974, 2004); Samson, Evans, và Latge (1988) thì một số nhóm loài có hình thái rất giống nhau nhưng khi nuôi cấy trên môi

trường dinh dưỡng nhân tạo, nấm có một số thay đổi về mặt hình thái tùy thuộc vào những điều kiện và môi trường nuôi cấy khác nhau. Tiêu biểu, khi *Polycephalomyces nipponicus* được phát triển dưới các khí hậu và vị trí địa lý khác nhau thì có thể tạo ra thể đệm với các hình thái không giống nhau (A. Sangdee & ctg., 2017). Việc định danh các loài nấm này bằng hình thái gặp khó khăn, đôi khi mang tính chủ quan (Peter & Myrian, 2006). Ngoài ra, đã có nhiều công trình nghiên cứu phân tích gene của các loài nấm *Paecilomyces* spp. giống nhau về mặt hình thái (Fargues, Bon, Manguin, & Couteaudier, 2002; Sheng, Fenggang, Shi, & Shun, 2017; Tigano-Milani, Honeycutt, & ctg., 1995; Tigano-Milani, Samson, Martins, & Sobral, 1995; Zeng & ctg., 2014). Đa số công trình nghiên cứu đã ứng dụng kỹ thuật sinh học phân tử để giải trình tự của rDNA xác định mối quan hệ tương quan của các loài nấm *Paecilomyces* spp. Vì vậy, để xác định chính xác mẫu nấm H022 được tìm thấy tại thị trấn Ea Knốp thì giải phẫu hình thái và phân tích phát sinh loài phân tử đã được tiến hành và trình bày trong bài báo.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Thu nhận mẫu nấm

Mẫu nấm H022 có kí chủ là ấu trùng ve sầu nằm dưới mặt đất với khoảng cách 20 - 30mm và phần quả thể mọc lên trên mặt đất trong vườn canh tác của dân địa phương tại thị trấn Ea Knốp - Tỉnh Đắk Lắk vào ngày 03/10/2020 với vị trí địa lý 12°46' vĩ Bắc 108°31' Đông Nam. Mẫu sau khi thu nhận được bảo quản trong túi giấy chuyển về phòng thí nghiệm để tiến hành các phân tích tiếp theo.

2.2. Phân tích hình thái

Mẫu nấm H022 được giải phẫu và quan sát phân tích hình thái dựa trên phân loại của các nghiên cứu Kobayasi (1939), Samson (1974), Jaihan và cộng sự (2021). Một phần thể sinh sản của quả thể trưởng thành được dán vào nắp đĩa petri chứa môi trường PGA (Potato Glucose Agar) nhằm thu nhận bào tử túi. Sau khi đã thu nhận được bào tử, tiến hành loại bỏ phần thể sinh sản đã dán và nuôi ủ các đĩa petri chứa bào tử ở nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Quan sát quá trình nảy mầm của bào tử túi và sự hình thành của hệ sợi nấm dưới kính hiển vi quang học Rax Vision (Mỹ). DNA phục vụ cho các thí nghiệm phân tích phát sinh loài phân tử được chiết tách từ hệ sợi thuần nuôi cấy trên môi trường PGA.

2.3. Tách chiết DNA, khuếch đại gene mục tiêu *nrSSU*, *ITS*, *nrLSU*, *Rpb1*, *Tef1*

Phương pháp phenol/chloroform (pH = 8) bổ sung β -mecaptoethanol và CTAB (Chomczynski, 1993 ; Vu, Lao, Truong, Dinh, & Le, 2017) được sử dụng để tách chiết DNA bộ gene. 1g mẫu nấm được ủ trong dung dịch ly giải (bao gồm các thành phần chính: Tris HCl, EDTA, SDS, NaCl, CTAB, β -mecaptoethanol, và proteinase K) ở nhiệt độ 65°C , qua đêm. Phần dịch nổi được thu nhận và bổ sung phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) và tiến hành ly tâm. Sau khi ly tâm, phần dịch nổi được thu nhận và tiến hành rửa DNA bộ gene bằng cách bổ sung isopropanol tuyệt đối. Cuối cùng, DNA bộ gene được lưu trữ bằng dung dịch đệm Tris-EDTA ở nhiệt độ -20°C cho các thí nghiệm phân tích tiếp theo.

Gene mục tiêu *nrSSU*, *ITS*, *nrLSU*, *Rpb1*, *Tef1* được khuếch đại bằng phản ứng PCR sử dụng các cặp mồi đặc hiệu với các gene mục tiêu (Bảng 1). Chu kỳ phản ứng PCR được thiết kế như sau: 01 chu kỳ ở 95°C , 05 phút; 40 chu kỳ bao gồm: 95°C , 30 giây; 55°C , 30 giây; 72°C , 02 phút; và 01 chu kỳ ở nhiệt độ 72°C , 05 phút. Sản phẩm PCR được tiến hành điện di và quan sát dưới bàn UV. Đồng thời, sản phẩm PCR được giải trình tự bằng phương pháp Sanger.

Bảng 1

Cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu

Gene	Mồi	Trình tự
<i>ITS</i>	ITS1F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
<i>nrSSU</i>	NS1 (F)	GTAGTCATATGCTTGTCTC
	NS4 (R)	CTTCCGTCAATTCCTTTAAG
<i>nrLSU</i>	LR0R (F)	GTACCCGCTGAACTTAAGC
	LR5 (R)	ATCCTGAGGGAAACTTC
<i>Tef1</i>	983F	GCYCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT
	2218R	ATGACACCRACRGCACRGTYTG
<i>Rpb1</i>	CRPB1 (F)	CCWGGYTTYATCAAGAARGT
	RPB1Cr (R)	CCNGCDATNTCRTRTCCATRTA

Nguồn: White, Bruns, Lee, và Taylor (1990); Vilgalys và Hester (1990); Rehner (2001); Castlebury, Rossman, Sung, Hyten, và Spatafora (2004)

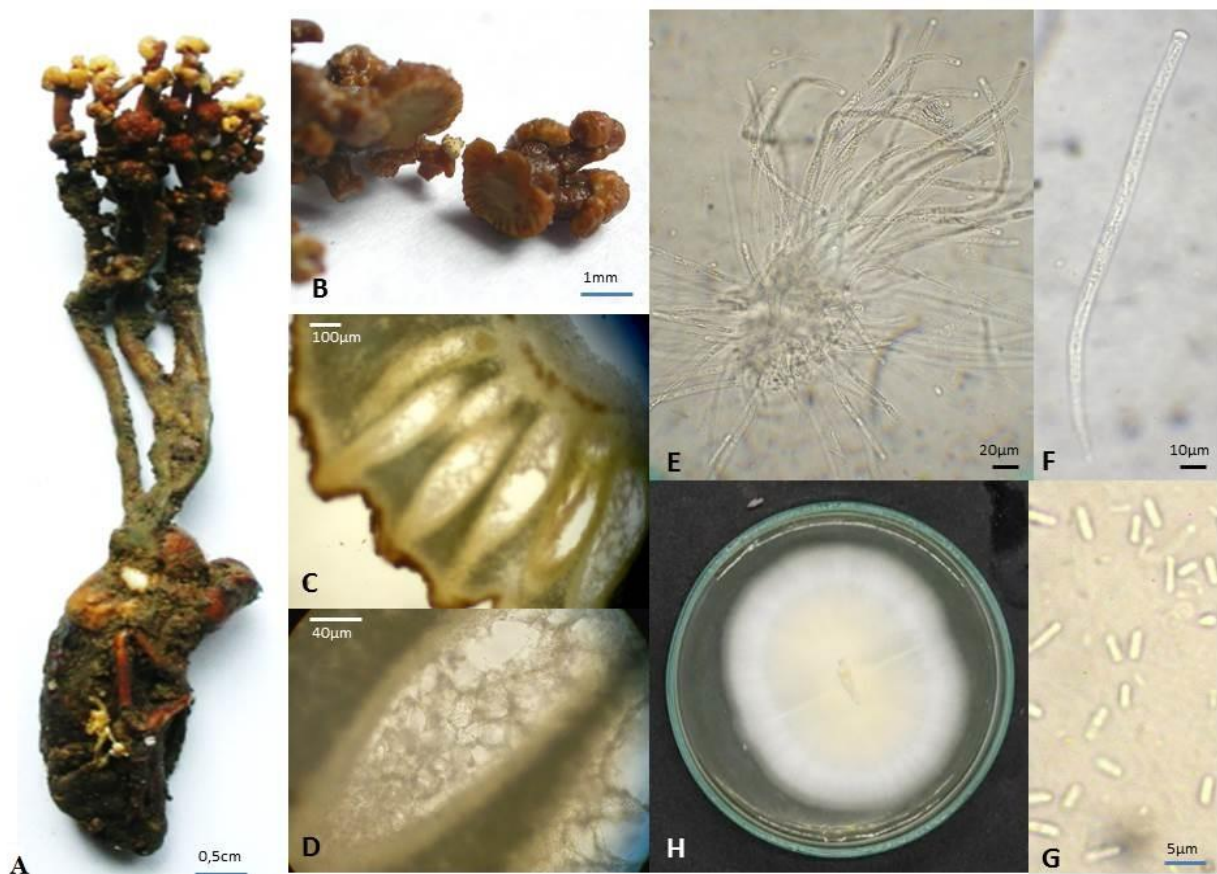
2.4. Phân tích phả hệ phân tử

Cơ sở dữ liệu tham chiếu các gene mục tiêu *nrSSU*, *ITS*, *nrLSU*, *Rpb1*, *Tef1* được thu nhận từ ngân hàng gene (Genbank, NCBI) dựa trên công trình công bố của Sung và cộng sự (2007) và Kepler và cộng sự (2013). Các trình tự tham chiếu được kiểm tra tên loài và mã số truy cập (Accession number) trước khi đưa vào bộ dữ liệu. Trình tự gene mục tiêu của H022 được tiến hành hiệu chỉnh để loại bỏ các tín hiệu không rõ ràng ở hai đầu sau khi giải trình tự bằng các phần mềm: Seaview 4.2.12 và Chromas Lite 2.1.1. Cây phát sinh loài phân tử được phân tích dựa trên phương pháp Neighbor-Joining (NJ), Maximum Parsimony (MP), and Maximum Likelihood (ML) bằng công cụ Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA).

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Định danh dựa trên giải phẫu hình thái

H022: *Cordyceps nipponica* = *Polycephalomyces nipponicus* (Kobayasi) (Kepler & ctg., 2013) (Hình 1).



Hình 1. Hình thái giải phẫu mẫu nấm H022; **A** cấu trúc ấu trùng ve sầu và phần quả thể nấm, **B** Vùng sinh sản của nấm, **C** Thể chén dạng elip, **D** Thể chén đơn, **E** Túi bào tử, **F** Bào tử túi có nắp bào tử, **G** Bào tử thứ cấp, **H** Hệ sợi nấm H022 nuôi trên môi trường PGA

Mô tả chung: Mẫu nấm H022 được tìm thấy trong vườn canh tác của dân địa phương tại thị trấn Ea Knốp - Đắk Lắk với kí chủ là ấu trùng ve sầu có 02 - 03 quả thể (synnemata) phát triển từ đốt cổ của ấu trùng ve sầu, hệ sợi nấm không phát triển bên ngoài cơ thể ký chủ (Hình 1A). **Quả thể:** kích thước 43 - 45mm, phân chia không rõ ràng giữa cuống và vùng mang cấu trúc sinh sản. **Phần thể đệm:** dạng sợi, màu sậm hơn so với phần sinh sản, dài 20 - 25mm, đường kính thay đổi do có cấu trúc lõi lõm bất thường dọc theo cuống, có sự phân nhánh không theo quy luật tại gần đỉnh nơi mang các cấu trúc sinh sản hữu tính, có chiều dài khoảng 20 - 22mm. **Phần sinh sản:** Các cấu trúc được hình thành do sự tập hợp của một số thể chén không theo quy luật, tạo nên các cấu trúc có kích thước không đồng đều, màu nâu vàng ở đỉnh và màu nâu đất (pantone 469C) ở phần đáy nơi dính vào cuống, phân bố ở đầu tận cùng và rải rác (không theo quy luật) dọc theo các nhánh thuộc phần sinh sản (dạng neocarposoma) (Hình 1B). **Thể chén** (Perithecia): nhỏ rất nhẹ so với bề mặt cấu trúc sinh sản, dạng elip kéo dài và trong suốt, kích thước $730\mu\text{m} \times 155\mu\text{m}$ (Hình 1C, D). **Túi bào tử:** hình trụ, kích thước $180\mu\text{m} \times$ đường kính $5.2\mu\text{m}$, có nắp dày khoảng $03\mu\text{m}$ (Hình 1E). **Bào tử túi:** có các vách ngăn trong suốt, đứt gãy để tạo bào tử thứ cấp sau khi giải phóng ra khỏi túi, kích thước $2.5 - 5.2\mu\text{m} \times 1.5\mu\text{m}$ sau khi giải phóng ra khỏi chén (Hình 1F, G). Khuẩn lạc từ môi trường nuôi cấy trên PGA: phát triển nhanh đạt đường kính 65 - 70mm trong 30 ngày tại 25°C , dạng bông xốp và lúc đầu màu trắng sau đó chuyển sang màu vàng đến cam. Sau đó trở nên thành các cụm bào tử nhầy màu vàng cam (Hình 1H).

Dựa vào đặc điểm giải phẫu hình thái và khóa phân loại của các nghiên cứu của Kobayasi

(1939), Samson (1974) và Jaihan và cộng sự (2021) thì mẫu nấm thu nhận được xác định là tương đồng với *Polycephalomyces nipponicus* thuộc chi *Ophiocordyceps*, họ Ophiocordycipitaceae, bộ Hypocrales, lớp Sordariomycetes, ngành phụ nấm túi Ascomycota.

3.2. Phân tích phát sinh phân tử

Bộ dữ liệu trình tự tham chiếu sử dụng để phân tích được thu nhận từ ngân hàng gene (Genbank, NCBI) bao gồm 51 trình tự ở mỗi gene mục tiêu *nrSSU*, *ITS*, *nrLSU*, *Rpb1*, *Tef1* là trình tự các loài trong chi *Cordyceps* và các chi khác thuộc họ Clavicipitaceae (dữ liệu được trình bày trong Bảng 2). Trong đó, 15 trình tự thuộc Cordycipitaceae, 16 trình tự thuộc Clavicipitaceae, 20 trình tự thuộc Ophycordycipitaceae. Trình tự nhóm ngoại được sử dụng là *Glomerella cingulate*. Mô hình tiến hóa được áp dụng cho phân tích phát sinh loài phân tử là GTR+G+I (áp dụng cho phương pháp phân tích NJ và ML) với chiều dài của bộ trình tự là 2,677bp. Các phương pháp phân tích NJ, ML và MP đơn gene và đa gene đều cho địa hình học tương tự, thể hiện được mối quan hệ giữa H022 và các loài khác. Cụ thể, các trình tự các loài được chia thành ba nhóm lớn: Cordycipitaceae (*Beauveria*, *Cordyceps*, *Lecanicillium*, *Simplicillium*), Clavicipitaceae (*Claviceps*, *Conoideocrella*, *Pochonia*, *Metapochonia*, *Metarhizium*, *Balansia*), Ophycordycipitaceae (*Ophiocordyceps*, *Polycephalomyces*, *Drechmeria*), phân tách với nhóm ngoại. Xét về cây phát sinh loài đơn gene, mẫu nấm H022 hình thành đơn huyết thống (monophyletic group) với loài *Polycephalomyces nipponicus* và có tỷ lệ bootstrap ủng hộ trên cây NJ/MP/ML ở các gene mục tiêu *nrSSU*, *ITS*, *nrLSU*, *Rpb1*, *Tef1* lần lượt 64/79/61; 100/00/99; 98/99/91; 91/99/96; 99/97/100 (kết quả không trình bày). Phân tích đa gene, mẫu nấm H022 hình thành đơn huyết thống với *Polycephalomyces nipponicus* (*ITS*: KF049665, *nrLSU*: KF049640, *nrSSU*: KF049622, *Rpb1*: KF049655, *Tef1*: KF049696) với giá trị bootstrap lần lượt là 100/100/100 (NJ/ML/MP) được thể hiện trong Hình 2. Như vậy, mẫu H022 tương đồng hoặc chính là loài *Polycephalomyces nipponicus* thuộc họ Ophycordycipitaceae theo quan điểm phát sinh loài phân tử.

Bảng 2

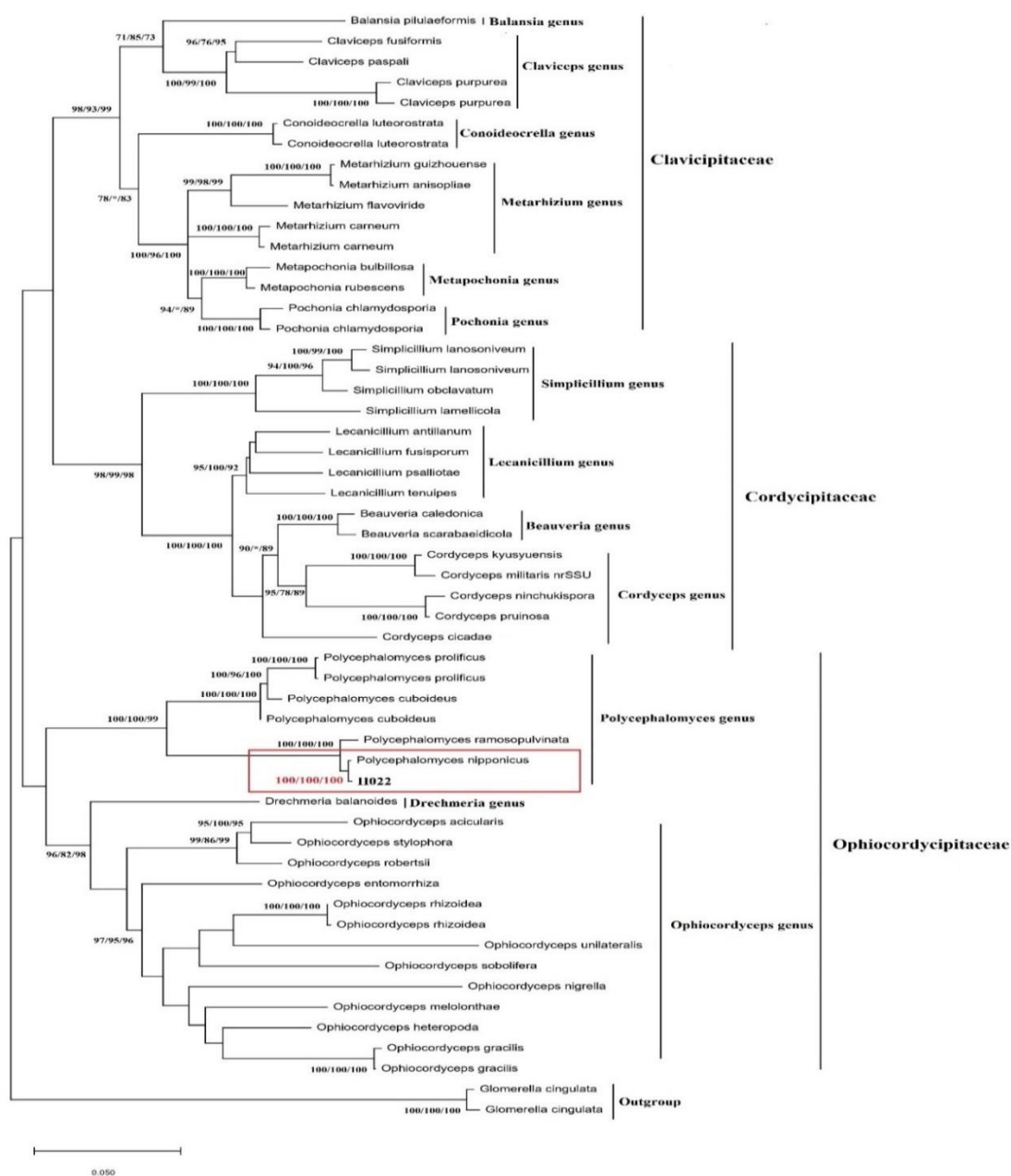
Cơ sở dữ liệu trình tự các gene mục tiêu *nrSSU*, *ITS*, *nrLSU*, *Rpb1*, *Tef1* sử dụng trong phân tích phát sinh loài phân tử

STT	Tên loài	Genus	Accession				
			<i>ITS</i>	<i>nrLSU</i>	<i>nrSSU</i>	<i>Rpb1</i>	<i>Tef1</i>
1	<i>Balansia pilulaeformis</i>	Balansia	JN049816	AF543788	AF543764	DQ522365	DQ522319
2	<i>Beauveria caledonica</i>	Beauveria	HQ880817	AF339520	AF339570	EF469086	EF469057
3	<i>Beauveria scarabaeidicola</i>	Beauveria	JN049827	AF339524	AF339574	DQ522380	DQ522335
4	<i>Claviceps fusiformis</i>	Claviceps	JN049817	U17402	DQ522539	DQ522366	DQ522320
5	<i>Claviceps paspali</i>	Claviceps	JN049818	U47826	U32401	DQ522367	DQ522321
6	<i>Claviceps purpurea</i>	Claviceps	KJ529004	AF543789	AF543765	AY489648	AF543778
7	<i>Claviceps purpurea</i>	Claviceps	KX977396	EF469075	EF469122	EF469087	EF469058
8	<i>Conoideocrella luteorostrata</i>	Conoideocrella	JN049859	EF468850	EF468995	EF468906	EF468801

STT	Tên loài	Genus	Accession				
			<i>ITS</i>	<i>nrLSU</i>	<i>nrSSU</i>	<i>Rbp1</i>	<i>Tef1</i>
9	<i>Conoideocrella luteorostrata</i>	Conoideocrella	JN049860	EF468849	EF468994	EF468905	EF468800
10	<i>Cordyceps cicadae</i>	Cordyceps	MF803085	MH879588	MH879636	MH885438	MH879662
11	<i>Cordyceps kysuyuensis</i>	Cordyceps	EF368021	EF468813	EF468960	EF468863	EF468754
12	<i>Cordyceps militaris</i>	Cordyceps	JN049825	AY184966	AY184977	DQ522377	DQ522332
13	<i>Cordyceps pruinosa</i>	Cordyceps	JN049826	AY184968	AY184979	DQ522397	DQ522351
14	<i>Drechmeria balanoides</i>	Drechmeria	EF546660	AF339539	AF339588	DQ522388	DQ522342
15	<i>Lecanicillium antillanum</i>	Lecanicillium	MH861888	AF339536	AF339585	DQ522396	DQ522350
16	<i>Lecanicillium fusisporum</i>	Lecanicillium	MH859538	AF339549	AF339598	EF468889	EF468783
17	<i>Lecanicillium psalliotae</i>	Lecanicillium	JN049846	AF339559	AF339608	EF468890	EF468784
18	<i>Lecanicillium tenuipes</i>	Lecanicillium	JN036556	AF339526	AF339576	DQ522387	DQ522341
19	<i>Metarhizium guizhouense</i>	Metarhizium	JN049829	AF543787	AF543763	DQ522383	AF543775
20	<i>Pochonia chlamydosporia</i>	Pochonia	JN049821	DQ518758	DQ522544	DQ522372	DQ522327
21	<i>Metapochonia bulbillosa</i>	Metapochonia	EU999952	AF339542	AF339591	EF468902	EF468796
22	<i>Metapochonia rubescens</i>	Metapochonia	MH862138	AF339566	AF339615	EF468903	EF468797
23	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Metarhizium	JN049834	AF339530	AF339579	DQ522399	AF543774
24	<i>Metarhizium carneum</i>	Metarhizium	AY624170	EF468842	EF468989	EF468895	EF468788
25	<i>Metarhizium carneum</i>	Metarhizium	AY624171	EF468843	EF468988	EF468894	EF468789
26	<i>Metarhizium flavoviride</i>	Metarhizium	AF138271	AF339531	AF339580	DQ522400	DQ522353
27	<i>Ophiocordyceps acicularis</i>	Ophiocordyceps	JN049820	EF468805	EF468950	EF468852	EF468744
28	<i>Ophiocordyceps entomorrhiza</i>	Ophiocordyceps	JN049850	EF468809	EF468954	EF468857	EF468749
29	<i>Ophiocordyceps melolonthae</i>	Ophiocordyceps	KF937353	DQ518762	DQ522548	DQ522376	DQ522331
30	<i>Ophiocordyceps stylophora</i>	Ophiocordyceps	JN049828	DQ518766	DQ522552	DQ522382	DQ522337
31	<i>Ophiocordyceps unilateralis</i>	Ophiocordyceps	AY494596	DQ518768	DQ522554	DQ522385	DQ522339

STT	Tên loài	Genus	Accession				
			ITS	nrLSU	nrSSU	Rbp1	Tef1
32	<i>Ophiocordyceps gracilis</i>	Ophiocordyceps	HM119586	EF468810	EF468955	EF468858	EF468750
33	<i>Ophiocordyceps gracilis</i>	Ophiocordyceps	JN049851	EF468811	EF468956	EF468859	EF468751
34	<i>Ophiocordyceps heteropoda</i>	Ophiocordyceps	JN049852	EF468812	EF468957	EF468860	EF468752
35	<i>Ophiocordyceps nigrella</i>	Ophiocordyceps	JN049853	EF468818	EF468963	EF468866	EF468758
36	<i>Ophiocordyceps rhizoidea</i>	Ophiocordyceps	JN049857	EF468825	EF468970	EF468873	EF467764
37	<i>Ophiocordyceps rhizoidea</i>	Ophiocordyceps	GU723769	EF468824	EF468969	EF468872	EF468765
38	<i>Ophiocordyceps robertsii</i>	Ophiocordyceps	AJ309335	EF468826	-	-	EF468766
39	<i>Ophiocordyceps sobolifera</i>	Ophiocordyceps	KT281884	KJ878898	EF468972	KJ879013	KJ878979
40	<i>Cordyceps ninchukispora</i>	Cordyceps	AY245642	EF468846	EF468991	EF468900	EF468795
41	<i>Pochonia chlamydosporia</i>	Pochonia	MH858871	AF339544	AF339593	EF469098	EF469069
42	<i>Simplicillium lamellicola</i>	Simplicillium	MH854806	AF339552	AF339601	DQ522404	DQ522356
43	<i>Simplicillium lanosoniveum</i>	Simplicillium	AJ292395	AF339554	AF339603	DQ522405	DQ522357
44	<i>Simplicillium lanosoniveum</i>	Simplicillium	AJ292396	AF339553	AF339602	DQ522406	DQ522358
45	<i>Simplicillium obclavatum</i>	Simplicillium	MH860859	AF339517	AF339567	-	EF468798
46	<i>Polycephalomyces cuboideus</i>	Polycephalomyces	-	KF049628	KF049609	-	KF049683
47	<i>Polycephalomyces cuboideus</i>	Polycephalomyces	-	KF049629	KF049610	KF049646	KF049684
48	<i>Polycephalomyces nipponicus</i>	Polycephalomyces	KF049622	KF049665	KF049640	KF049655	KF049696
49	<i>Polycephalomyces prolificus</i>	Polycephalomyces	KF049659	KF049631	KF049612	KF049648	KF049686
50	<i>Polycephalomyces prolificus</i>	Polycephalomyces	KF049660	KF049632	KF049613	KF049649	KF049687
51	<i>Polycephalomyces ramosopulvinatus</i>	Polycephalomyces	KF049658	KF049627	AB027326	KF049645	KF049682
52	<i>Glomerella cingulata</i>	Outgroup	EU326204	AF543786	AF543762	AY489659	AF543773
53	<i>Glomerella cingulata</i>	Outgroup	EU326192	U48428	U48427	DQ858454	AF543772

Nguồn: Kepler và cộng sự (2013); Sung và cộng sự (2007)



Hình 2. Cây phát sinh loài phân tử của mẫu H022 được xây dựng trên bằng phương pháp lần lượt được biểu diễn là NJ/ML/MP trên gene mục tiêu *nrSSU*, *ITS*, *nrLSU*, *Rpb1*, *Tef1*

Tóm lại, kết quả phân tích từ giải phẫu hình thái và phát sinh loài phân tử trên gene mục tiêu *nrSSU*, *ITS*, *nrLSU*, *Rpb1*, *Tef1* đều ủng hộ mẫu H022 tương đồng hoặc chính là loài *Polycephalomycetes nipponicus* (Kepler & ctg., 2013).

4. Kết luận

Nghiên cứu đã ứng dụng thành công việc định danh dựa trên hình thái và phát sinh loài phân tử để định danh mẫu nấm H022 thu nhận ở khu vực thị trấn Ea Knốp - Tỉnh Đắk Lắk. Đồng thời, mẫu H022 là loài *Polycephalomycetes nipponicus* được ghi nhận đầu tiên tại Đắk Lắk.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (Nafosted) (Mã số: 106-NN.06.2015.44) và Trường Đại Học Mở Thành Phố Hồ Chí Minh (Mã số: E2019.06.3).

Tài liệu tham khảo

- Castlebury, L. A., Rossman, A. Y., Sung, G. H., Hyten, A. S., & Spatafora, J. W. (2004). Multigene phylogeny reveals new lineage for *Stachybotrys chartarum*, the indoor air fungus. *Mycological Research*, 108(8), 864-872.
- Chomczynski, P. (1993). A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*, 15(3), 536-537.
- Fargues, J., Bon, M. C., Manguin, S., & Couteaudier, Y. (2002). Genetic variability among *Paecilomyces fumosoroseus* isolates from various geographical and host insect origins based on the rDNA-ITS regions. *Mycological Research*, 106(9), 1066-1074.
- Isaka, M., Tanticharoen, M., Kongsaree, P., & Thebtaranonth, Y. (2001). Structures of cordypyridones A-D, antimalarial N-hydroxy and N-methoxy-2-pyridones from the insect pathogenic fungus. *The Journal of Organic Chemistry*, 66(14), 4803-4808.
- Jaihan, P., Sangdee, K., & Aphidech, S. (2021). Combined multiple genes phylogenetic analysis and morphological characteristic description of entomopathogenic fungi infecting cicada nymph from northeast of Thailand. *Biologia*, 76(5), 1635-1650.
- Kepler, R., Banb, S., Nakagiri, A., Bischoff, J., Jones, N. H., Owensby, C. A., & Spatafora, J. W. (2013). The phylogenetic placement of hypocrealean insect pathogens in the genus *Polycephalomyces*: An application of One Fungus One Name. *Fungal Biology*, 117(9), 611-622.
- Kobayashi, Y., & Shimizu, D. (1983). *Iconography of vegetable wasps and plant warms*. Osaka, Japan: Hoikusha Publishing Co., Ltd.
- Kobayasi, Y. (1939). On the genus *Cordyceps* and its allies on Cicadidae from Japan. *Bulletin of the Biogeographical Society of Japan*, 9, 145-176.
- Kobayasi, Y. (1941). The genus *Cordyceps* and its allies. *Science Reports of the Tokyo Bunrika Daigaku*, 84, 53-260.
- Kobayasi, Y. (1982). Keys to the taxa of the genera *Cordyceps* and *Torrubiella*. *Transactions of the Mycological Society of Japan*, 23, 329-364.
- Kobayasi, Y., & Shimizu, D. (1963). Monographic studies of *Cordyceps* 2. Group parasitic on Cicadae. *Bulletin of the National Science Museum*, 6(3), 28-314.
- Kobayasi, Y., & Shimizu, D. (1980). *Cordyceps* species from Japan 2. *Bulletin of the National Science Museum*, 6(3), 79-96.
- Kobayasi, Y., & Shimizu, D. (1982). Monograph of the genus *Torrubiella*. *Bulletin of the National Science Museum, Ser. B*, 8, 43-78.
- Peter, W. I., & Myrian, S. T. (2006). Identification and taxonomy of some entomopathogenic *Paecilomyces* spp. (Ascomycota) isolates using rDNA-ITS Sequences. *Genetics and Molecular Biology*, 29(1), 132-136.
- Rehner, S. (2001). *Primers for Elongation Factor 1- α (EF1- α); Insect Biocontrol Laboratory USDA, p.4 1p*. Truy cập ngày 10/03/2021 tại <http://ocid.NACSE.ORG/research/deephyphae/EF1primer.pdf>
- Samson, R. A. (1974). *Paecilomyces and some allied hyphomycetes* (Studies in Mycology, No. 6). Baarn, Netherlands: Centraalbureau voor Schimmel-cultures.

- Samson, R. A. (2004). *Revisiting Paecilomyces and some allied hyphomycetes*. Utrecht, Netherlands: The Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- Samson, R. A., Evans, H. C., & Latge, J. P. (1988). *Atlas of entomopathogenic fungi*. Heidelberg, Berlin & New York, NY: Springer - Verlag.
- Sangdee, A., Sangdee, K., Seephonkai, P., Jaihan, P., & Kanyaphum, T. (2017). Colony characteristics, nucleoside analog profiles, and genetic variations of medicinal fungus *Polycephalomyces nipponicus* (Ascomycetes) isolates from Northeast Thailand. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 19(5), 445-455.
- Sangdee, K., Seephonkai, P., Buranrat, B., Surapong, N., & Sangdee, A. (2016). Effects of ethyl acetate extracts from the *Polycephalomyces nipponicus* isolate cod-MK1201 (Ascomycetes) against human pathogenic bacteria and a breast cancer cell line. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 18(8), 733-743.
- Sheng, L. Z., Fenggang, L., Shi, J. Y., & Shun, C. P. (2017). *Population genetic structure of Isaria cicadae causing enzootic of cicadas nymphs*. Beijing, China: China Academic Journals Online Publishing Database.
- Shi, Z., Pan, H. J., & Fan, L. F. (2009). Advances in research of polysaccharides in *Cordyceps* species. *Food Technol Biotechnol*, 47(3), 304-312.
- Sung, G. H., Sung, J. M., Jones, H. N. L., & Spatafora, J. W. A. (2007). Multi-gene phylogeny of Clavicipitaceae (Ascomycota, Fungi): Identification of localized incongruence using a combinational bootstrap approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44, 1204-1223.
- Tigano-Milani, M. S., Honeycutt, R. J., Lacey, L., Assis, R., McClelland, M., & Sobral, B. W. S. (1995). Genetic variability of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates revealed by molecular markers. *Journal of Invertebrate Pathology*, 65(3), 274-282.
- Tigano-Milani, M. S., Samson, R. A., Martins, I., & Sobral, B. W. S. (1995). DNA markers for differentiating isolates of *Paecilomyces lilacinus*. *Microbiology*, 141, 239-245.
- Vilgalys, R., & Hester, M. (1990). Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology*, 172, 4238-4246. doi:10.1128/jb.172.8.4238-4246.1990
- Vu, L. T., Lao, T. D., Truong, N. B., Dinh, H. M., & Le, T. A. H. (2017). Identification of the entomopathogenic fungi sample DL0069 by combination of morphological and molecular phylogenetic analyses. *Journal of Science and Technology*, 55(1B), 117-123.
- Zeng, W.-B., Yu, H., Ge, F., Yang, J.-Y., Chen, Z.-H., Wang, Y.-B., ... Adams, A. (2014). Distribution of Nucleosides in Populations of *Cordyceps cicadae*. *Molecules*, 19(5), 6123-6141.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). PCR protocols. *Academic Press*, 315-322. doi:10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1

PHỤ LỤC

Kết quả Giải trình tự các gene của mẫu H022

>H022 ITS

CGCCCCTTCTACAGGGGCGTCCGGATCACTACGGCGCCCGCCGCAGGACCCCCAAA
CTCTTTTCGCCTCTCTCCAGGCGTCGGTTTTCTTCTGAGTGAGACCTTTTCTCTCGCG
ACAGCGGGGTGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTGGCAT
CGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAT
CATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCC
GAGCGTCATTTGACCCCTCAGGCCCCCTCTGTAGGGGACTGGTGTGGGGGACGGCAT
CGCTGGGAGGGAGGGGGTCTCTCCCCCTTCTCTCTCCGCCGCCGCCCGAAATAC
AGTGGCGGCCTCGCCGCAGCGACCTCCGCGTAGTAGCACAAACCTCGCGGCCTGGG
AAGCTGGGCGCGGCCACAGCCGTGAAA

>H022_nrLSU

AACCAACAGGGATTGCCCCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAAATTTGA
AATCTGGCCCCCTCCACGGGGGTCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGATGCTTCTGGCGC
GGCGCCTTCCGAGTTCCCTGGAACGGGACGCCACAGAGGGTGAGAGCCCCGTCCGG
TCGGACGCCTAGCCTGTGTGAAGCACCTTCGACGAGTCGGGTAGTTTGGGAATGCTG
CCCTAAATGGGAGGTATATGTCTTCTAAAGCTAAATACCGGCCAGAGACCGATAGC
GCACAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGGGTTAAACAGT
ACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGCTCATGACCAGACTTGGGCCCGGGGATCAC
CCGGCGATCTTTTCGCCGGGGCACTTCGCCGGCTGCCCAGGCCAGCATCAGTTCGCG
GCGGGGGACAAAGGCTTCGGGAACGTGGCTCCCTACGGGGAGTGTTATAGCCCGCT
GCGCAATGCCCTGCCGCGGACTGAGGTTTCGCGCTTCCGCAAGGATGCTGGCGTAAT
GGTCATCAGCGACCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCGTCTTCGTATGCGAGT
GTTTCGGGTGTCAAACCCCTACGCGCAATGAAAGTGAAACGCAGGTGAGAGCTTCGGC
GCATCACCGACCGATCCTGATGTTCTCGGATGGATTTGAGTAAGAGCATACGGGGCC
GGACCCGAAAGAAGGTGAACTATGCCTGTATAGGGTGAAGCCAGAGGAAACTCTGG
TGGAGGCTCGCAGCGGTTCTGACGTGCAAATCGATCGTCAAATATGGGCATGGGGG
CGAAAGACTAATCGAA

>H022_nrSSU

CGCTCGATCAGTGACGGGTGAGCGCCGGCGAGACAACCTGGATCGGGGAAGGCTAA
GGGCCCCAAGAGGGCCTATCGCTGATCCCGAGCAGAGCCCCGCGGCCAGCGTGCTG
AAGGGCCTGTGTAGAGCGCGCCAAGGTGTGCGTCCAGGGCGGGCGAGGGCGTTCCC
TCCCTCCCCTCCCAGGGCTTAAGGTACGTGCCAATCCCCTGCGAAAGCAGGGCCCTG
CGGAATAGCACCCGTCGTGCGAAGCCGTCAGGGGAGGACTCCTACCTAGGCGATGG
CGCCTGGGTAGGTGGCCTCTGTGACGATAGTGGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCT
CCAATAGCGTATATTAAAGTTGTTGTGGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAACCTTGGGCC
TGGCTGGCCGGTCCGCCTCACCGCGTGTACTGGTCCGGCCGGGCCTTTCCCTCTGTG
GAACCCCATGCCCTTCACTGGGCGTGGCGGGGAAACAGGACTTTTACTTTGAAAAA
ATTAGAGTGCTCCAGGCAGGCCTATGCTCGAATACATTAGCATGGAATAATAGAAT
AGGACGTGCGGTTCTATTTTGTGGTTTCTAGGACCGCCGTAATGATTAATAGGGAC
AGTCGGGGGCATCAGTATTCAATTGTCAGAGGTGAAATTCTTGATCTATTGAAGAC
TAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTATTAAATCAGGAACGAAAGTTAG
GGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCGACTAG
GGATCGGGCGATGTTATTTTTTGACTCGCTCGGCACCTTACGAGAA

>H022_Rpb1

TAAGTGCAGCAAGGTGCTGGCCGATAAAGTTGGTCTTACTTGTCTGGAGACTCTTT
TACGACTCACTTGATGCTAACCTGATGTGCTTTCAGAGCGACCCTGAGTTTCTCGCT
GCTATTTCGCACTCGAGATGCGAAGCTTCGCTTTAACCGGGTTTGGGCTGTTTGCAAG
AAGAGGCGTAAGTGCGAGAATGAAGATCGCACAGAGAAGAACGAGGAGGAGTTTA
ACCCAGGAACGAAGCCCGTTGCGCATAATCACGGCGGGCTGCGGCAACGTCCAACCT
CAAGTTCGCCAAGCGGCTTTGCAGCTGAAGGCTGCCTTTGACGTGGTGCAGGAGGA
TGGCCCCAAGAGAAGAGACACGGTGCCTATCACGCCTGAGATGGCCCACGGCATTC
TACGACGCATTTTCGGAAGAAGACTTGGAGAATATGGGTCTCAACGCCGACTATGCA
CGCCCTGAGTGGATGATCATCACCGTCTTGCCAGTTCTCCTCCGCCGGTTTCGCCCTA
GTATCTCGATGGACGGAACAGGTACTGGCATGCGTAACGAGGATGACTTGACATAC
AAGCTTGGCGATATCATCCGCGCCAATGGTAACGTGAAGCAAGCCATCCGCGAAGG
ATCTCCCCAACATATCGCCCCGGGATTTTCGAGGAACTTTGCAGTATCACGTCGCGAC
A

>H022_Tef1

CGCTCTGCTCGCCTACACTCTGGGTGTCAAGCAGCTCATTGTGCGCCATCAACAAGAT
GGACACCGCCAACTGGTCCCAGGATCGTTTCCAGGAAATCGTCAAAGAAACCTCCA
CCTTCATCAAGAAGGTTCGGTTACAACCCCAAGACTGTTCCCTTCGTCCCTATCTCTG
GTTTCCACGGCGACAACATGTTGGAGCCCTCCAAGAACTGCCCTTGGTACAAGGGGT
GGGAGAAGGAGACCAAGGAAGGCAAGGTCACTGGCGACACCCTTCTCAAGGCCATT
GATTCCATCGAAACCCCAAGCGACCTGTCGACAAGCCTCTCCGTCTTCCCCTCCAG
GATGTGTACAAGATTGGCGGTATTGGAACAGTTCCCGTCGGCCGTATCGAGACTGGT
GTCCTCAAGCCCGGTATGGTCGTCACCTTTGCTCCCGCCAATGTCACCACTGAAGTC
AAGTCGGTCGAGATGCACCACGAGCAGCTTCAGGAAGGTCAGCCAGGTGACAACGT
TGGTTTCAACGTGAAGAACGTCTCTGTCAAGGACATTGCGCGTGGCAACGTGCTGG
TGAATCCAAGAACGACCCTCCTCTGGGCTGTGCTTCCTTCGAGGCCAGGTCATCGT
CCTCAACCACCCTGGCCAGGTTCGGCGCTGGCTATGCTCCTGTCCTGGATTGCCACAC
CGCTCACATTGCTTGCAAGTTCCAAGAGCTCCTGGAGAAGATTGATCGACGTACCGG
CAAGGCTACTGAGACCAGCCCCAAGTTCATCAAGTCTGGTGACTCTGCCATCGTCAA
GATGGTCCCCCTCCAAGCCCCATGTGTGGTGGGAGGGCCCTT

