

Ứng dụng phương pháp phá hệ phân tử để định danh mẫu nấm *Cordyceps ninchukispora* thu thập ở LangBiang, Đà Lạt, Lâm Đồng

Molecular phylogenetic analysis to support the identification of *Cordyceps ninchukispora* collected from LangBiang, Dalat, Lam Dong

Phạm Thị Thúy Ngọc^{1,2}, Thiều Hồng Huệ¹, Nguyễn Văn Giang³, Nguyễn Thị Ngọc Thảo²,
Trương Bình Nguyên³, Lê Huyền Ái Thúy¹, Lao Đức Thuận^{1*}

¹Trường Đại học Mở Thành phố Hồ Chí Minh, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Viện Pasteur Thành phố Hồ Chí Minh, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

³Trường Đại học Đà Lạt, Đà Lạt, Việt Nam

*Tác giả liên hệ, Email: thuan.ld@ou.edu.vn

THÔNG TIN

TÓM TẮT

DOI:10.46223/HCMCOUJS.
tech.vi.19.1.3039.2024

Ngày nhận: 25/10/2023

Ngày nhận lại: 03/11/2023

Duyệt đăng: 10/11/2023

Từ khóa:

Cordyceps; LangBiang; nấm;
Ophiocordyceps; phá hệ
phân tử

Nhóm nghiên cứu của Trường Đại học Đà Lạt thuộc tỉnh Lâm Đồng, Việt Nam đã thu thập được mẫu nấm ký sinh từ dãy núi Lang Biang trong chuyến giám sát của nhóm, xác định hình thái ban đầu của loài này là *Cordyceps ninchukispora* có vật chủ là *Beilschmiedia erythrophloia* Hay. DNA đã được chiết tách bằng phương pháp Phenol/Chloroform (pH = 8), sau đó tiến hành thành PCR và giải trình tự của các vùng gen mục tiêu bao gồm *ITS*, *nrSSU*, *nrLSU*, *Tef*, *Rpb1*. Tạo cây phát sinh phân tử bằng việc sử dụng các phương pháp Neighbor joining, Maximum likelihood và Maximum parsimony nhằm xác định mối quan hệ giữa *Cordyceps ninchukispora* và các trình tự tham chiếu. Chúng tôi đã khuếch đại được các vùng gen mục tiêu, đồng thời tiến hành giải trình tự và đã xây dựng một bộ dữ liệu bao gồm 51, 51, 47, 35 và 51 trình tự của *ITS*, *nrSSU*, *nrLSU*, *Tef*, *Rpb1*. Các trình tự này đại diện cho nhiều chi thuộc các họ Ophiocordycipitaceae, Clavicipitaceae, Cordycipitaceae và 02 trình tự thuộc họ Glomerellaceae. Kết quả phân tích phát sinh phân tử đã xác định rằng mẫu nấm thu thập thuộc về chi *Cordyceps* và tạo thành đơn nhóm huyết thống (monophyletic group) với loài tham chiếu *Cordyceps ninchukispora*, với giá trị bootstrap được hỗ trợ cao. Tóm lại, đánh giá phát sinh loài dựa trên bộ dữ liệu đa gen đã hỗ trợ mạnh mẽ cho việc xác định mẫu thu thập được là *Cordyceps ninchukispora*.

ABSTRACT

The research team from Dalat University, Lam Dong, Vietnam, collected entomopathogenic fungi samples from the Lang Biang mountain range during their routine survey. The initial morphological identification of this species indicated it as *Cordyceps ninchukispora*, with *Beilschmiedia erythrophloia* Hay. as the host. DNA was extracted using the Phenol/Chloroform method (pH = 8) and conducted PCR experiments and sequenced the target gene regions, including *ITS*, *nrSSU*, *nrLSU*, *Tef*, and *Rpb1*. Molecular phylogenetic trees were constructed using Neighbor-joining,

Keywords:

Cordyceps; Lang Biang; fungi;
Ophiocordyceps; phylogeny

Maximum likelihood, and Maximum parsimony methods to determine the relationship between *Cordyceps ninchukispora* and reference sequences. We successfully amplified and sequenced the target genes, resulting in a dataset containing 52, 52, 48, 39, and 52 sequences for *ITS*, *nrSSU*, *nrLSU*, *Tef*, and *Rpb1*. These sequences represented various genera within the families Ophiocordycipitaceae, Clavicipitaceae, Cordycipitaceae, and two sequences from the family Glomerellaceae. The results of the molecular phylogenetic analysis showed that the collected fungal sample belonged to the *Cordyceps* genus and formed a monophyletic group with the reference species *Cordyceps ninchukispora*, with high bootstrap support. In conclusion, the multigene dataset-based phylogenetic analysis strongly supported the identification of the collected sample as *Cordyceps ninchukispora*.

1. Giới thiệu

Cordyceps là một chi nấm ký sinh trên côn trùng, thuộc họ Cordycipitaceae. Chi này được phân loại trong bộ Hypocreales, ngành nấm túi Ascomycota, và được mô tả lần đầu bởi Fries vào năm 1818 (Shrestha & ctg., 2014). Chúng tìm thấy trên nhiều loài côn trùng khác nhau trong bộ Arthropoda bao gồm Araneae, Coleoptera, Dermaptera, Hemiptera, Hymenoptera, Lepidoptera và Orthoptera, trong đó Coleoptera và Lepidoptera là hai bộ quan trọng nhất chứa hơn 200 loài *Cordyceps* được ghi nhận (Shrestha & ctg., 2016). Tổng cộng, chi *Cordyceps* hiện có khoảng 750 loài được biết đến và chúng phân bố trên khắp thế giới, tuy nhiên, chúng chủ yếu được tìm thấy ở Nam Á, châu Âu và Bắc Mỹ. Những loài này là nguồn tài nguyên vô giá, được sử dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau như thực phẩm và dược phẩm. *Cordyceps* chứa hơn 200 hợp chất sinh học có giá trị trong thực phẩm, dược phẩm và tiềm năng điều trị nhiều bệnh lý. Trong nhóm này, loài nổi tiếng nhất là *Cordyceps sinensis* và nhiều loài khác, như *Cordyceps militaris*, *Cordyceps pseudomilitaris*, *Cordyceps ophioglossoides* và *Cordyceps heteropoda* cũng có tiềm năng điều trị bệnh lý (Olatunji & ctg., 2018; Qu, Li, Li, & Zhao, 2022). Tại Việt Nam, chiết xuất từ *Cordyceps militaris* đã được sử dụng để đẩy nhanh quá trình phát triển của tế bào da và tái tạo vùng da bị tổn thương, đồng thời đã được nghiên cứu trên mô hình chuột để đánh giá hiệu quả của sản phẩm này. (Nguyen, Vo, Nguyen, Nguyen, & Le, 2022). Để bảo vệ các loài thuộc chi *Cordyceps* khỏi nguy cơ do thu hoạch không bền và đảm bảo chất lượng trong sản phẩm *Cordyceps*. Vì có rất ít thông tin có sẵn về các loài khác của chi *Cordyceps*, cho nên việc nghiên cứu về *Cordyceps* không chỉ có ý nghĩa tích cực trong việc bảo vệ loài nấm này mà còn có ý nghĩa đối với nghiên cứu về sự đa dạng sinh học trong tự nhiên.

Cordyceps ninchukispora tên gốc là *Phytocordyceps ninchukispora* được tìm thấy dưới lòng đất hoặc trong tầng lá rụng có vật chủ là *Beilschmiedia erythrophloia* (Su & Wang, 1986; Sung & ctg., 2007). *Cordyceps ninchukispora* tác dụng đối với ức chế trình trạng viêm và đã được nghiên cứu có nhiều ứng dụng trong y tế (Chang & ctg., 2017). Cho đến nay, thông tin về loài nấm này vẫn chưa đầy đủ, cụ thể là về dữ liệu phân tử dùng để định danh loài bằng phương pháp phân tử. Vì vậy, trên cơ sở áp dụng thành tựu từ các nghiên cứu trước, chúng tôi đã thực hiện phân tích dựa trên dữ liệu phân tử để xây dựng cây phát sinh phân tử nhằm xác định mẫu thu thập được là *Cordyceps ninchukispora*. Phương pháp này bao gồm phân tích từng gen cụ thể và kết hợp dữ liệu từ 05 gen mục tiêu đơn lẻ, cụ thể là *ITS*, *nrLSU*, *nrSSU*, *rpb1*, *tef*.

2. Vật liệu, phương pháp nghiên cứu

2.1. Thu thập mẫu nấm

Mẫu được định danh hình thái là *Cordyceps ninchukispora* và được thu thập ở Lang Biang, Đà Lạt, Lâm Đồng (Vĩ độ 12° 2' 19.0", Kinh độ 108° 26' 04.7", độ cao 1680m) trong các đợt giám sát định kỳ nhằm khảo sát sự đa dạng của các loài nấm ký sinh ở côn trùng (Hình 1). Mẫu thu thập được quán lại bằng giấy đặt vào hộp chứa mẫu bảo quản, mã hóa và chuyển mẫu về phòng thí nghiệm để tiến hành phân tích.



Hình 1. Mẫu nấm *Cordyceps ninchukispora*

Mô tả hình thái: Mẫu nấm được phát hiện trong lớp lá mục của rừng cây lá rộng khu vực Bidoup - Núi Bà. Quả thể mọc thành đám từ bọc trứng (ấu trùng) của Lepidoptera. Quả thể có màu cam sáng, kích thước có thể lên đến 55mm. Vùng sinh sản nằm trên đỉnh của quả thể, màu cam sáng, 15mm - 23mm (dài) × 1mm - 2mm (rộng), hình dạng hơi thay đổi. Cuống nấm màu đỏ cam, 20mm - 30mm (dài) × 1mm (rộng). Thể chén nhô cao lên khỏi bề mặt quả thể, hình trứng kéo dài, xếp khá dày, cấu trúc vuông góc với trục quả thể; kích thước lên đến 45 vạch (dài) × 15 vạch (rộng) (10X). Túi bào tử dạng trụ, 70 - 110 vạch (dài) × 1.5 vạch (rộng) (40X). Bào tử túi thường không đứt rời thành từng bào tử riêng biệt, chiều dài gần như tương đương với túi.

2.2. Tách chiết DNA và PCR khuếch đại vùng gen mục tiêu

DNA bộ gen được tách chiết bằng phương pháp phenol/chloroform (pH = 8) có bổ sung β -mercaptoethanol và CTAB (Chomczynski, 1993). Lấy 1.5g mẫu nấm cho vào dung dịch lysis buffer có chứa 70 μ l Tris-HCl 1M pH 8.0, 392 μ l NaCl 2.5M, 140 μ l CTAB 10%, 14 μ l β -mercaptoethanol 99.9%, 14 μ l dd H₂O, 70 μ l Proteinase K 1 mg/ml và ủ qua đêm ở 65°C. Tiếp theo thu dịch nổi và bổ sung dung dịch PCI (phenol/chloroform/isoamylalcohol tỷ lệ 25:24:1) và tiến hành ly tâm 13,000 vòng/phút trong thời gian 10 phút. Sau đó, lớp trên cùng của dung dịch được kết tủa bằng ethanol 99% và tủa DNA bằng phương pháp Isopropanol. DNA được xác định nồng độ bằng phương pháp đo OD₂₆₀. DNA đã tách chiết được lưu trữ trong Tris-EDTA và bảo quản ở -20°C.

Cặp mồi đặc hiệu dùng để khuếch đại cho các gen mục tiêu (*ITS*, *nrSSU*, *nrLSU*, *Tef*, *Rpb1*) được thể hiện trong Bảng 1. Phản ứng PCR cuối cùng có tổng thể tích là 15 μ L và được tiến hành với chu trình nhiệt cụ thể là: 01 chu kỳ ở 95°C 05 phút; 40 chu kỳ bao gồm: 94°C 30 giây; X°C 30 giây; 72°C 01 phút; và 01 chu kỳ ở 72°C 05 phút. Tiến hành điện di trên gel agarose 2.0% các sản phẩm thu được. Sau đó, sản phẩm đã khuếch đại được giải trình tự sử dụng phương pháp Sanger.

Bảng 1

Trình tự các cặp môi sử dụng trong nghiên cứu

<i>Gen</i>	<i>Tên môi</i>	<i>Trình tự (5' - 3')</i>	<i>X (°C)</i>	<i>Tài liệu tham khảo</i>
<i>nrLSU</i>	LR0R (F)	GTACCCGCTGAACTTAAGC	55	(Vilgalys & Sun, 1994)
	LR5 (R)	ATCCTGAGGGAAACTTC		
<i>nrSSU</i>	NS1 (F)	GTAGTCATATGCTTGTCTC	42.2	(White, Bruns, Lee, & Taylor, 1990)
	NS4 (R)	CTTCCGTCAATTCCTTAAG		
<i>Rpb1</i>	CRPB1 (F)	CCWGGYTTYATCAAGAARGT	55	(Castlebury, Rossman, Sung, Hyten, & Spatafora, 2004)
	RPB1C (R)	CCNGCDATNTRTRTCCATRRA		
<i>ITS</i>	ITS1F (F)	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	55	(White & ctg., 1990)
	ITS4 (R)	TCCTCCGCTTATTGATATGC		
<i>Tef</i>	983F (F)	GCYCCYGGHCA YCGTGAYTTYAT	55	(White & ctg., 1990)
	2218R (R)	ATGACACCRACRGCACRGTGTG		

Trong đó, Y = C/T, D = A/G/T, W = A/T, R = A/G, H = A/C, K = G/T, I = A/C/G, N = anybase; F: Môi xuôi; R: Môi ngược; X (°C) là nhiệt độ bắt cặp đề xuất

2.3. Phân tích phả hệ phân tử

Thông tin tham khảo về các gen mục tiêu *ITS*, *nrSSU*, *nrLSU*, *Tef*, *Rpb1* đã được thu thập từ Genbank (NCBI) dựa trên dữ liệu được công bố trước đó từ nghiên cứu của Sung và cộng sự công bố năm 2007 (Sung & ctg., 2007). Tất cả các trình tự đã được thu thập cùng với thông tin về tên loài và số truy cập (Accession number). Trình tự các gen mục tiêu trong các mẫu nấm cần được hiệu chỉnh để loại bỏ các tín hiệu không rõ ở cả hai đầu sau khi giải trình tự bằng phần mềm BioEdit 7.7.1. Sau đó, các cây phát sinh chủng loại phân tử được xây dựng bằng các phương pháp phân tích phát sinh loài như Neighbor Joining (NJ), Maximum Parsimony (MP) và Maximum Likelihood (ML) theo hướng dẫn của phần mềm MEGA X.

3. Kết quả**3.1. Kết quả khuếch đại các vùng gen mục tiêu: *nrSSU*, *nrLSU*, *ITS*, *Rpb1*, *Tef***

Mẫu nấm đã thu thập được xác định sơ bộ về mặt hình thái là *Cordyceps ninchukispora*. Sau đó, DNA bộ gen được tách chiết và các trình tự mục tiêu được khuếch đại theo mô tả ở trên. DNA đã khuếch đại được điện di trên gel agarose 2.0%, cho thấy có dải rõ ràng với độ dài khoảng 950bp, 1,102bp, 803bp, 700bp và 1,030bp tương ứng cho các gen mục tiêu *nrLSU*, *nrSSU*, *rpb1*, *ITS* và *tef*. Các DNA sau khi khuếch đại thành công đã được giải trình tự. Đồng thời, các trình tự thu được đã qua kiểm tra và hiệu chỉnh các tín hiệu không rõ ràng. Kết quả có được là, các tín hiệu trình tự từ các chuỗi gen mục tiêu đã trở nên rõ ràng và dễ đọc (dữ liệu không được hiển thị). Dựa vào kết quả BLAST (NCBI), các trình tự của *nrLSU*, *nrSSU*, *rpb1*, *ITS* và *tef* của mẫu nấm đã thu thập đã cho thấy độ tương đồng (> 60%) với các trình tự của *Cordyceps ninchukispora* (FJ765271).

3.2. Phân tích phát sinh loài phân tử

Các trình tự của 05 gen (*nrLSU*, *nrSSU*, *Rpb1*, *ITS* và *tef*) bao gồm tổng cộng 51, 51, 47, 35, và 51 loài đại diện cho các chi trong họ *Ophiocordycipitaceae*, *Clavicipitaceae* và

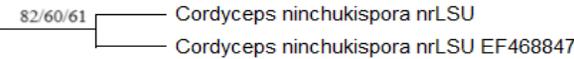
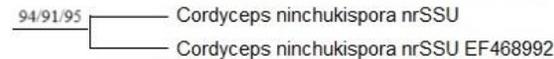
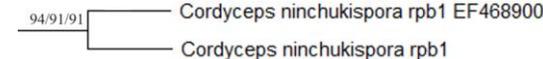
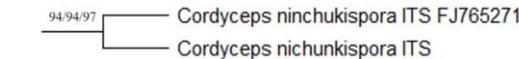
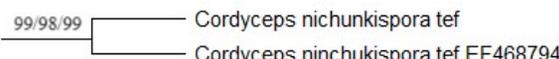
Cordycipitaceae, và 02 trình tự *Glomerella cingulata* được sử dụng với vai trò là nhóm ngoại. Bên cạnh đó, dựa trên danh sách các gen mục tiêu riêng lẻ, một bộ dữ liệu gồm 05 gen kết hợp 32 loài đại diện đã được tạo ra.

Các mô hình tiến hóa phù hợp nhất cho *nrLSU*, *nrSSU*, *Rpb1*, *ITS* và *tef*, cũng như bộ dữ liệu ghép đa gen *nrLSU-nrSSU-Rpb1-ITS-tef* được xác định bằng phần mềm MEGA X (Bảng 2). Cây phát sinh loài phân tử đã được dựng bằng cách áp dụng các phương pháp phân tích NJ, MP, ML với số lần lặp lại là 1,000 lần. Các phương pháp phân tích NJ, ML và MP đơn gen và đa gen đều mang lại kết quả tương tự và chứng minh cho mối quan hệ giữa *Cordyceps ninchukispora* và các loài khác. Cụ thể, các trình tự loài được chia thành ba nhóm chính: *Cordycipitaceae* (*Cordyceps*, *Lecanicillium*, *Simplicillium*), *Clavicipitaceae* (*Claviceps*, *Metacordyceps*), *Ophycordycipitaceae* (*Ophiocordyceps*) và phân tách với nhóm ngoại. Kết quả phân tích cho thấy mẫu *Cordyceps ninchukispora* tạo thành nhóm đơn huyệt thống (monophyletic group) với loài tham chiếu *Cordyceps ninchukispora* với giá trị bootstrap được hỗ trợ cao (> 90% cho phân tích đơn gen và phân tích đa gen bằng phương pháp NJ/MP/ML) (Hình 1 và Hình 2).

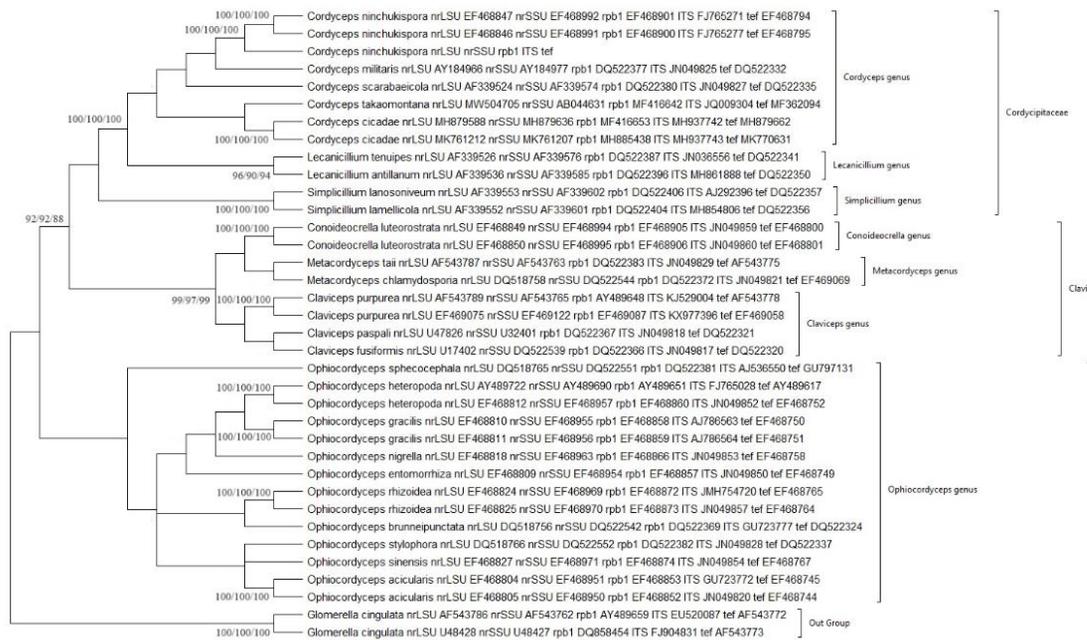
Bảng 2

Mô hình tiến hóa phù hợp nhất cho phân tích các gen mục tiêu

Gen	Mô hình
<i>nrLSU</i>	TN93+G, BIC = 7311.600, AICc = 6359.388, InL = -3062.151
<i>nrSSU</i>	K2+G+I, BIC = 7368.446, AICc = 6365.534, InL = -3068.500
<i>Rpb1</i>	T92+G+I, BIC = 15940.705, AICc = 15084.155, InL = -7436.647
<i>ITS</i>	K2+G, BIC = 5568.734, AICc = 4952.939, InL = -2390.769
<i>Tef</i>	TN93+G+I, BIC = 13929.656, AICc = 12912.903, InL = -6336.042
<i>nrLSU-nrSSU-Rpb1-ITS-tef</i>	TN93+G+I, BIC = 29371.289, AICc = 28675.325, InL = -14261.5

Gen	Giá trị Bootstrap
<i>nrLSU</i>	
<i>nrSSU</i>	
<i>Rpb1</i>	
<i>ITS</i>	
<i>Tef</i>	

Hình 2. Mẫu thu thập được xếp vào cùng một nhóm với *Cordyceps ninchukispora* với ủng hộ của tỷ lệ bootstrap



Hình 3. Phân tích phát sinh loài phân tử đa gen *nrLSU-nrSSU-Rpb1-ITS-tef* và đánh giá bằng Maximum Likelihood với 1,000 lần phân tích bootstrap. Giá trị của mỗi nhánh tương ứng với các phương pháp NJ/MP/ML

4. Thảo luận

Là một phần của nghiên cứu về sự đa dạng của nấm ký sinh côn trùng, các mẫu được thu thập ở khu vực miền núi LangBiang, Đà Lạt, Lâm Đồng, nơi có hệ động vật, thực vật phong phú do khí hậu nhiệt đới gió mùa nóng, ẩm ướt. Để làm rõ hơn về kết quả định danh hình thái của mẫu đã thu thập là *Cordyceps ninchukispora*, việc xây dựng cây phát sinh đơn gen cho các *nrLSU*, *nrSSU*, *Rpb1*, *ITS*, *tef* và đã gen *nrLSU-nrSSU-Rpb1-ITS-tef* đã được thực hiện để tăng độ tin cậy cho định danh hình thái. Quá trình này dựa vào sự hiểu biết về mối quan hệ trong các nhóm nấm cụ thể, điều này rất quan trọng đối với các nghiên cứu phát sinh chủng loại phân tử vì nó có liên quan đến tiến trình tiến hóa của chúng. Hiện tại, dữ liệu phân tử của các đơn gen *nrLSU*, *nrSSU*, *Rpb1*, *ITS* và *tef* được sử dụng để tạo điều kiện thuận lợi cho việc phân loại nấm. Việc áp dụng phân tích đa gen *nrLSU-nrSSU-Rpb1-ITS-tef* cho thấy kết quả tương đồng hoặc mẫu thu thập được chính là *Cordyceps ninchukispora* với giá trị bootstrap rất cao (bootstrap ≥ 99), qua đó củng cố kết quả định danh hình thái đã thực hiện. Điều này rất quan trọng trong việc mở rộng thông tin về sự đa dạng của các loài nấm gây bệnh và quá trình tiến hóa của chúng trong môi trường sống tự nhiên ở Lang Biang, Đà Lạt, Lâm Đồng.

5. Kết luận

Nghiên cứu đã áp dụng thành công trong việc áp dụng phân tích phát sinh và đánh giá dựa trên phân tích đa gen như *nrLSU*, *nrSSU*, *Rpb1*, *ITS* và *tef* để xác định các mẫu thu thập từ Lang Biang, Đà Lạt, Lâm Đồng là loài *Cordyceps ninchukispora* bằng cách kết hợp thông tin dựa trên dữ liệu hình thái và dữ liệu phân tử.

LỜI CẢM ƠN

Chúng tôi xin gửi lời cảm ơn đề tài nghiên cứu khoa học cấp trường mã số E2019.04.1 và đề tài nghiên cứu khoa học cấp Bộ mã số CT 2022.02 đã cấp kinh phí để thực hiện nghiên cứu.

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. doi:10.1017/S0953756204000607
- Chang, H.-S., Cheng, M.-J., Wu, M.-D., Chan, H.-Y., Hsieh, S.-Y., Lin, C.-H., ... Chen, I.-S. (2017). Secondary metabolites produced by an endophytic fungus *Cordyceps ninchukispora* from the seeds of *Beilschmiedia erythrophloia* Hayata. *Phytochemistry Letters*, 22(1), 179-184. doi:10.1016/j.phytol.2017.08.005
- Chomczynski, P. (1993). A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques*, 15(3), 532-534, 536-537.
- Nguyen, L. T. T., Vo, H. T., Nguyen, K. D., Nguyen, C. M., & Le, C. U. (2022). Effects of *Cordyceps militaris* extract and its mixture with silica nanoparticles on burn wound healing on a mouse model. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 67(1), 102901-101904. doi:10.1016/j.jddst.2021.102901
- Olatunji, O. J., Tang, J., Tola, A., Auberon, F., Oluwaniyi, O., & Ouyang, Z. (2018). The genus *Cordyceps*: An extensive review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Fitoterapia*, 129(1), 293-316. doi:10.1016/j.fitote.2018.05.010
- Qu, S.-L., Li, S.-S., Li, D., & Zhao, P.-J. (2022). Metabolites and their bioactivities from the genus *cordyceps*. *Microorganisms*, 10(8), 1489-1509. doi:10.3390/microorganisms10081489
- Shrestha, B., Tanaka, E., Han, G., Oh, J., Han, K., Lee, H., & Sung, H. (2014). A brief chronicle of the genus *cordyceps* Fr., the oldest valid genus in *cordycipitaceae* (Hypocreales, Ascomycota). *Mycobiology*, 42(2), 93-99. doi:10.5941/MYCO.2014.42.2.93
- Shrestha, B., Tanaka, E., Hyun, M. W., Han, J.-G., Kim, C. S., Jo, J. W., ... Sung, G.-H. (2016). Coleopteran and lepidopteran hosts of the entomopathogenic genus *Cordyceps* sensu lato. *Journal of Mycology*, 2016(2), 1-14. doi:10.1155/2016/7648219
- Su, C. H., & Wang, H. H. (1986). *Phytocordyceps*, a new genus of the *Clavicipitaceae*. *Mycotaxon*, 26, 337-344.
- Sung, G.-H., Hywel-Jones, N. L., Sung, J.-M., Jennifer Luangsa-ard, J., Shrestha, B., Spatafora, J. W., ... dermapterigena Liang, O. Z. (2007). Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the *Clavicipitaceae* fungi. *Studies in Mycology*, 57, 5-59. doi:10.3114/sim.2007.7.01
- Vilgalys, R., & Sun, B. L. (1994). Ancient and recent patterns of geographic speciation in the oyster mushroom *Pleurotus* revealed by phylogenetic analysis of ribosomal DNA sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(10), 4599-4603. doi:10.1073/pnas.91.10.4599
- White, T., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols*, 315-322. doi:10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1

