

Nghiên cứu chọn giống nấm *Cordyceps militaris* mang gen giới tính đơn cho năng suất, chất lượng quả thể cao và ổn định

Vũ Xuân Tạo^{1*}, Trần Bảo Trâm¹, Đào Ngọc Ánh¹, Trương Thị Chiên¹, Bùi Lan Phương², Đỗ Thị Kim Trang¹

¹Trung tâm Sinh học Thực nghiệm, Viện Ứng dụng Công nghệ, Bộ Khoa học và Công nghệ, C6 Thanh Xuân Bắc, phường Thanh Xuân Bắc, quận Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

²Trường THPT Chuyên Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 182 Lương Thế Vinh, phường Thanh Xuân Bắc, quận Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 25/6/2024; ngày chuyển phản biện 27/6/2024; ngày nhận phản biện 12/7/2024; ngày chấp nhận đăng 18/7/2024

Tóm tắt:

Nấm dược liệu *Cordyceps militaris* được sử dụng phổ biến trong y học truyền thống và thực phẩm ở các nước châu Á. Loài nấm này đang được nuôi trồng quy mô lớn tại nhiều nước như Trung Quốc, Hàn Quốc, Thái Lan, Việt Nam... Tuy nhiên, việc nuôi trồng quả thể nấm *C. militaris* đang phải đối mặt với tình trạng thoái hóa giống qua các thế hệ nuôi trồng. Gen giới tính *MATI-1-1* và *MATI-2-1* được xác định giữ vai trò quan trọng trong quá trình hình thành quả thể và thoái hóa ở nấm *C. militaris*. Nghiên cứu này đã xác định được gen giới tính *MATI-1-1* và *MATI-2-1* ở sáu chủng nấm *C. militaris* đang được nuôi trồng tại Việt Nam. Bốn chủng nấm (TN04, SH01, SH02 và SH04) mang cả hai gen giới tính *MATI-1-1* và *MATI-2-1*, hai chủng nấm (TN03 và SH06) chỉ mang gen giới tính *MATI-1-1*. Các chủng nấm *C. militaris* nuôi trồng tại các đơn vị được ghi nhận xảy ra hiện tượng thoái hóa giống mạnh là các chủng nấm mang cả hai gen giới tính *MATI-1-1* và *MATI-2-1*. Trong sáu chủng nấm *C. militaris*, đã tuyển chọn được hai chủng nấm TN03 và SH06 cho năng suất quả thể và hàm lượng cordycepin trong quả thể cao vượt trội. Năng suất sinh học của hai chủng nấm TN03 và SH06 tương ứng đạt 14,36 và 16,7%. Hàm lượng cordycepin trong quả thể của hai chủng nấm trên tương ứng là 14 và 13,97 mg/g quả thể khô. Đặc biệt, hai chủng nấm TN03 và SH06 cho năng suất quả thể và hàm lượng cordycepin trong quả thể cao và ổn định qua năm thế hệ nuôi trồng. Đây là các chủng nấm *C. militaris* chất lượng cao và có thể sử dụng trong sản xuất quy mô công nghiệp.

Từ khóa: *Cordyceps militaris*, *MATI-1-1*, *MATI-2-1*, quả thể, thoái hóa.

Chỉ số phân loại: 1.6, 4.6

Research on selecting high and stable yield and fruiting body quality strains of *Cordyceps militaris* mushroom carrying a single mating-type gene

Xuan Tao Vu^{1*}, Bao Tram Tran¹, Ngoc Anh Dao¹, Thi Chien Truong¹, Lan Phuong Bui², Thi Kim Trang Do¹

¹Center for Experimental Biology, National Center for Technological Progress, Ministry of Science and Technology, C6 Thanh Xuan Bac, Thanh Xuan Bac Ward, Thanh Xuan District, Hanoi, Vietnam

²HUS High School for Gifted Students, University of Science, Vietnam National University - Hanoi, 182 Luong The Vinh Street, Thanh Xuan Bac Ward, Thanh Xuan District, Hanoi, Vietnam

Received 25 June 2024; revised 12 July 2024; accepted 18 July 2024

Abstract:

The medicinal mushroom *Cordyceps militaris* is commonly used in traditional medicine and utilised as food in Asian countries. This mushroom is being cultivated on a large scale in many countries, including China, Korea, Thailand, Vietnam, etc. However, the cultivation of *C. militaris* fruiting bodies is facing degeneration through cultivation batches. The mating-type genes (*MATI-1-1* and *MATI-2-1*) have been identified as playing important roles in the fruiting body formation and degeneration processes in *C. militaris*. This study identified the *MATI-1-1* and *MATI-2-1* genes in six strains of *C. militaris* currently being cultivated in Vietnam. Four strains (TN04, SH01, SH02 and SH04) possessed both the *MATI-1-1* and *MATI-2-1* genes, while the other two strains (TN03 and SH06) had only the *MATI-1-1* gene. The mushrooms were cultivated for production with great degeneration carry both the *MATI-1-1* and *MATI-2-1* mating-type genes. Among the six strains of *C. militaris*, two strains (TN03 and SH06) were selected for their superior fruiting body yield and cordycepin content. The biological efficiencies of the TN03 and SH06 strains were 14.36 and 16.7%, respectively. The cordycepin contents in the fruiting bodies of these two strains were 14 and 13.97 mg/g of dried fruiting bodies, respectively. Notably, the two strains TN03 and SH06 produced high and stable fruiting body yields and cordycepin contents over five generations of cultivation. These high-quality *C. militaris* strains are suitable for industrial-scale production.

Keywords: *Cordyceps militaris*, degeneration, fruiting body, *MATI-1-1*, *MATI-2-1*.

Classification numbers: 1.6, 4.6

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

1. Đặt vấn đề

Cordyceps militaris là một loại nấm dược liệu nổi tiếng, đã được chứng minh có nhiều hoạt tính sinh học quý như điều hòa miễn dịch, kháng viêm, chống ung thư, hỗ trợ điều trị tiểu đường, đột quỵ và một số bệnh tim mạch. *C. militaris* được sử dụng trong y học cổ truyền ở châu Á và trở nên phổ biến ở châu Âu và châu Mỹ trong những năm gần đây [1, 2]. Cordycepin - hoạt chất chính được quan tâm nhiều trong nấm *C. militaris* với tiềm năng trong phát triển các loại thuốc hỗ trợ điều trị các bệnh do virus, nấm hay ung thư [3, 4]. Do vậy hiện nay, nấm *C. militaris* được nuôi trồng phổ biến với quy mô lớn ở nhiều nước như Trung Quốc, Hàn Quốc, Nhật Bản, Thái Lan, Việt Nam... làm nguyên liệu thực phẩm và dược phẩm. Tại Việt Nam, việc nuôi trồng quả thể nấm *C. militaris* đang phát triển với nhiều cơ sở sản xuất quy mô lớn ở nhiều tỉnh, thành phố như Hà Nội, Lai Châu, Bắc Ninh, Thái Nguyên, Lâm Đồng... cung ứng cho thị trường trong và ngoài nước. Nhiều nhóm nghiên cứu tại Việt Nam đã thực hiện tối ưu điều kiện nuôi trồng nấm *C. militaris* cho năng suất sinh học đạt 11,6-11,9% và hàm lượng cordycepin trong quả thể đạt 4,33-4,54 mg/g [5-7]. Tuy nhiên, năng suất và chất lượng quả thể nấm *C. militaris* đạt được chưa cao. Hơn nữa, việc nuôi trồng nấm *C. militaris* đang phải đối mặt với sự thoái hóa nhanh của các chủng giống. Biểu hiện thoái hóa ở nấm *C. militaris* có thể nhìn thấy ngay ở hiện tượng giảm hoặc mất khả năng hình thành quả thể. Sự thoái hóa cũng dẫn đến tốc độ tăng trưởng của nấm chậm hơn, chu kỳ sinh trưởng của nấm kéo dài và hàm lượng các chất chuyển hóa thứ cấp giảm xuống [8, 9]. Như vậy, thoái hóa giống ảnh hưởng trực tiếp tới năng suất và chất lượng nấm, gây tổn thất về kinh tế cho hoạt động sản xuất nấm *C. militaris*.

Hiện nay, các nghiên cứu về nấm *C. militaris* chủ yếu tập trung vào nuôi trồng nhân tạo, tách chiết các thành phần có hoạt tính sinh học và đánh giá tác dụng dược lý của các thành phần đó. Các nghiên cứu về sự thoái hóa của nấm *C. militaris* còn rất hạn chế. Một số nghiên cứu về cơ chế hình thành quả thể ở nấm *C. militaris* cho thấy, quả thể nấm được hình thành theo cơ chế sinh sản hữu tính và được điều hòa bởi gen giới tính *MAT*. Locus gen giới tính bất cặp tồn tại ở hai dạng đối ngược nhau là *MAT1-1* và *MAT1-2* ở trên 2 bào tử khác nhau [10]. Locus *MAT1-1* chứa 2 gen *MAT1-1-1* và *MAT1-1-2*, trong khi locus *MAT1-2* chỉ chứa gen *MAT1-2-1*. Hoạt động của hệ thống gen giao phối này dẫn đến sự hình thành quả thể nấm hoàn chỉnh [11]. T.X. Vu và cs (2023) [12] đã tiến hành nghiên cứu về hiện tượng thoái hóa ở các chủng nấm *C. militaris* mang cả 2 gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1* cho thấy, các chủng nấm này xảy ra hiện tượng thoái hóa mạnh ngay từ thế hệ thứ 3. Thông qua việc nghiên cứu phân lập các chủng nấm mang đơn gen giới tính từ các mẫu quả thể và phối trộn 2 loại bào tử có giới tính đối ngược nhau cho thấy, sự mất cân bằng tỷ lệ 2 loại bào tử này hay cụ thể là sự tăng quá mức của tỷ lệ bào tử mang gen *MAT1-2-1* dẫn tới hiện tượng thoái hóa mạnh. Đây được

coi là nguyên nhân chính gây ra hiện tượng thoái hóa ở các chủng nấm *C. militaris* sinh sản hữu tính. Trong khi đó, một số nghiên cứu đáng chú ý cho thấy tồn tại các chủng nấm thuộc loài *C. militaris*, *C. takaomontana* và *C. cardinalis* chỉ mang locus gen *MAT1-1* đơn lẻ cũng có khả năng hình thành quả thể [13-15]. Các chủng nấm này không có gen *MAT1-2-1* dẫn tới không xảy ra hiện tượng mất cân bằng tỷ lệ 2 loại bào tử mang gen *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1*. Như vậy rất có thể các chủng nấm *C. militaris* mang gen giới tính đơn sẽ hạn chế được hiện tượng thoái hóa giống xảy ra. Việc đánh giá khả năng thoái hóa của các chủng nấm *C. militaris* mang gen giới tính đơn so với các chủng nấm mang cả 2 gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1* sẽ giúp xác định được giải pháp chọn giống nấm *C. militaris* có năng suất và chất lượng ổn định. Các chủng nấm *C. militaris* mang gen giới tính đơn có năng suất và chất lượng ổn định rất cần thiết trong sản xuất quy mô lớn.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Sáu chủng nấm *C. militaris* được thu thập tại các cơ sở nuôi trồng nấm tại Thái Nguyên và Hà Nội. Toàn bộ các chủng nấm đã được xác nhận thuộc loài *C. militaris* dựa trên trình tự vùng ITS của rDNA. Trình tự ITS của 6 chủng nấm này đã được đăng ký trên GenBank - NCBI với mã số tương ứng cho từng chủng: TN03 (OQ674702.1); TN04 (OQ674703.1); SH01 (OQ674705.1); SH02 (OQ674708.1); SH04 (OQ676497.1); SH06 (OQ674711.1). Chủng nấm *C. militaris* QN6 đã được công bố mang cả 2 gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1* [16] được sử dụng để so sánh khả năng thoái hóa với các chủng nấm *C. militaris* mang gen giới tính đơn xác định trong nghiên cứu này. Các chủng nấm đang được lưu giữ tại Phòng thí nghiệm của Trung tâm Sinh học thực nghiệm - Viện Ứng dụng Công nghệ (Bộ Khoa học và 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
MAT1-1-1-F	ATGGAACACAGATCGAGCGACAC	457	[17]
MAT1-1-1-R	ATATACCTTCGCGATCATTGCCCGAG		
MAT1-2-1-F	TGTTTTGT CGCGATGGTTCTGG	368	[17]
MAT1-2-1-R	CCTCTGGAGGTTCTGCAITCCA		

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp xác định gen *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1* ở các chủng nấm *Cordyceps militaris*: Các chủng nấm *C. militaris* được nuôi trong môi trường khoai tây dạng lỏng (PDB) (lắc 200 vòng/phút ở 25°C trong 3 ngày) để thu hệ sợi nấm dùng cho tách chiết DNA tổng số. Quy

trình tách chiết DNA tổng số từ hệ sợi nấm được thực hiện theo quy trình của V.T. Tran và cs (2017) [18]. Mẫu DNA tổng số 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). Chu trình nhiệt của phản ứng khuếch đại gen như sau: 94°C (3 phút); 30 chu kỳ của 94°C (30 giây), 58°C (30 giây), 72°C (40 giây); 72°C (10 phút). Gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1* của các chủng nấm *C. militaris* được xác định dựa trên kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 0,8%.

Phương pháp nhân giống nấm *Cordyceps militaris* dạng dịch thể qua 5 thế hệ liên tiếp: Quy trình nhân giống nấm *C. militaris* dạng dịch thể được thực hiện theo T.X. Vu và cs (2023) [12]. Bào tử các chủng nấm *C. militaris* được dùng để cấy chuyển liên tiếp trên môi trường thạch PDA để thu bào tử liên tục 5 thế hệ. Bào tử chủng ban đầu được nuôi cấy và thu bào tử (F1), bào tử F1 tiếp tục được nuôi cấy và thu bào tử (F2). Chu kỳ này được lặp lại để có các thế hệ tiếp theo (F3, F4, F5). Quy trình thu dịch bào tử từ đĩa PDA nuôi nấm được thực hiện theo T.X. Vu và cs (2023) [12]. Dịch bào tử của từng thế hệ (1 ml 10⁶ bào tử/ml) được cấy vào bình nuôi giống lỏng chứa 100 ml môi trường PDB có bổ sung 0,1% peptone. Giống lỏng được nuôi lắc 150 vòng/phút trong 3 ngày trong tối ở 22-25°C.

Phương pháp đánh giá năng suất quả thể của các chủng nấm *Cordyceps militaris* qua 5 thế hệ liên tiếp: Để đánh giá năng suất quả thể của các chủng nấm *C. militaris* qua 5 thế hệ liên tiếp, các chủng nấm được nuôi trồng dựa theo quy trình của T.X. Vu và cs (2023) [12]. 3-4 ml dịch giống nấm ở mỗi thế hệ được cấy đều lên bề mặt giá thể đựng trong hộp nhựa hình trụ có thể tích 650 ml (Song Long, Việt Nam). Thành phần giá thể trong 1 hộp nuôi gồm: 30 g gạo lứt huyết rồng và 60 ml dịch dinh dưỡng. Thành phần 1 lít dịch dinh dưỡng: 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. Tất cả môi trường được hấp khử trùng ở 121°C trong 20 phút và để nguội. Sau khi cấy giống, hộp nuôi được đặt trong tối 5 ngày, ở 25°C để hệ sợi nấm mọc một lớp mỏng trên toàn bộ bề mặt giá thể. Hộp nuôi nấm được chuyển qua giai đoạn hình thành quả thể ở điều kiện chiếu sáng 12 giờ/ngày (500 Lux) ở 22-23°C, độ ẩm 85-90% trong 60 ngày. Thí nghiệm nuôi quả thể được thực hiện trên 50 hộp nuôi cho 1 thế hệ, lặp lại 3 lần độc lập. Chỉ tiêu theo dõi gồm: (1) khối lượng quả thể tươi/hộp nuôi thể tích 650 ml và (2) năng suất sinh học (Biological Efficiency - BE) [19].

Phương pháp phân tích hàm lượng cordycepin trên hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC): Hàm lượng cordycepin trong quả thể nấm *C. militaris* được xác định trên hệ thống HPLC theo T.X. Vu và cs (2024) [4]. Quả thể nấm *C. militaris* tươi được sấy khô trên thiết bị sấy thăng hoa ở -40°C tới khi độ ẩm đạt 5%. Mẫu quả thể nấm đã nghiền

nhỏ và qua rây số 180 được tiến hành chiết hồi lưu trong methanol 80% trong 30 phút. Dịch chiết được lọc qua màng cellulose acetate 0,45 μm để sử dụng cho phân tích HPLC. Hệ thống HPLC sử dụng trong phân tích (hãng Shimadzu, Nhật Bản) gồm: bơm LC 20AD, bộ tiêm mẫu tự động SIL-20A HT, Detector SPD 20A. Sử dụng cột C18 (Agilent) với kích thước cột là 250x4,6 mm và kích thước hạt 5 μm. Tốc độ rửa giải là 0,5 ml/phút, pha động gồm dung môi nước và acetonitril. Nhiệt độ lò cột được đặt ở 25°C. Detector UV được đặt quan sát tại bước sóng 260 nm.

Phương pháp xử lý số liệu: Sử dụng phương pháp thống kê sinh học trên phần mềm Microsoft Excel 2016 và kiểm định T-test (sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với p<0,05).

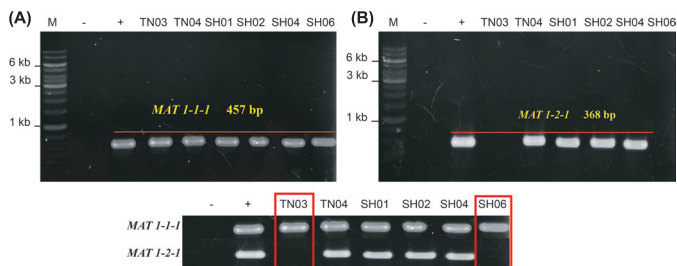
3. Kết quả và bàn luận

3.1. Kết quả xác định gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1* ở các chủng nấm *Cordyceps militaris*

Gen *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1* được xác định là 2 gen giới tính đối lập nhau, giữ vai trò quan trọng trong quá trình sinh sản hữu tính hình thành quả thể và thoái hóa ở các chủng nấm *C. militaris* lưỡng bội [12]. Trong khi đó tại Việt Nam, việc xác định 2 gen giới tính *MAT1-1-1*, *MAT1-2-1* và đánh giá tỷ lệ các chủng nấm *C. militaris* đang được nuôi trồng mang các gen giới tính khác nhau để từ đó cho thấy hiện trạng thoái hóa giống chưa có nhiều nghiên cứu đề cập.

Kết quả xác định gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1* ở 6 chủng nấm *C. militaris* nghiên cứu cho thấy, 4 chủng nấm *C. militaris* TN04, SH01, SH02, SH04 mang cả 2 gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1*; 2 chủng nấm *C. militaris* TN03, SH06 chỉ mang gen giới tính *MAT1-1-1* (hình 1) và không ghi nhận chủng nấm nào chỉ mang gen giới tính *MAT1-2-1*. Trong báo cáo trước của nhóm nghiên cứu đã tiến hành phân lập, định danh và xác định gen giới tính *MAT* của 8 chủng nấm *C. militaris*, trong đó 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 bao gồm SH03, HL13 và HN01 chỉ mang gen giới tính *MAT1-1-1* [16]. Từ kết quả này cho thấy tỷ lệ các chủng nấm *C. militaris* mang cả 2 gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1* đang được nuôi trồng tại Việt Nam khá cao. Kết quả này phù hợp với thực trạng thoái hóa giống xảy ra phổ biến tại các cơ sở nuôi trồng quả thể nấm *C. militaris* và cụ thể là xảy ra ở các cơ sở sử dụng chủng *C. militaris* mang cả 2 gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1*. Hiện tượng này là do ở các chủng nấm mang cả 2 gen giới tính *MAT* xảy ra hiện tượng mất cân bằng tỷ lệ bào tử mang 2 gen giới tính nêu trên, dẫn tới quá trình thoái hóa xảy ra [12]. Các cơ sở sử dụng chủng nấm *C. militaris* mang gen giới tính đơn không xảy ra hiện tượng thoái hóa giống. Như vậy, nghiên cứu này đã cung cấp các dữ liệu về gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1* ở các chủng nấm *C. militaris* đang được nuôi trồng tại Việt Nam và bước đầu cho thấy mối liên quan giữa gen giới tính với hiện tượng thoái hóa giống. Tuy

nhiên, cần có thêm những nghiên cứu với số lượng chủng nấm lớn hơn, thu thập tại nhiều đơn vị nuôi trồng nấm trong cả nước để cho thấy rõ về việc liên quan giữa gen giới tính *MAT* và hiện tượng thoái hóa.

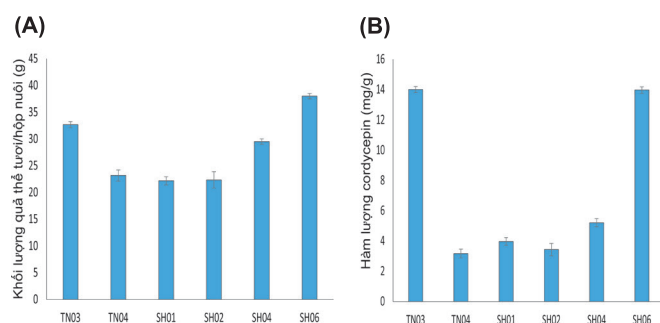


Hình 1. Xác định gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1* ở các chủng nấm *Cordyceps militaris*. (A) Kết quả điện di xác nhận gen giới tính *MAT1-1-1*; (B) Kết quả điện di xác nhận gen giới tính *MAT1-2-1*; M: DNA marker 1 kb.

3.2. Năng suất quả thể và hàm lượng cordycepin của các chủng nấm *Cordyceps militaris*

Trong nghiên cứu này, các mẫu quả thể nấm được thu thập tại các cơ sở nuôi trồng nấm ở các độ tuổi khác nhau. Hơn nữa, mỗi cơ sở lại có công nghệ nuôi trồng riêng biệt (môi trường nuôi, điều kiện nuôi...), nên các mẫu quả thể nấm không được đánh giá về mặt năng suất và chất lượng tại thời điểm thu mẫu. Cả 6 chủng nấm *C. militaris* được đánh giá năng suất và chất lượng quả thể trong cùng điều kiện nuôi trồng.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, cả 6 chủng nấm đều hình thành quả thể. Trong đó, 2 chủng nấm TN03 và SH06 (chỉ mang gen giới tính *MAT1-1-1*) cho năng suất quả thể cao nhất, khối lượng quả thể tươi trung bình/hộp nuôi là 32,67 và 38 g tương ứng với năng suất sinh học là 14,36 và 16,7 %. Đồng thời, đây cũng là 2 chủng nấm *C. militaris* cho hàm lượng cordycepin trong quả thể cao nhất tương ứng trung bình đạt 14 và 13,97 mg/g quả thể khô (hình 2).



Hình 2. Năng suất quả thể và hàm lượng cordycepin trong quả thể của các chủng nấm *Cordyceps militaris*. (A) Khối lượng quả thể tươi/hộp nuôi; (B) Hàm lượng cordycepin trong quả thể khô.

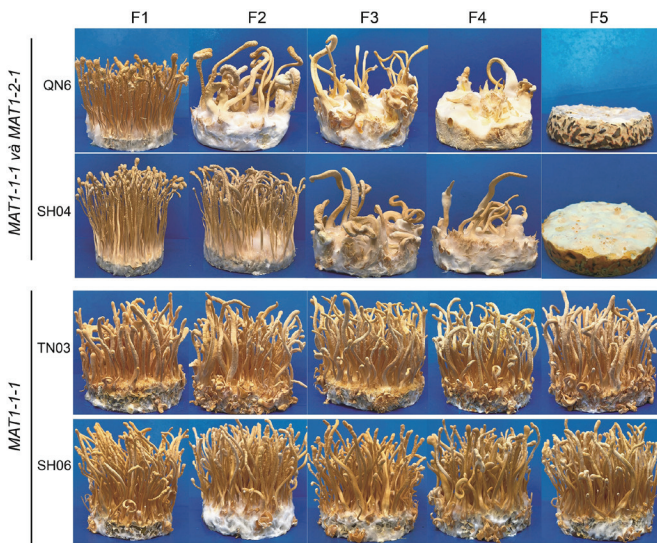
Năng suất quả thể và hàm lượng cordycepin trong quả thể là các yếu tố quan trọng của việc sản xuất nấm *C. militaris*. Nhiều nhóm nghiên cứu tại Việt Nam đã tiến hành

tối ưu các điều kiện nuôi trồng đối với nhiều chủng nấm *C. militaris* khác nhau cho năng suất sinh học đạt 11,6-11,9% và hàm lượng cordycepin trong quả thể đạt 4,33-4,54 mg/g [5-7]. Nghiên cứu của L. Huang và cs (2009) [20] cho thấy, hàm lượng cordycepin trong quả thể nấm *C. militaris* đạt 2,654 mg/g. Nghiên cứu của H.H. Lee và cs (2017) [21] cũng đã cho thấy hàm lượng cordycepin trong một số chủng nấm *C. militaris* lưu giữ tại Trung tâm Suu tập Văn hóa Nông nghiệp Hàn Quốc (KACC) có hàm lượng cordycepin trung bình khoảng 2,13 mg/g. Như vậy, 2 chủng nấm TN03, SH06 cho năng suất quả thể và hàm lượng cordycepin vượt trội, việc đánh giá sự ổn định năng suất quả thể và hàm lượng cordycepin trong quả thể là cần thiết để ứng dụng các chủng nấm trên vào sản xuất thực tế.

3.3. Đánh giá sự ổn định về năng suất quả thể và hàm lượng cordycepin của chủng nấm *Cordyceps militaris* mang gen giới tính đơn

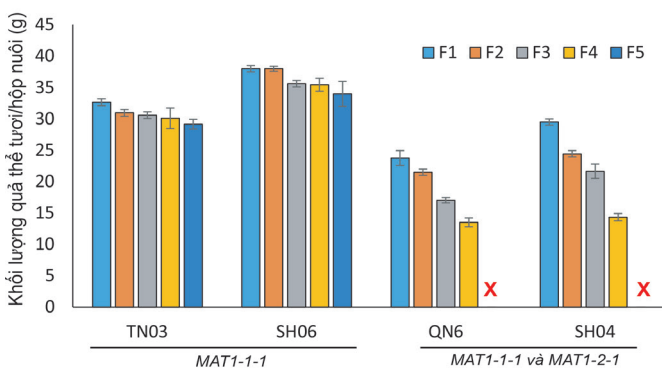
Việc nuôi trồng nấm *C. militaris* đang phải đối mặt với sự thoái hóa nhanh của các chủng giống, biểu hiện của hiện tượng thoái hóa là sự giảm mạnh về năng suất và chất lượng quả thể [8, 9]. Để việc sản xuất nấm *C. militaris* được ổn định, điều kiện quan trọng cần có là công nghệ cùng với các chủng giống có năng suất và hàm lượng hoạt chất cao và ổn định. Chủng *C. militaris* TN03 và SH06 là các chủng nấm mang gen giới tính đơn có năng suất quả thể và hàm lượng cordycepin cao.

Trong nghiên cứu này, năng suất quả thể của 2 chủng nấm *C. militaris* TN03 và SH06 được đánh giá qua 5 thế hệ liên tiếp và so sánh với năng suất quả thể của 2 chủng nấm mang cả 2 gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1* là SH04 và QN6. QN6 là chủng nấm *C. militaris* mang cả 2 gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1* đã được nhóm nghiên cứu được công bố [16], nhưng chưa được đánh giá khả năng thoái hóa qua các thế hệ nuôi trồng. Hơn nữa, nghiên cứu T.X. Vu và cs (2023) [12] đã cho thấy, các chủng nấm *C. militaris* mang cả 2 gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1* xảy ra hiện tượng thoái hóa mạnh do sự mất cân bằng tỷ lệ 2 loại bào tử mang gen giới tính đối lập nhau. Do vậy trong nghiên cứu này, chủng QN6 và SH04 được sử dụng để so sánh khả năng thoái hóa với các chủng nấm *C. militaris* mang gen giới tính đơn là TN03 và SH06. Kết quả nghiên cứu cho thấy, khả năng hình thành quả thể và hình dạng quả thể của 2 chủng nấm *C. militaris* TN03 và SH06 mang gen giới tính đơn *MAT1-1-1* không có sự khác biệt lớn tại 5 thế hệ. Trong khi đó, khả năng hình thành quả thể và hình dạng quả thể của 2 chủng nấm *C. militaris* QN6 và SH04 mang cả 2 gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1* có sự khác biệt lớn tại 5 thế hệ. Từ thế hệ thứ 2 (chủng QN6) và thế hệ thứ 3 (chủng SH04) hình dạng quả thể đã biến đổi bất thường so với quả thể ở thế hệ thứ 1. Đặc biệt tại thế hệ thứ 5, cả 2 chủng nấm *C. militaris* QN6 và SH04 đã mất khả năng hình thành quả thể (hình 3).



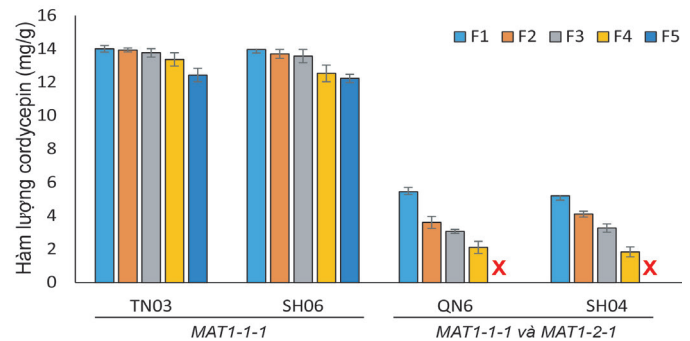
Hình 3. Quả thể của các chủng nấm *Cordyceps militaris* tại 5 thế hệ liên tiếp. F1-F5: thế hệ thứ 1 tới thế hệ thứ 5.

Năng suất quả thể (khối lượng quả thể tươi/hộp nuôi) của cả 4 chủng nấm *C. militaris* TN03, SH06, QN6 và SH04 tại 5 thế hệ đã được xác định (hình 4). Năng suất quả thể của 2 chủng nấm *C. militaris* TN03 và SH06 giảm nhẹ tương ứng 7,9 và 6,8% tại thế hệ thứ 4 và giảm 10,7 và 10,5% tại thế hệ thứ 5 so với thế hệ thứ 1. Trong khi đó, năng suất quả thể 2 chủng nấm *C. militaris* QN6 và SH04 giảm mạnh sau 4 thế hệ, cụ thể tương ứng giảm 43,2 và 51,4%. Sự khác biệt về năng suất quả thể ở các thế hệ so với thế hệ thứ 1 của mỗi chủng nấm đều có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. Các nghiên cứu trên thế giới cho thấy, nấm *C. militaris* bắt đầu có hiện tượng thoái hóa khi cấy chuyển đến thế hệ thứ 3, sự thoái hóa nghiêm trọng xuất hiện ở thế hệ thứ 4 và thế hệ thứ 5 có thể dẫn tới chủng nấm mất khả năng tạo quả thể [9]. Đặc điểm thoái hóa này phù hợp với kết quả nghiên cứu về năng suất quả thể qua 5 thế hệ của 2 chủng nấm *C. militaris* QN6 và SH04 mang cả 2 gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1*. Trong khi đó, năng suất quả thể của 2 chủng nấm *C. militaris* TN03 và SH06 mang gen giới tính đơn *MAT1-1-1* ổn định không khác biệt nhiều qua 5 thế hệ (hình 4).



Hình 4. Năng suất quả thể của các chủng nấm *Cordyceps militaris* tại 5 thế hệ liên tiếp.

Các nghiên cứu về thoái hóa ở nấm *C. militaris* thường quan tâm nhiều tới khả năng hình thành quả thể. Hàm lượng hoạt chất cordycepin ở các thế hệ thoái hóa không có nhiều các nghiên cứu đề cập. Trong khi đó, cordycepin là chỉ tiêu quan trọng để đánh giá chất lượng nấm *C. militaris* [4, 20]. Do vậy, nghiên cứu này tiến hành xác định hàm lượng cordycepin trong quả thể của cả 4 chủng nấm *C. militaris* TN03, SH06, QN6 và SH04 tại 5 thế hệ (hình 5).



Hình 5. Hàm lượng cordycepin trong quả thể của các chủng nấm *Cordyceps militaris* tại 5 thế hệ liên tiếp.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, hàm lượng cordycepin trong quả thể của 2 chủng nấm *C. militaris* QN6 và SH04 giảm mạnh sau 4 thế hệ, cụ thể tương ứng giảm 61,4 và 64,7% so với thế hệ đầu tiên (khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$). Tại thế hệ thứ 4, hàm lượng cordycepin trong quả thể của 2 chủng QN6 và SH04 đạt 2,1 và 1,83 mg/g. Trong khi đó, hàm lượng cordycepin trong quả thể của 2 chủng nấm *C. militaris* TN03 và SH06 giảm nhẹ sau 5 thế hệ. Cụ thể tại thế hệ thứ 4, hàm lượng cordycepin trong quả thể của 2 chủng nấm TN03 và SH06 tương ứng giảm 4,5 và 10,3% và giảm 11,19 và 12,4% tại thế hệ thứ 5. Tại thế hệ thứ 4 và thứ 5, hàm lượng cordycepin trong quả thể của 2 chủng TN03 và SH06 đạt 12,2-13,3 mg/g quả thể khô. Đây là nghiên cứu đầu tiên chỉ ra sự khác nhau về tính ổn định năng suất quả thể và hàm lượng hoạt chất cordycepin trong quả thể giữa các chủng nấm *C. militaris* mang 2 gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1* và chủng nấm *C. militaris* mang gen giới tính đơn *MAT1-1-1*.

Như vậy, nghiên cứu này đã tuyển chọn được 2 chủng nấm *C. militaris* TN03 và SH06 mang gen giới tính đơn *MAT1-1-1* cho năng suất quả thể và hàm lượng cordycepin cao và ổn định. Đây là 2 chủng nấm *C. militaris* chất lượng cao, hoàn toàn có khả năng đưa vào sản xuất. Việc ứng dụng 2 chủng nấm *C. militaris* TN03 và SH06 vào thực tế sẽ giúp các đơn vị sản xuất khắc phục được tình trạng thoái hóa giống đang xảy ra phổ biến. Đồng thời, quả thể nấm *C. militaris* TN03 và SH06 với hàm lượng hoạt chất cordycepin cao góp phần làm tăng giá trị của sản phẩm nấm, từ đó đem lại lợi thế cạnh tranh cho các đơn vị nuôi trồng loài nấm này.

Nghiên cứu này thực hiện tuyển chọn chủng nấm *C. militaris* mang gen giới tính đơn cho năng suất, chất lượng cao và ổn định trên số lượng chủng nấm chưa nhiều. Do đó, cần có thêm các nghiên cứu tuyển chọn trên số lượng chủng nấm lớn để tìm kiếm được các chủng nấm cho năng suất và chất lượng cao hơn. Việc liên tục nâng cấp chất lượng giống nấm *C. militaris* là vấn đề cần thiết trong sản xuất.

4. Kết luận

Nghiên cứu này đã xác định được gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1* ở 6 chủng nấm *C. militaris* đang được nuôi trồng Việt Nam, trong đó 4 chủng nấm (TN04, SH01, SH02, SH04) mang cả 2 gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1*, 2 chủng nấm (TN03 và SH06) chỉ mang gen giới tính *MAT1-1-1*. Các chủng nấm *C. militaris* ở các cơ sở nuôi trồng được ghi nhận xảy ra hiện tượng thoái hóa mạnh là các chủng nấm mang cả 2 gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1*. Nghiên cứu đã tuyển chọn được 2 chủng nấm TN03 và SH06 cho năng suất quả thể và hàm lượng cordycepin trong quả thể cao vượt trội. Năng suất sinh học và hàm lượng cordycepin trong quả thể của 2 chủng nấm TN03 và SH06 tương ứng đạt 14,36 và 16,7%; 14 và 13,97 mg/g quả thể khô. Đặc biệt, 2 chủng nấm TN03 và SH06 cho năng suất quả thể và hàm lượng cordycepin trong quả thể cao và ổn định qua 5 thế hệ. Đây là các chủng nấm *C. militaris* chất lượng cao và có thể sử dụng trong sản xuất.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] A.R. Phull, M. Ahmed, H.J. Park (2002), “*Cordyceps militaris* as a bio functional food source: Pharmacological potential, anti-inflammatory actions and related molecular mechanisms”, *Microorganisms*, **10**, pp.1-31, DOI: 10.3390/microorganisms10020405.

[2] S.K. Das, M. Masuda, A. Sakurai, et al. (2010), “Medicinal uses of the mushroom *Cordyceps militaris*: Current state and prospects”, *Fitoterapia*, **81(8)**, pp.961-968, DOI: 10.1016/j.fitote.2010.07.010.

[3] A.K. Verma, R. Aggarwal (2021), “Repurposing potential of FDA approved and investigational drugs for COVID-19 targeting SARS-CoV-2 spike and main protease and validation by machine learning algorithm”, *Chemical Biology & Drug Design*, **97(4)**, pp.836-853, DOI: 10.1111/cbdd.13812.

[4] T.X. Vu, T.B. Tran, H.H. Vu, et al. (2024), “Ethanol extract from fruiting bodies of *Cordyceps militaris* HL8 exhibits cytotoxic activities against cancer cells, skin pathogenic yeasts, and postharvest pathogen *Penicillium digitatum*”, *Archives of Microbiology*, **206(3)**, pp.1-11, DOI: 10.1007/s00203-024-03833-8.

[5] T.B. Do, H.N. Vu, T.T. Ma, et al. (2017), “Evaluation on cultivation techniques to fruiting body formation of *Cordyceps militaris*”, *TNU Journal of Science and Technology*, **161(01)**, pp.113-118 (in Vietnamese).

[6] V.V. Le, T.H. Tran, T.B.T. Nguyen, et al. (2017), “The preliminary investigation on cultivation technology of orange caterpillar fungus *Cordyceps militaris* L. ex Fr. in Vietnam”, *Vietnam Journal of Agricultural Sciences*, **13(3)**, pp.445-454 (in Vietnamese).

[7] T.L. Pham, H.L. Do, T.H.H. Nguyen, et al. (2016), “Study the effect of temperature and light on growth, fruiting body and cordycepin production by *Cordyceps militaris* NBRC 100741 on silkworm”, *VNU Journal of Science: Medical and Pharmaceutical Sciences*, **32(2)**, pp.63-72 (in Vietnamese).

[8] H. Lou, J. Lin, L. Guo, et al. (2019), “Advances in research on *Cordyceps militaris* degeneration”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **103(19)**, pp.7835-7841, DOI: 10.1007/s00253-019-10074-z.

[9] J. Yin, X. Xin, Y. Weng, et al. (2017), “Transcriptome-wide analysis reveals the progress of *Cordyceps militaris* subculture degeneration”, *PLOS ONE*, **12(10)**, pp.1-14, DOI: 10.1371/journal.pone.0186279.

[10] B. Shrestha, H.K. Kim, G.H. Sung, et al. (2004), “Bipolar heterothallism, a principal mating system of *Cordyceps militaris* in vitro”, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **9(6)**, pp.440-446, DOI: 10.1007/BF02933483.

[11] Y. Lu, Y. Xia, F. Luo, et al. (2016), “Functional convergence and divergence of mating-type genes fulfilling in *Cordyceps militaris*”, *Fungal Genetics and Biology*, **88**, pp.35-43, DOI: 10.1016/j.fgb.2016.01.013.

[12] T.X. Vu, H.D. Thai, B.H.T. Dinh, et al. (2023), “Effects of MAT1-2 spore ratios on fruiting body formation and degeneration in the heterothallic fungus *Cordyceps militaris*”, *Journal of Fungi*, **9(10)**, pp.1-11, DOI: 10.3390/jof9100971.

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

[14] E. Yokoyama, K. Yamagishi, A. Hara (2005), “Heterothallism in *Cordyceps takaomontana*”, *FEMS Microbiology Letters*, **250(1)**, pp.145-150, DOI: 10.1016/j.femsle.2005.07.004.

[15] G.H. Sung, B. Shrestha, S.K. Han, et al. (2010), “Heterothallic type of mating system for *Cordyceps cardinalis*”, *Mycobiology*, **38(4)**, pp.282-285, DOI: 10.4489/MYCO.2010.38.4.282.

[16] X.T. Vu, B.T. Tran, T.M. Nguyen, et al. (2022), “Identification of mating-type (MAT) gene, productivity and cordycepin content in medicinal *Cordyceps militaris* strains cultivated in Vietnam”, *Vietnam Journal of Science and Technology*, **64(7)**, pp.60-64 (in Vietnamese).

[17] 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.

[18] 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 (in Vietnamese).

[19] 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.

[20] 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.

[21] H.H. Lee, N. Kang, I. Park, et al. (2017), “Characterization of newly bred *Cordyceps militaris* strains for higher production of cordycepin through HPLC and URP-PCR analysis”, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **27(7)**, pp.1223-1232, DOI: 10.4014/jmb.1701.01043.