

DETERMINATION OF PROCESSED CATERPILLAR FUNGUS BASED ON ITS1 MARKERS ON *CODYCEPTS SINENSIS* AND *COI* ON GHOST MOTH LARVAE OF HEPIALIDAE FAMILY

Le Quang Trung^{1*}, Tran My Linh², Nguyen Chi Mai², Nguyen Tuong Van³

¹VNTEST Institute for Quality Testing and Inspection - Vietnam Union of Science and Technology Associations

²Institute of Marine Biochemistry – VAST, ³Institute of Biotechnology - VAST

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 31/10/2022	Products of caterpillar fungus are the complex of <i>Cordyceps sinensis</i> species parasitic to larvae of <i>Hepialidae</i> family and developing from winter to summer in high mountains of China, Nepal... Caterpillar fungus has high economic benefits because of its medicinal properties. Therefore, it could be mixed with clavicipitaceous fungi, which are parasitic on larvae of different moth hosts and are produced throughout the year in natural condition or artificial media. In this research, 10 caterpillar fungus samples in capsules were examined based on markers of ITS1 of <i>Codycepts</i> species and <i>COI</i> of <i>Hepialidae</i> and <i>Bombyx mori</i> larvae. Phylogenetic and homology level analyses based on nucleotide polymorphism of the markers revealed that 10 samples contained both caterpillar fungus of <i>C. sinensis</i> and clavicipitaceous fungi of <i>Codycepts militaris</i> and <i>Metacodycepts neoginnii</i> . Similarly, powder of <i>Hepialidae</i> larvae was found in all 10 samples, but five of which were also containing that of <i>B. mori</i> . Therefore, 10 samples were determined as no pure caterpillar fungus from <i>C. sinensis</i> and five of them were wrong about <i>Hepialidae</i> hosts. The results in this study suggest the effective uses of molecular markers in identifying possible sources of processed caterpillar fungus products.
Revised: 07/12/2022	
Published: 20/12/2022	

KEYWORDS

Caterpillar fungus determination
ITS markers of *Codycepts* fungi
COI markers of *Hepialidae* larvae
Phylogenetic analysis
Homology level analysis

XÁC ĐỊNH SẢN PHẨM ĐÔNG TRÙNG HẠ THẢO DỰA VÀO CHỈ THỊ ITS1 CỦA NẤM *CODYCEPTS SINENSIS* VÀ *COI* CỦA ẤU TRÙNG BƯỚM THUỘC HỌ HEPIALIDAE

Lê Quang Trung^{1*}, Trần Mỹ Linh², Nguyễn Chi Mai², Nguyễn Tường Vân³

¹Viện Kiểm nghiệm và Kiểm định chất lượng VNTEST - Liên hiệp các Hội Khoa học và Kỹ thuật Việt Nam

²Viện Hóa sinh Biển - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Viện Công nghệ Sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 31/10/2022	Đông trùng hạ thảo là sản phẩm do nấm <i>Cordyceps sinensis</i> ký sinh và phát triển trong ấu trùng thuộc họ <i>Hepialidae</i> từ mùa đông đến mùa hè trên các vùng núi cao >3000m so với mặt biển ở Trung Quốc, Nepal... Đông trùng hạ thảo có vai trò kinh tế và y học cao nên thường bị pha trộn với nhộng trùng thảo <i>Codycepts militaris</i> ký sinh trên ấu trùng của nhiều loài bướm khác nhau và có thể sản xuất quanh năm trong môi trường tự nhiên hoặc nhân tạo. Trong nghiên cứu này, 10 mẫu đông trùng hạ thảo được xác định dựa vào chỉ thị ITS1 của nấm <i>Codycepts</i> và <i>COI</i> của ấu trùng bướm <i>Hepialidae</i> , tằm ăn lá dâu <i>Bombyx mori</i> và tằm ăn lá sắn <i>Samia ricini</i> . Kết quả phân tích bằng cây chủng loại và mức tương đồng về trình tự DNA của các chỉ thị cho thấy 10 mẫu đều bị trộn lẫn giữa đông trùng hạ thảo và nhộng trùng thảo, trong đó 5 mẫu chứa cả nấm <i>Metacodycepts neoginnii</i> . Toàn bộ 10 mẫu đều chứa đông trùng hạ thảo của ấu trùng <i>Hepialidae</i> , nhưng có 5 mẫu còn chứa cả ấu trùng <i>B. mori</i> . Như vậy, cả 10 mẫu đều có thành phần không thuần nhất. Kết quả thu được đã cung cấp phương pháp xác định được thành phần trong một số sản phẩm đông trùng hạ thảo đã qua chế biến sử dụng các chỉ thị phân tử.
Ngày hoàn thiện: 07/12/2022	
Ngày đăng: 20/12/2022	

TỪ KHÓA

Đông trùng hạ thảo
Chỉ thị ITS1 của nấm *Codycepts*
Chỉ thị *COI* của ấu trùng *Hepialidae*
Phân tích chủng loại
Phân tích mức tương đồng

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.6824>

* Corresponding author. Email: lqtrung2014@gmail.com

1. Đặt vấn đề

Đông trùng hạ thảo (ĐTHT) là sản phẩm của loài nấm *Cordyceps sinensis* [1], ký sinh trên ấu trùng của các loài thuộc họ bướm *Hepialidae* [2]. ĐTHT chỉ phát triển trong tự nhiên trên vùng núi cao từ 3600 - 5000m so với mặt biển, thuộc các vùng núi ở Tây Tạng, Tứ Xuyên, Vân Nam... của Trung Quốc và một số vùng núi trên dãy Himalaya của Nepal, Bhutan... [3], [4]. Theo Yang (2020) [5], nấm *C. sinensis* ký sinh trong sâu non của các loài bướm thuộc họ *Hepialidae* sống dưới đất vào cuối mùa thu và phát triển trong suốt mùa đông (đông trùng). Cuối mùa xuân, đầu mùa hè, quả thể nấm phát triển nhô lên mặt đất (hạ thảo) [5]. Do chứa nhiều chất có hoạt tính sinh học cao như cordycepin, adenosine, acid cordycepic... [6], ĐTHT có vai trò quan trọng trong hỗ trợ điều trị các bệnh về đường hô hấp, điều hòa chuyển hóa ở gan, thận, phòng chống ung thư... [4]. Trên thị trường, sản phẩm ĐTHT có thể ở dạng nguyên con sấy khô, dạng bột nghiền trong viên nhộng. ĐTHT khô nguyên con loại mắt đỏ A+ có giá tới 17-18 triệu đồng, loại thấp nhất cũng tới 8,5-9,5 triệu đồng/10 gr. Vì lợi nhuận, nhiều sản phẩm ĐTHT dễ bị trộn với sản phẩm nhộng trùng thảo (NTT) ở dạng nguyên con cũng như dạng bột. Trong khi, ĐTHT chỉ khai thác được ngoài tự nhiên vào mùa hè, NTT có thể nuôi trồng và khai thác ở bất kỳ thời gian nào trong năm, ngoài tự nhiên hoặc môi trường nhân tạo từ các loài nấm như *M. neogunnii*, *Codycepts cicadae*, *C. militaris*, *C. liangshanensis* và *C. nutans*... [7] trên nền vật chủ thuộc họ *Hepialidae* hoặc sâu tằm ăn lá dâu (*Bombyx mori*) và sâu tằm ăn lá sắn (*Samia ricini*) [8], [2]. Ở Việt Nam, giá NTT từ nấm *C. militaris* chỉ từ 150-170 nghìn/10 gr khô. Hiện nay, sản phẩm ĐTHT có nguồn gốc đa dạng, được tiêu thụ rộng rãi ở nước ta, nhưng chưa có nghiên cứu nào đưa ra phương pháp hiệu quả để xác thực sản phẩm có giá trị y học và thương mại này ở thị trường Việt Nam.

Chỉ thị phân tử DNA từ hệ gen nhân của các loài nấm *Codycepts* hoặc từ hệ gen ty thể của ấu trùng các loài vật chủ thuộc họ *Hepialidae* là những công cụ đã được áp dụng để xác định tính chuẩn xác của sản phẩm ĐTHT [9], [10]. Cho đến nay, một số nghiên cứu và bằng sáng chế đã công bố chỉ thị DNA dựa vào đa hình trình tự đoạn ITS1 của các loài nấm *Codycepts* và đoạn *COI* của một số loài vật chủ thuộc họ *Hepialidae*, của tằm ăn lá dâu và tằm ăn lá sắn được sử dụng để xác thực chính xác các sản phẩm ĐTHT thương mại [7], [9], [11], [12]. Đây là phương pháp có tính khoa học cao để chứng minh nguồn gốc và chất lượng các sản phẩm ĐTHT dạng nguyên con, dạng viên nhộng, dạng bột đang được nhập khẩu và tiêu thụ ở nước ta.

Trong nghiên cứu này, 10 mẫu ĐTHT đã qua chế biến, được phân tích dựa vào đa hình trình tự DNA của chỉ thị trên đoạn ITS1 trong nhân của nấm *C. sinensis* và một số loài nấm *Codycepts* khác, cũng như trên đoạn *COI* trong ty thể của một số loài vật chủ thuộc họ *Hepialidae*, bao gồm của cả loài tằm ăn lá dâu và loài tằm ăn lá sắn. Kết quả nghiên cứu cung cấp phương pháp xác thực sản phẩm ĐTHT được sản xuất trong và ngoài nước nhằm bảo vệ sức khỏe và quyền lợi của người tiêu dùng.

2. Vật liệu và phương pháp

2.1. Vật liệu

Để phát triển phương pháp, các mẫu bột ĐTHT dạng viên nhộng (02 viên nhộng/mẫu) có hạn sử dụng đến 10/2023 được khách hàng cung cấp, đánh số từ 01 đến 10 và ký hợp đồng thử nghiệm. Các mẫu được giữ ở nhiệt độ phòng cho đến khi tách DNA tổng số. Các cặp môi nhân đoạn ITS1 của 5 loài nấm có trình tự DNA được tham khảo từ công bố của Liu và cộng sự (2017) [7]; Cheng và cộng sự (2012) [11]. Trình tự cặp môi nhân đoạn *COI* của ấu trùng các loài thuộc họ bướm *Hepialidae*, tằm ăn lá dâu và tằm ăn lá sắn dựa theo Hebert và cộng sự (2003) [9]; Zhang và cộng sự (2017) [12]. Chi tiết thông tin các cặp môi nhân ở Bảng 1.

Bảng 1. Thông tin các cặp môi nhân để xác thực ĐHTH

Số TT	Tên môi nhân	Xác định loài	Trình tự DNA (5'-3')	Chiều dài sản phẩm PCR (bp)	Chỉ thị theo mẫu
A Môi nhân để xác định các loài nấm*					
					ITS1
1	CS	<i>C. sinensis</i>	F: AGTTACCACTCCCAAACC R: TGCTTGCTTCTTGACTGA	146	CS01 - CS10
2	CC	<i>C. cicadae</i>	F: TTACAACCTCCCAACCCTTC R: GATGCCAGAACCAAGAGAT	209	CC01 - CC10
3	MN	<i>M. neogunnii</i>	F: TACCTATACTGTTGCTTCGG R: GATGCCAGAACCAAGAGAT	203	MN01 - MN10
4	CM	<i>C. militaris</i>	F: TGAACATACCTATCGTTGCT R: ATGCCAGAGCCAAGAGAT	167	CM01 - CM10
5	CN	<i>C. nutans</i>	F: AACTCTCCAATTCTCTGTGA R: GCAATTCGCATTACTTATCG	205	CN01 - CN10
B Môi nhân để xác định các loài côn trùng là vật chủ**)					
					COI
6	HS	<i>Hepialidae spp.</i>	F: GGAAATCCHGGATCTTTAATT R: GATGCCCCMGARTGTGCAAT	302	HS01 - HS10
7	BM	<i>B. mori</i>	F: GGAAATCCAGGATCATTAATTG R: CTTCCsTCTATGTGCGATATTAG	299	BM01 - BM10
8	SR	<i>S. ricini</i>	F: CCCCCGGATCTTTAATTGGTG R: CTAAATCAACAGATCTACCTCC	299	SR01 - SR10

Ghi chú: *) Theo Liu và cộng sự (2017) [7] và Cheng và cộng sự (2012) [11];

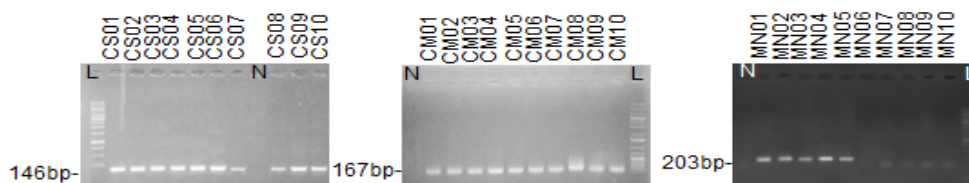
***) Theo Hebert và cộng sự (2003) [9] và Zhang và cộng sự (2017) [12]

2.2. Phương pháp

DNA tổng số được tách chiết bằng phương pháp sử dụng DNeasy Plant Pro và Plant Kit (Qiagen). Các phản ứng nhân gen sử dụng PCR SuperMix (Thermo, Đức) với 30 chu trình nhiệt. Mỗi chu trình gồm: 1 phút ở 92°C, 40 giây ở 53°C cho đoạn ITS1, 55°C cho đoạn COI và 1 phút ở 72°C. Sản phẩm PCR được gắn vào vector pTZ57R/T (Thermo, Đức), nhân dòng trong vi khuẩn *E. coli* DH5 α . Plasmid DNA được tách bằng Gene JET™ Plasm Miniprep Kit và giải trình tự nucleotide 2 chiều sử dụng cặp môi M13 tại MacroGen (Korea). Khoảng cách di truyền tin cậy giữa các chỉ thị cho các loài nấm và các loài côn trùng dựa vào giá trị bootstrap (>50%) trên cây phát sinh chủng loại được xây dựng theo phương pháp Neighbor Joining bằng phần mềm Mega 3.1 [13]. Kết quả phân tích chủng loại được khẳng định lại dựa vào phân tích mức tương đồng (H, %) và khoảng di truyền (D, 0,000 - 1,000) giữa các đoạn ITS1 và COI của mẫu với đoạn liên quan tham chiếu trên ngân hàng gen trong mỗi nhánh cây chủng loại trên phần mềm DNAMAN4.15 (Lynnon BioSoft).

3. Kết quả và thảo luận

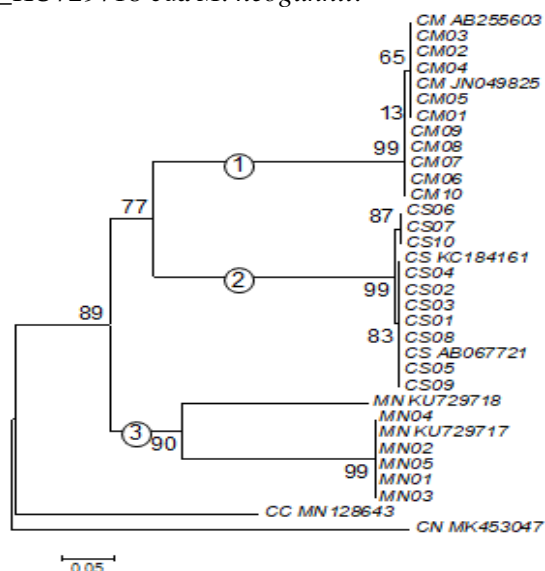
3.1. Xác định nấm *C. sinensis* trong sản phẩm ĐHTH



Hình 1. Kết quả nhân bản đoạn ITS1 bằng kỹ thuật PCR giữa DNA tổng số của các loài nấm trong 10 mẫu với các cặp môi nhân CS, CM và MN. Các ký hiệu CS01 - CS10; CM01 - CM10 và MN01 - MN10: xem Bảng 1; L: thang DNA chuẩn (Thermo Scientific™ GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder); N: đối chứng âm

Trong 5 cặp môi để nhân đoạn ITS1 của 5 loài nấm, chỉ có 3 cặp CS, CM và MN (Bảng 1) cho kết quả PCR và được giải trình tự DNA với chiều dài lần lượt là 146 bp, 167 bp và 203 bp như đã được công bố (Hình 1).

Trên sơ đồ cây phát sinh chủng loại (Hình 2) cho thấy các đoạn ITS1 chỉ thị như CM01 - CM10, CS01 - CS10, MN01 - MN05 trong 10 mẫu xác thực và các đoạn ITS1 tham chiếu liên quan của 3 loài *C. militaris* (CM JN049825, CM JN049825), *C. sinensis* (CS_KC184161, CS_AB067721), và *M. neogunnii* (MN_KU729718, MN_KU729718) lần lượt chia thành các nhánh cây 1, 2 và 3 với khác biệt di truyền tin cậy (99%). Không mẫu nào có chỉ thị cùng nhánh với đoạn ITS1 tham chiếu (CC MN128643 và CN MK453047) của 2 loài nấm *C. cicadae* và *C. nutans*. Như vậy, cả 10 mẫu xác thực có thể đều chứa bột nấm của ĐTHT là *C. sinensis*, vì cả 10 đoạn ITS1 chỉ thị (CS01 - CS10) của chúng cùng nhánh 2 với 2 đoạn tham chiếu CS_KC184161 và CS AB067721 của loài nấm này. Đồng thời, trong 10 mẫu có thể cũng chứa bột của loài nấm NTT *C. militaris*, vì 10 đoạn chỉ thị (CM01 - CM10) của chúng cùng nhánh 1 với 2 đoạn tham chiếu CM JN049825 và CM JN049825 của loài. Ngoài ra, 5 mẫu có thể còn chứa cả nấm NTT *M. neogunnii*, vì 5 đoạn ITS1 (MN01-MN05) của chúng cùng nhánh 3 với 2 đoạn tham chiếu MN_KU729718 và MN_KU729718 của *M. neogunnii*.



Hình 2. Phân tích chủng loại của loài nấm ĐTHT *C. sinensis* và một số loài nấm NTT trong 10 mẫu xác thực dựa vào đa hình trình tự đoạn ITS1 và các đoạn tham chiếu liên quan trên ngân hàng gen. CM01 - CM10, CS01 - CS10, MN01 - MN05: ký hiệu chỉ thị ITS1 kèm tên mẫu (Bảng 1). CM_JN049825 - CN MK453047: đoạn ITS1 tham chiếu trên ngân hàng gen cho các loài từ *M. neogunnii* - *C. nutans*. 14 - 99: khác biệt di truyền giữa các nhánh cây (giá trị bootstrap, %). 1 - 3 trong các vòng tròn: ký hiệu các nhánh cây

Kết quả phân tích mức tương đồng (H) và khoảng cách di truyền (D) của các đoạn chỉ thị (Bảng 2) khẳng định kết quả phân tích trên cây chủng loại (Hình 2). Các đoạn ITS1 (CS01 - CS10) của 10 mẫu có H với cùng đoạn tham chiếu của loài nấm ĐTHT *C. sinensis* (CS_AB067721) trong nhánh 2 tới 99,3 - 100% và khoảng cách di truyền (D) chỉ có 0,000 - 0,014; trong khi so sánh với cùng đoạn chỉ thị của các loài nấm NTT, H chỉ có 31,4 - 59,2% và D tới 0,408 - 0,686. Tương tự, các đoạn CM01 - CM10 của 10 mẫu có H = 99,4 - 100,0%, D = 0,000 - 0,006 và MN01 - MN05 của 5 mẫu (01 - 05) có H = 100%, D = 0,000 khi lần lượt so sánh với cùng đoạn tham chiếu CM_AB255603 của loài *C. militaris* và MN_KU729715 của *M. neogunnii* trong nhánh 1 và 3 của cây chủng loại. Hai giá trị này của CM01 - CM10 và MN01 - MN05 chỉ có H = 41,7 - 88,0% và D tới 0,120 - 0,583 khi so sánh với cùng đoạn của các loài *Codyceps* khác.

Bảng 2. So sánh mức tương đồng và khoảng cách di truyền giữa trình tự ITS1 của các mẫu với cùng đoạn tham chiếu trên ngân hàng gen theo các nhánh cây ở Hình 2

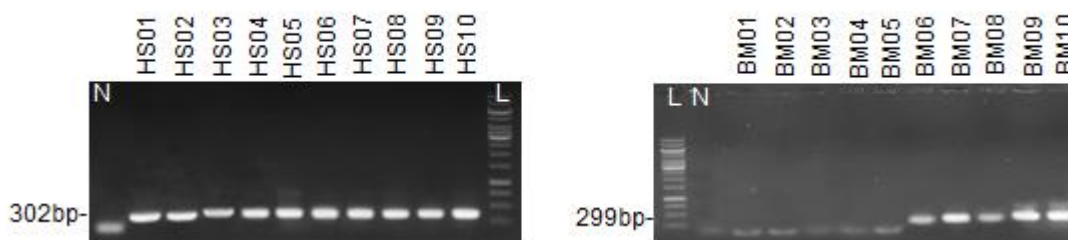
Đoạn ITS1 - Hình 2	CS_AB067721		CC_MN128643		CM_AB255603		MN_KU729715		CN_KR673559	
	H	D	H	D	H	D	H	D	H	D
Nhánh 1: CM01- CM10	69,4- 70,1	0,299- 0,306	87,3- 88,0	0,120- 0,127	99,4- 100,0	0,000- 0,006	48,4	0,516	51,9- 52,6	0,474- 0,481
Nhánh 2: CS01- CS10	99,3- 100,0	0,000- 0,014	57,7- 59,2	0,408- 0,423	54,3- 55,1	0,449- 0,457	31,4- 32,6	0,674- 0,686	35,0- 35,8	0,642- 0,650
Nhánh 3: MN01- MN05	70,8	0,292	57,0	0,43	60,5	0,395	100,0	0,000	41,7	0,583

Ghi chú: H, mức tương đồng về trình tự DNA (%). D, khoảng cách di truyền giữa các trình tự DNA (0,000 - 1,000). CS01 - CS10, MN01 - MN05, CM01 - CM10: ký hiệu chỉ thị ITS1 kèm tên mẫu (Bảng 1). CS_AB067721 - CN_KR673559: đoạn ITS1 chỉ thị tham chiếu trên ngân hàng gen của các loài nấm từ *C. sinensis* - *C. nutans*.

ĐTHT chỉ là sản phẩm của loài *C. sinensis* [2]. Như vậy, kết quả phân tích chủng loại và mức tương đồng về trình tự DNA đoạn chỉ thị ITS1 cho thấy cả 10 mẫu với tên nhãn là ĐTHT đều bị pha trộn, không đồng nhất. Mặc dù các mẫu đều có ĐTHT *C. sinensis* với chỉ thị CS01 - CS10, nhưng cũng chứa NTT *C. militaris* (chỉ thị CM01 - CM10). Năm mẫu (01 - 05) còn có mặt NTT *M. neogunnii* (chỉ thị MN01 - MN05). NTT *C. militaris* được nuôi trồng phổ biến ở nhiều nơi trên thế giới trong môi trường nhân tạo với sản lượng cao, nguồn cung lớn, giá thành thấp, nên nấm này dễ bị trộn vào sản phẩm ĐTHT để tăng lợi nhuận [7]. Trong 10 mẫu, chỉ có 5 mẫu bị trộn với *M. neogunnii* (chỉ thị MN01 - MN05). Các mẫu này có thể có nguồn gốc từ Trung Quốc, vì các tỉnh phía Nam của nước này có đến hàng chục tấn *M. neogunnii* được khai thác ngoài tự nhiên hàng năm, chưa kể đến các sản phẩm của nấm này được sản xuất ở môi trường nhân tạo [14].

3.2. Xác định các loài vật chủ thuộc họ Hepialidae của ĐTHT

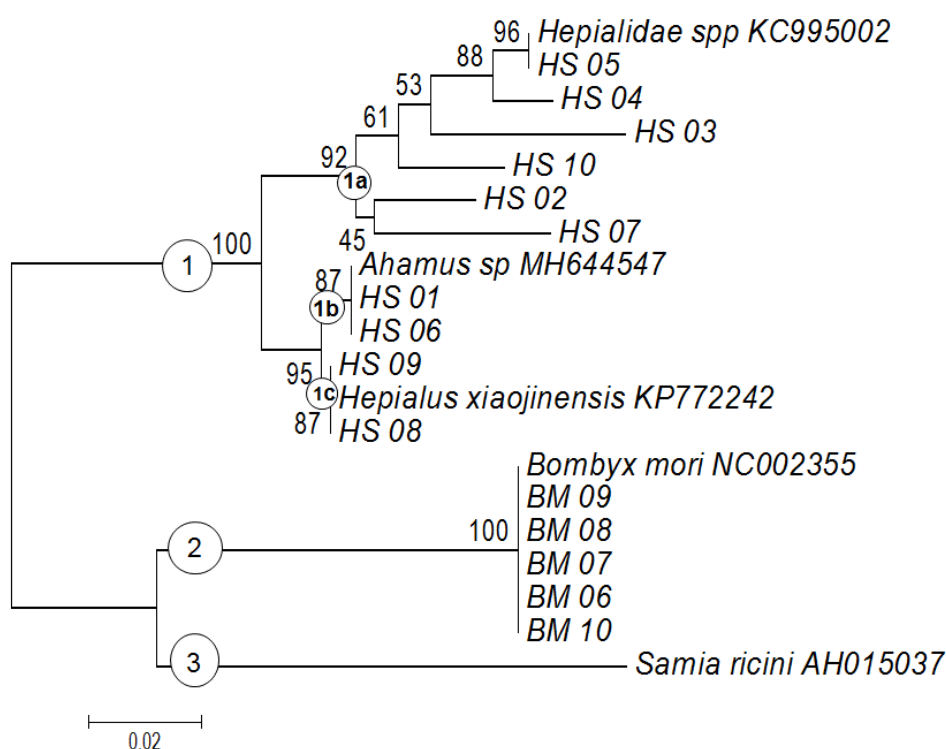
Các cặp mồi nhân HS, BM và SR thiết kế dựa trên trình tự gen *COI* (Bảng 1) được nhân bản với DNA tổng số của 10 mẫu phân tích. Chỉ có các cặp HS và BM cho kết quả thể hiện bằng hình ảnh điện di sản phẩm PCR và được giải trình tự DNA với chiều dài lần lượt là 302 bp và 299 bp (Hình 3).



Hình 3. Kết quả nhân bản đoạn *COI* bằng kỹ thuật PCR giữa DNA tổng số của các loài côn trùng là vật chủ trong 10 mẫu với các cặp mồi nhân HS và BM. Các ký hiệu HS01 - HS10 và BM01 - BM10: xem Bảng 1; L: thang DNA chuẩn (Thermo Scientific™ GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder); N: đối chứng âm

Trên sơ đồ cây phát sinh chủng loại (Hình 4), đa hình trình tự các đoạn *COI* chia các loài vật chủ thuộc họ Hepialidae và loài tằm ăn lá dâu *B. mori* có trong các mẫu cùng đoạn *COI* tham chiếu liên quan thành 2 nhánh với khác biệt di truyền tin cậy (100%). Không có trình tự *COI* của mẫu nào cùng nhánh 3 với loài tằm ăn lá sắn với đoạn tham chiếu *S. ricini* AH015037. Trong

nhánh 1, nhánh phụ 1a gồm các chỉ thị HS02 - HS05, HS07 và HS10 của 6 mẫu và đoạn *COI* tham chiếu (*Hepialidae spp.* KC995002) của các đại diện thuộc họ Hepialidae. Hai mẫu có chỉ thị HS01 và HS06 thuộc *Ahamus sp.* và 2 mẫu có chỉ thị HS08 và HS09 thuộc *Hepislus xiaojinensis* trong họ Hepialidae vì ở cùng nhánh 1b và 1c với đoạn tham chiếu *Ahamus sp* MH644547 và *Hepislus xiaojinensis* KP772242. Cả 3 nhánh phụ có sai khác di truyền tin cậy (87 - 95%). Trong nhánh 2, chỉ thị BM06 - BM10 của 05 mẫu cùng nhánh với đoạn tham chiếu *B. mori* NC002355 của tằm ăn lá dâu. Trong nghiên cứu này, các chỉ thị HS02 - HS05, HS07, SH10 của 6 mẫu cùng trong nhánh 1a với trình tự tham chiếu có tên họ Hepialidae spp. KC995002 và chưa định loại được tới giống và loài. Các trình tự *COI* trong nhánh này có khác biệt di truyền dao động cao từ 44 đến 96%. Có lẽ do các đại diện này thuộc nhiều giống và loài khác nhau trong họ Hepialidae mà đoạn *COI* của chúng chưa được công bố trên ngân hàng gen. Theo Myers và cộng sự (2022), trong họ Hepialidae mới xác định được khoảng 600 loài thuộc 60 giống và còn nhiều giống và loài chưa được định loại [15].



Hình 4. Phân tích chủng loại một số vật chủ thuộc họ Hepialidae, tằm ăn lá dâu *B. mori* và tằm ăn lá sắn *S. ricini* có trong các mẫu nghiên cứu dựa vào đa hình trình tự đoạn *COI* và các đoạn tham chiếu liên quan trên ngân hàng gen. HS01 - HS10, BM06 - BM10: ký hiệu chỉ thị *COI* kèm tên mẫu (Bảng 1). *Hepialidae spp.* KC995002 - *B. mori* NC002355: đoạn *COI* tham chiếu trên ngân hàng gen. 44 - 100: khác biệt di truyền giữa các nhánh cây (%). 1 - 3 và 1a - 1c trong các vòng tròn: ký hiệu các nhánh cây.

Kết quả phân tích mức tương đồng trình tự DNA (H) và khoảng cách di truyền (D) giữa các đoạn *COI* của mẫu với cùng đoạn tham chiếu trên ngân hàng gen và chủng loại được thể hiện trong bảng 3 và hình 3. Sáu đoạn *COI* trong nhánh phụ 1a có chỉ số H cao từ 96,4 đến 100% và D rất thấp chỉ trong khoảng 0,000 - 0,036 khi so sánh với đoạn tham chiếu *Hepialidae spp.* KC995002. Các đoạn trong nhánh phụ 1b và 1c đều có H tuyệt đối là 100,0% và D = 0,000 khi so sánh lần lượt với đoạn tham chiếu *Ahamus sp* MH644547 và *Hepislus xiaojinensis* KP772242. Tương tự, *COI* của 5 mẫu trong nhánh 2 có chỉ số H đều là 100,0% và D = 0,000 so với *Bombyx mori* NC002355 của tằm ăn lá dâu. Trong khi, H của *COI* của các mẫu thuộc họ Hepialidae trong

nhánh 1 so với trong nhánh 2 chỉ có 81,6 - 86,3% với $D = 0,137 - 0,184$. Trong thực tế, vật chủ của ĐTHT chỉ là ấu trùng của các loài thuộc họ Hepialidae [16]. Trong nghiên cứu này, kết quả phân tích chủng loại, phân tích mức tương đồng và khoảng cách di truyền dựa vào đa hình trình tự đoạn COI của 10 mẫu cho thấy tất cả chúng đều chứa các loài vật chủ thuộc họ Hepialidae của ĐTHT. Tuy nhiên, 5 đoạn chỉ thị BM06 - BM10 được xác định trong 5 mẫu khẳng định các mẫu này còn có mặt NTT sử dụng dinh dưỡng từ ấu trùng tằm ăn lá dâu *B. mori*.

Bảng 3. So sánh mức tương đồng và khoảng cách di truyền giữa trình tự COI của các mẫu với cùng đoạn tham chiếu trên ngân hàng gen theo các nhánh cây ở hình 3

Đoạn COI của các mẫu trong các nhánh cây của hình 4	Với vật chủ là các loài thuộc họ Hepialidae						Với các vật chủ khác			
	<i>Hepialidae</i> spp. KC995002		<i>Ahamus</i> sp. MH644547		<i>Hepislus xiaojinensis</i> KP772242		<i>Bombyx mori</i> NC002355		<i>Samia ricini</i> AH015037	
	H	D	H	D	H	D	H	D	H	D
Nhánh 1a: HS01-HS05, HS07, HS10	96,4 - 100,0	0,000 - 0,036	92,3 - 94,6	0,054 - 0,077	93,0 - 95,3	0,047 - 0,070	82,6 - 84,6	0,154 - 0,174	81,6 - 83,3	0,167 - 0,184
Nhánh 1b: HS01, HS06	93,6	0,064	100,0	0,000	99,3	0,007	86,3	0,137	85,3	0,147
Nhánh 1c HS08, HS09	94,3	0,057	99,3	0,007	100,0	0,000	86,3	0,137	85,3	0,147
Nhánh 2: BM06-BM10	83,9	0,161	86,3	0,137	86,3	0,137	100,0	0,000	86,6	0,134

Ghi chú: H: mức tương đồng về trình tự DNA (%). D: khoảng cách di truyền giữa các trình tự DNA (0,000 - 1,000). HS01 - HS10, BM06 - MN10: ký hiệu chỉ thị COI kèm tên mẫu (Bảng 1). *Hepialidae* spp. KC995002 – *Samia ricini* AH015037: đoạn COI tham chiếu của các loài trên ngân hàng gen

4. Kết luận

Trong nghiên cứu này, các sản phẩm ĐTHT đã được xác định thành phần dựa vào đa hình trình tự DNA các chỉ thị ITS1 của nấm *Cordyceps* và COI của các loài sâu bướm vật chủ thuộc họ Hepialidae, của sâu tằm ăn lá dâu *B. mori* và tằm ăn lá sắn *S. ricini*. Kết quả cho thấy cả 10 mẫu nghiên cứu đều không đồng nhất về thành phần loài và 5 mẫu có sự sai khác về vật chủ của ĐTHT. Trong 10 mẫu đều có mặt nấm ĐTHT (*C. sinensis*) nhưng cũng chứa các loài nấm NTT như *C. militaris* và *M. neoginnii*, ấu trùng một số đại diện sâu bướm thuộc họ Hepialidae như *Hepialidae* spp., *Ahamus* sp. và *Hepislus xiaojinensis* và vật chủ NTT như sâu bướm của tằm ăn lá dâu. Kết quả nghiên cứu cho thấy, có thể bước đầu xác định được thành phần trong một số sản phẩm ĐTHT trên thị trường bằng phương pháp sử dụng các chỉ thị phân tử và đưa ra khuyến cáo cho người tiêu dùng trong việc lựa chọn và sử dụng các sản phẩm này một cách khoa học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] G. H. Sung, N. L. Hywel-Jones, J. M. Sung *et al.*, "Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi," *Studies in Mycology*, vol. 57, pp. 5-59, 2007.
- [2] L. S. Zha, S. K. Huang, Y. P. Xiao *et al.*, "An evaluation of common *Cordyceps* (Ascomycetes) species found in Chinese markets," *International Journal of Medicinal Mushrooms*, vol. 20, no. 12, pp. 1149-1162, 2018.
- [3] Y. Li, X. L. Wang, L. Jiao *et al.*, "A survey of the geographic distribution of *Ophiocordyceps sinensis*," *Journal of Microbiology*, vol. 49, pp. 913-919, 2011.
- [4] L. Huang, Q. Li, Y. Chen *et al.*, "Determination and analysis of cordycepin and adenosine in the products of *Cordyceps* spp.," *African Journal of Microbiology Research*, vol. 3, no. 12, pp. 957-961, 2009.
- [5] Z. L. Yang, "Ophiocordyceps sinensis. The IUCN red list of threatened species," 2020. [Online]. Available: <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020-3.RLTS.T58514773A179197748.en>. [Accessed Aug. 15, 2022].

- [6] K. Yue, M. Ye, Z. Zhou *et al.*, "The genus *Cordyceps*: A chemical and pharmacological review," *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 65, pp. 474-493, 2012.
- [7] Y. Liu, X. Y. Wang, Z. T. Gao *et al.*, "Detection of *Ophiocordyceps sinensis* and its common adulterates using species-specific primers," *Frontiers in Microbiology*, vol. 8, p. 1179, 2017.
- [8] C. Dong, S. Guo, W. Wang, and X. Z. Liu, "Cordyceps industry in China," *Mycology*, vol. 6, no. 2, pp. 121-129, 2015.
- [9] P. D. N. Hebert, S. Ratnasingham, and J. R. de Waard, "Barcoding animal life: Cytochrome oxidase subunit 1 divergences among closely related species," *Proceedings of the Royal Society - Biological Sciences*, vol. 270, Suppl. 1, pp. 96-99, 2003.
- [10] B. T. M. Dentinger, M. Y. Didukh, and J. M. Moncalvo, "Comparing COI and ITS as DNA barcode markers for mushrooms and allies (Agaricomycotina)," *PLoS ONE*, vol. 6, no. 9, 2011, Art. no. e25081.
- [11] C. Cheng, C. Tashi, H. Li, *et al.*, "Duplex PCR authentication method of *C. sinensis* original powder", *CN103233062A Patent*, 2012. [Online]. Available: <https://patents.google.com/patent/CN103233062A/zh>. [Accessed Aug. 08, 2021].
- [12] F. Zhang, B. Niu, J. Song, *et al.*, "A kind of duplex PCR detection method for *C. sinensis* authenticity" *CN107090502A Patent*, 2017. [Online]. Available: <https://patents.google.com/patent/CN107090502A/zh>. [Accessed Aug. 08, 2021]
- [13] S. Kumar, K. Tamura, and M. Nei, "MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment," *Briefings in Bioinformatics*, vol. 5, pp. 150-163, 2004.
- [14] T. C. Wen, Y. P. Xiao, Y. F. Han *et al.*, "Multigene phylogeny and morphology reveal that the Chinese medicinal mushroom '*Cordyceps gunnii*' is *Metacordyceps neogunnii* sp. nov.," *Phytotaxa*, vol. 302, no. 1, pp. 027-039, 2017.
- [15] P. Myers, R. Espinosa, C. S. Parr *et al.*, "The Animal Diversity," 2021. [Online]. Available: <https://animaldiversity.org>. [Accessed Oct. 02, 2022]
- [16] X. L. Wang and Y. J. Yao, "Host insect species of *Ophiocordyceps sinensis*: a review," *ZooKeys*, vol. 127, pp. 43-59, 2011.