

ANALYSIS OF MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR PARAMETERS RELATED TO THE DEGENERATION OF SOME *CORDYCEPS MILITARIS* STRAINS

Ta Thi Dong^{1†}, Nguyen Thi Hong Ha^{1†}, Bui Ngoc Anh³, Phan Thi Lan Anh²

Do Thi Gam², Nguyen Van Phuong⁴, Do Tien Phat^{1,3*}

¹Institute of Biotechnology – VAST, ²High-tech development center - VAST

³Graduate University of Science and Technology - VAST, ⁴Hanoi University of Science and Technology – VAST

[†]These authors had distributed equally to this work and sharing first authorship

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 02/3/2023	In this study, we performed assessment of various parameters related to growth, development and morphology of different <i>Cordyceps militaris</i> strains, which showed certain levels of degeneration, at different culture stages. In addition, the information about the Mating-type (MAT) pairing locus was also analyzed and validated. Our results showed that symptoms of the fungal degeneration could be identified at all stages of the artificial cultivation process. The highly degenerative strains showed pale or albino mycelia on the primary propagation medium, while pellets were not well performed at the liquid culture stage. The highly degenerated strains had significant reduction in mycelium development along with no fruiting body induction. The other degenerated strains showed morphological variety of fruit bodies. In addition, the MAT gene was not found in spores of the highly degenerated strains or occurred at very low rate. These results provide sufficient strategies to early detect degenerative levels of <i>C. militaris</i> strains through morphological as well as molecular parameters at different culture stages.
Revised: 16/5/2023	
Published: 16/5/2023	
KEYWORDS	
C.militaris	
Degeneration	
MAT	
Fruiting body	
Pellets	

PHÂN TÍCH ĐẶC ĐIỂM PHÂN TỬ VÀ HÌNH THÁI LIÊN QUAN TỚI KHẢ NĂNG THOÁI HÓA CỦA MỘT SỐ CHỦNG NẤM NHỘNG TRÙNG THẢO (*Cordyceps militaris*)

Tạ Thị Đông^{1†}, Nguyễn Thị Hồng Hà^{1†}, Bùi Ngọc Ánh³, Phan Thị Lan Anh²

Đỗ Thị Gấm², Nguyễn Văn Phương⁴, Đỗ Tiến Phát^{1,3*}

¹Viện Công nghệ sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và công nghệ Việt Nam

²Trung tâm Phát triển công nghệ cao - Viện Hàn lâm Khoa học và công nghệ Việt Nam

³Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và công nghệ Việt Nam

⁴Trường Đại học Khoa học và Công nghệ Hà Nội - Viện Hàn lâm Khoa học và công nghệ Việt Nam

[†]Các tác giả có đóng góp như nhau cho công trình và là đồng tác giả đầu tiên

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 02/3/2023	Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành theo dõi, đánh giá tổng thể các đặc điểm sinh trưởng, phát triển và hình thái của các chủng nấm <i>Cordyceps militaris</i> có biểu hiện thoái hóa giống ở các giai đoạn nuôi cấy khác nhau. Thêm vào đó, đặc điểm phân tử liên quan tới locus bắt cặp Mating-type (MAT) cũng được phân tích. Kết quả nghiên cứu cho thấy, các dấu hiệu về thoái hóa giống có thể xác định ở tất cả các giai đoạn nuôi cấy nhân tạo nấm nhộng trùng thảo. Các chủng nấm thoái hóa mạnh có hệ sợi màu nhạt hoặc bạch tạng trên môi trường nhân giống cấp một, thể pellets hình thành không rõ ràng hoặc vô định hình ở giai đoạn nuôi cấy dịch thể. Ở giai đoạn nuôi tạo quả thể, hệ sợi của các chủng có mức độ thoái hóa cao phát triển chậm, mầm quả thể không được hình thành. Quả thể của các chủng có mức độ thoái hóa thấp phát triển không đồng đều và có hiện tượng dị dạng. Các chủng thoái hóa mạnh có tỷ lệ bào tử mang gen MAT rất thấp hoặc không chứa gen MAT. Kết quả của nghiên cứu này giúp các cơ sở sản xuất có thể phát hiện sớm các chủng giống thoái hóa ở các giai đoạn nuôi cấy thông qua tiêu chí hình thái cũng như đặc điểm phân tử đặc trưng của các chủng nấm.
Ngày hoàn thiện: 16/5/2023	
Ngày đăng: 16/5/2023	
TỪ KHÓA	
C. militaris	
Thoái hóa	
MAT	
Mầm quả thể	
Thể pellets	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.7470>

* Corresponding author. Email: dtphat@ibt.ac.vn

1. Đặt vấn đề

Cordyceps militaris là loài nấm thuộc họ Cordycipitaceae, chi Cordyceps. Đây là chi đa dạng nhất trong họ Clavicipitaceae về số lượng loài (hơn 400 loài) với phổ ký chủ rộng là ấu trùng và nhộng của các loài bướm, các loài côn trùng thuộc bộ cánh cứng (Coleoptera), bộ cánh màng (Hymenoptera), bộ hai cánh (Diptera) [1]-[3]. Các loài thuộc chi *Cordyceps* phân bố trải rộng từ châu Á sang châu Âu và cả ở Bắc Mỹ. Hiện nay đã có nhiều nghiên cứu công bố về thành phần dược chất của nấm *C. militaris* cũng như giá trị dược học và cơ chế tác động của các chất này ở cả mức độ phân tử, tế bào và lâm sàng. Các phân tích hoá học cho thấy, trong sinh khối của nấm nhộng trùng thảo có chứa nhiều hợp chất tự nhiên có hoạt tính sinh học như: cordycepin, adenosine, cordiceptic acid, polysaccharide, protein (khoảng 25-30%), chất béo (khoảng 8%) và đường mannitol. Ngoài ra, còn có khoảng từ 17 đến 19 loại acid amin khác nhau và các loại vitamin (trong 100 g sinh khối nấm *C. militaris* có khoảng 0,12 g vitamin B12; 19 mg vitamin A; 116,03 mg vitamin C, ngoài ra còn có vitamin B2 (riboflavin), vitamin E, vitamin K...) cũng như nhiều nguyên tố vi lượng như Na, K, Ca, Mg, Al, Mn, Cu, Zn, Bo, Fe...; trong đó cao nhất là phospho [4], [5]. Với giá trị dược lý cao, loài nấm này ngoài tự nhiên đang bị khai thác một cách quá mức và dẫn tới khan hiếm, cạn kiệt.

Gần đây, nấm *C. militaris* đã được nuôi cấy thành công trên giá thể tổng hợp trong điều kiện nhân tạo ở các quy mô khác nhau. Quả thể là bộ phận chính được thu hoạch của nấm *C. militaris* để phục vụ tiêu thụ và chế biến. Thể quả chỉ được tạo ra trong vòng đời sinh sản hữu tính của nhộng trùng thảo mà không hình thành trong giai đoạn phát triển qua phương thức sinh sản vô tính. Tuy nhiên, trong quá trình nuôi trồng nhân tạo đã ghi nhận hiện tượng thoái hóa giống ảnh hưởng trực tiếp đến khả năng tạo quả thể, hình thành quả thể dị dạng làm giảm năng suất và chất lượng của nấm gây thiệt hại đáng kể về kinh tế cho người sản xuất. Do vậy, việc phát hiện sớm các chủng nấm thoái hóa sẽ giúp người sản xuất tránh được những rủi ro, đồng thời lựa chọn được các chủng có chất lượng tốt để sử dụng trong quá trình nuôi cấy. Các nghiên cứu gần đây đã chỉ ra một số đặc điểm về hình thái cũng như phân tử liên quan tới khả năng thoái hóa giống của nấm nhộng trùng thảo [6], [7].

Ở Việt Nam, nấm nhộng trùng thảo được nuôi cấy khá phổ biến ở nhiều đơn vị nghiên cứu cũng như cơ sở sản xuất trong những năm gần đây và cũng đang đối mặt với nhiều vấn đề liên quan tới hiện tượng thoái hóa giống. Tuy nhiên, các nghiên cứu về cơ chế thoái hóa giống, cách phát hiện và xác định chủng giống thoái hóa còn rất hạn chế [8], [9]. Xuất phát từ cơ sở khoa học và thực tiễn trên, chúng tôi tiến hành phân tích tổng thể về các đặc điểm hình thái trong các giai đoạn nuôi cấy và phân tử của một số chủng nấm có biểu hiện thoái hóa ở các mức độ khác nhau nhằm xác định được các tiêu chí phát hiện sớm hiện tượng thoái hóa giống nấm nhộng trùng thảo.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Giống nấm nhộng trùng thảo: Các chủng nấm thương mại *C. militaris* S1, S2, S3, S4, S5, S6 được sưu tầm, lưu giữ trong môi trường PDA (Potato Dextrose Agar) và bảo quản trong điều kiện tối, ở 4°C tại phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập và phát triển các dòng bào tử đơn

Đối với các chủng có sinh quả thể, bào tử đơn được tách theo phương pháp của Kang và cộng sự [10]. Cụ thể, phần đỉnh quả thể (2-3 cm) với các túi sinh bào tử được gắn vào mặt trong của đĩa petri chứa nước cất và 2% agar (WA). Các chủng không có khả năng hình thành quả thể, hệ sợi được trải trên các tiêu bản, bào tử đơn được tách và đặt lên môi trường agar. Các đĩa môi

trường được nuôi cấy 5 ngày ở 25°C trong điều kiện chiếu sáng liên tục để kích thích các bào tử nảy mầm. Hệ sợi nấm phát triển từ các bào tử đơn được tách và nuôi cấy trong 50 ml môi trường Potato Dextrose Broth (PDB).

2.2.2. Định danh và phân tích gen MAT

Hệ sợi nấm trong giai đoạn sinh trưởng sinh dưỡng được thu thập trên đĩa môi trường đặc Potato Dextrose Agar (PDA) và sử dụng cho tách chiết DNA tổng số theo phương pháp CTAB [10]. Phản ứng PCR được thực hiện với cặp mồi đặc hiệu ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') và ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATG C-3') [11]. Sản phẩm PCR được tinh sạch và dùng cho giải trình tự theo phương pháp Sanger với các hệ thống máy đọc tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Các cặp mồi cho các gen MAT (MAT1-1-1 R: ATATACCTTCGCGATCATTGC; MAT1-1-1-F: ATGGAACACAGATCGAGCGACAC; MAT1-2-1-F: TGTTTTGTGCGGATGGTTCTGG; MAT1-2-1-R: CCTCTGGAGGTTCTGCATTCCA; MAT1-1-2-F: CGACATACGCTTGTC AAG; MAT1-1-2-R: GATGCCGTTTCGAGGAGAG) được thiết kế dựa trên trình tự đã được công bố trong các nghiên cứu trước [6], [12] và dùng để khuếch đại các phân đoạn gen MAT trong các chủng nấm sử dụng hệ DreamTaq Green PCR Master Mix. Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel Agarose 1%.

2.2.3. Đánh giá sinh trưởng phát triển của nấm trên môi trường nhân giống cấp 2 (nuôi dịch thể)

Dùng dao cấy cắt phần môi trường (kích thước 0,5 cm × 0,5 cm) có chứa hệ sợi phát triển trên đĩa nuôi cấy giống cấp 1 và chuyển vào bình tam giác chứa 200 mL môi trường nhân giống cấp 2 (thành phần: peptone + cao nấm men + MgSO₄ + KH₂PO₄ + Glucose) sau đó được nuôi lắc trong điều kiện 22°C, 150 vòng/phút, thời gian nuôi cấy khoảng 5 - 7 ngày. Thể pellets được lấy ra pha loãng với nước cất vô trùng, quan sát và đánh giá các đặc điểm hình thái.

2.2.4. Đánh giá sinh trưởng và khả năng tạo quả thể

Thí nghiệm được thực hiện theo phương pháp của Wen và cộng sự [13]. Cụ thể, dịch thể của các chủng *C. militaris* (S1-S6) được nuôi cấy trong hộp cơ chất có kích thước 9 x 9 x 9 cm. Thành phần cơ chất trong mỗi bình bao gồm: 50% gạo, 25% nhộng tằm, 15% khoai tây, 10% bột đậu, thành phần khoáng (Nước dừa + MgSO₄ + KH₂PO₄ + Thiamin B1 + đường glucose) và được khử trùng ở 117°C trong 20 phút. Dịch nuôi cấy giống cấp 2 được pha loãng 20 lần và phun đều trên bề mặt mỗi bình môi trường cơ chất (khoảng 5 mL/ bình nuôi). Bình nuôi nấm được đặt điều kiện tối hoàn toàn, ở nhiệt độ 22°C trong 7-12 ngày. Khi hệ sợi phát triển kín bề mặt cơ chất, bình nuôi nấm được chuyển ra điều kiện chiếu sáng (900 lux), ở nhiệt độ 22°C, độ ẩm 80%, quang chu kỳ 14/10 (sáng/tối), trong khoảng 8 - 9 tuần.

2.2.5. Xử lý số liệu

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần liên tiếp và số liệu được phân tích thống kê one-way ANOVA và kiểm định Tukey với P<0,05 và phần mềm bảng tính microsoft office excel.

3. Kết quả

3.1. Kiểm tra tính đồng nhất về loài của các chủng nấm sưu tầm

Để kiểm chứng tính đồng nhất về loài của các chủng nấm thu thập, chúng tôi tiến hành tách chiết DNA tổng số và khuếch đại trình tự ITS với cặp mồi đặc hiệu. Kết quả phân tích cho thấy, sản phẩm PCR được khuếch đại từ hệ gen các chủng nấm có cùng một băng vạch với kích thước khoảng 550 bp. Ngoài ra, kết quả giải trình tự ITS khẳng định, các chủng nấm thu thập đều thuộc loài *Cordyceps militaris* với độ tương đồng về trình tự phân đoạn ITS lên đến trên 99%.

3.2. Khả năng phát triển hệ sợi của các chủng nấm nghiên cứu

Các đặc điểm của hệ sợi bao gồm đường kính, tốc độ phát triển và đặc điểm hình thái hệ sợi được theo dõi và phân tích trên Bảng 1. Chúng tôi ghi nhận, hệ sợi của các chủng nấm không chỉ có sự sai khác về tốc độ sinh trưởng mà còn có sự khác biệt rõ rệt về màu sắc cũng như hình thái theo (Hình 1A và Bảng 1). Trong đó, chủng S1 và S2 đều có hệ sợi mịn, màu vàng cam, tuy nhiên trên bề mặt của chủng S1 có nhiều vết xẻ rãnh (dấu hiệu của mầm quả thể). Chủng S3 và S4 có màu vàng nhạt, đường kính hệ sợi nhỏ hơn, trong khi đó 2 chủng còn lại hệ sợi phát triển tốt nhưng các sợi nấm có màu trắng.

Bảng 1. Đặc điểm phát triển và hình thái nấm ở giai đoạn giống cấp 1 sau 22-25 ngày nuôi

Tên chủng	Đường kính bào tử nấm (cm)	Đặc điểm hình thái của bào tử nấm
S1	5,61 ± 0,15 ^b	Vàng cam, viền trắng, mép có răng cưa, hệ sợi mịn, có phần, quanh tâm có xẻ rãnh
S2	5,46 ± 0,11 ^b	Vàng cam, viền trắng, hệ sợi mịn, tâm có chóp
S3	3,83 ± 0,30 ^a	Vàng cam nhạt, viền trắng, hệ sợi bông, mép có răng cưa, có phần, tâm có chóp và vòng phóng xạ
S4	3,76 ± 0,31 ^a	Vàng cam nhạt, viền trắng, hệ sợi bông, mép có răng cưa, tâm có chóp
S5	5,6 ± 0,22 ^b	Trắng bột, quanh tâm có màu vàng nhạt, hệ sợi dạng phần
S6	5,4 ± 0,14 ^b	Trắng bột, quanh tâm có màu vàng nhạt, hệ sợi dạng phần, có vòng phóng xạ

Ghi chú: Các chữ cái a,b,c khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa ở $P < 0,05$.

Theo Sun và cộng sự (2017), với các chủng *C. militaris* bình thường, thể sợi thường có màu vàng sáng và vàng đậm, trong khi các biến chủng thoái hóa thường có dạng bạch tạng, sợi nấm có thể chuyển màu trắng [14]. Như vậy, trong kết quả nghiên cứu của chúng tôi, các chủng nấm S5 và S6 đã có những dấu hiệu của sự thoái hóa ngay trong giai đoạn phát triển hệ sợi. Ngoài ra, tốc độ sinh trưởng chậm của hai chủng S3 và S4 cũng là một yếu tố cần theo dõi và phân tích tiếp ở các giai đoạn nuôi cấy tiếp theo.

3.3. Sinh trưởng của các chủng nấm *C.militaris* ở giai đoạn giống cấp 2

Các chủng nấm *C.militaris* sử dụng cho thí nghiệm được nuôi trong môi trường nhân giống cấp 2 thời gian 5-7 ngày. Tiếp theo, dịch nuôi được pha loãng theo tỷ lệ của dịch giống/ nước cất là 1/20 và dùng để quan sát đặc điểm hình thái thể pellets. Kết quả cho thấy, các chủng nấm có tốc độ sinh trưởng và hình thành thể pellets rất khác nhau. Các đặc điểm về hình dạng và số lượng thể pellets của các chủng nấm được tổng hợp trên Bảng 2.

Bảng 2. Đặc điểm sinh trưởng hình thái của thể pellets nấm *C.militaris*

Tên chủng	Thời gian nuôi cấy	Số Lượng thể pellets/20 mL dịch nuôi (pellets)	Đặc điểm hình thái của thể pellets
S1	5	62,67 ± 3,67 ^b	Thể pellets màu trắng sữa, hình cầu gai có nhiều xúc tua (3-5 xúc tua/ thể pellets), kích thước pellets đồng đều.
S2	5	81,83 ± 3,92 ^c	Thể pellets màu trắng sữa, hình con thoi (2-3 xúc tua/ thể pellets), kích thước thể pellets đồng đều.
S3	7	22,17 ± 3,49 ^a	Thể pellets màu trắng, ở dạng vô định hình, nhiều sợi tơ bao kín quanh nhân.
S4	7	17,83 ± 1,17 ^a	Thể pellets màu ngà vàng, ở dạng vô định hình, bào tử có dạng viên, có sợi tơ bao quanh nhân.
S5	0	0 ± 0,00	Dịch nấm dạng huyền phù.
S6	0	0 ± 0,00	Dịch nấm dạng huyền phù.

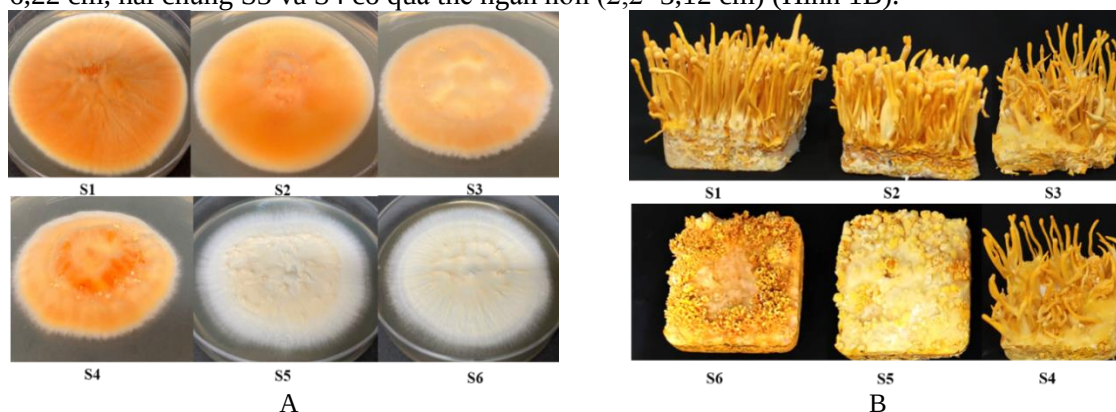
Ghi chú: Các chữ cái a,b,c khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa ở $P < 0,05$.

Thể pellets thu được ở giai đoạn nhân giống cấp 2 chỉ xuất hiện ở 4 chủng S1, S2, S3, S4. Trong khi đó, dịch nuôi nấm của chủng S5 và S6 không ghi nhận việc hình thành thể pellets. Hai chủng S1 và S2 có hình thái thể pellets đồng đều, màu trắng sữa có tạo xúc tua bao quanh, sau 5 ngày thể

pellets đã kín đặc dịch nuôi cấy. Ở chủng S3 và S4, thể pellets ở hình dạng vô định hình, phát triển chậm, sau 7 ngày mật độ thể pellets vẫn còn rất thưa (Bảng 2). Thể pellets không hình thành ở chủng S5 và S6, dịch nuôi ở dạng huyền phù. Mật độ thể pellets cao nhất ghi nhận ở chủng S2 ($81,83 \pm 3,92$ pellets), tuy nhiên kích thước thể pellets lại có phần nhỏ hơn so với chủng S1.

3.4. Khả năng sinh trưởng và tạo quả thể

Trên môi trường giá thể, hệ sợi của các chủng S1-S4 có tốc độ sinh trưởng nhanh, các sợi nấm bao phủ hoàn toàn cơ chất trong khoảng 7-8 ngày. Tuy nhiên, thời gian hình thành mầm quả thể của hai chủng S1 và S2 (11-12 ngày) sớm hơn nhiều so với hai chủng S3 và S4 (16 -18 ngày). Ngoài ra, số lượng mầm quả thể của hai chủng S1 và S2 cũng vượt trội so với hai chủng S3 và S4. Tiếp tục theo dõi sự hình thành và phát triển của quả thể nấm nhộng trùng thảo trong các giai đoạn tiếp, các số liệu được tổng hợp và trình bày trên Hình 1B và Bảng 3. Cụ thể, chiều dài trung bình của quả thể lớn nhất (6,91cm) được ghi nhận từ chủng S1. Ở chủng này, quả thể mảnh, phía đầu nhọn hoặc hình chùy, màu cam đậm và hướng quang mạnh. Ở các chủng S2, S3 và S4, quả thể có hình thái khá tương đồng: màu vàng nhạt, đỉnh quả thể có hình chùy. Tuy nhiên, kích thước của quả thể có sự khác biệt giữa các chủng. Quả thể của chủng S2 có chiều dài trung bình 6,22 cm, hai chủng S3 và S4 có quả thể ngắn hơn (2,2 -3,12 cm) (Hình 1B).



Hình 1. Sự phát triển của hệ sợi và quả thể của các chủng nấm nhộng trùng thảo. **A:** Hình thái 6 chủng nấm trên môi trường nhân giống cấp 1; **B:** Hình thái quả thể nấm sau 60 ngày nuôi cấy trên cơ chất; **S1:** chủng *Cordyceps militaris* S1; **S2:** chủng *Cordyceps militaris* S2; **S3:** chủng *Cordyceps militaris* S3; **S4:** chủng *Cordyceps militaris* S4; **S5:** chủng *Cordyceps militaris* S5; **S6:** chủng *Cordyceps militaris* S6

Bảng 3. Kích thước và số lượng quả thể ở 6 chủng nấm *C. militaris*

Tên chủng	Chiều dài quả thể (cm)	Số lượng mầm quả thể/ hộp cơ chất	Khối lượng quả thể/ hộp cơ chất	Đặc điểm phát triển hình thái của quả thể nấm
S1	$6,91 \pm 0,25^d$	$97,97 \pm 1,63^d$	$55,18 \pm 0,67^d$	Đỉnh quả thể nấm nhọn hoặc hình chùy, hướng quang mạnh, màu vàng cam đậm
S2	$6,22 \pm 0,22^c$	$83,4 \pm 1,76^c$	$50,6 \pm 0,52^c$	Đỉnh quả thể nấm hình chùy lớn, hướng quang mạnh, màu vàng cam.
S3	$3,12 \pm 0,04^b$	$42,41 \pm 1,49^b$	$19,29 \pm 0,14^b$	Đỉnh quả thể nấm hình chùy lớn, hướng quang mạnh, màu cam nhạt, một số quả thể có phần đỉnh chẻ thùy, tạo bông xốp.
S4	$2,20 \pm 0,37^a$	$30,62 \pm 0,41^a$	$14,93 \pm 0,88^a$	Đỉnh quả thể nấm hình chùy lớn, hướng quang mạnh, màu cam nhạt, nhiều quả thể có phần đỉnh chẻ thùy, tạo bông xốp.
S5	0,00	0,00	0,00	Không tạo được quả thể, hệ sợi chuyển màu vàng cam nhạt.
S6	0,00	0,00	0,00	Không tạo được quả thể, hệ sợi và đám nấm có màu vàng cam

Ghi chú: Các chữ cái a,b,c khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa ở $P < 0,05$.

Mặc dù tiếp tục được nuôi cấy và theo dõi, hai chủng S5 và S6 không cho thấy việc hình thành quả thể rõ ràng. Đám nấm hình thành dày đặc, ngăn sát bề mặt cơ chất và hệ sợi. Không chỉ có sự khác biệt về hình thái quả thể, các chủng nấm nghiên cứu còn cho thấy sự sai khác rõ rệt về số lượng mầm quả thể và sinh khối quả thể trên một đơn vị cơ chất. Cụ thể, chủng S1 và S2 có số lượng quả thể cao (97,97 và 83,4 quả thể/ hộp nuôi cấy) dẫn tới khối lượng quả thể cũng đạt giá trị lớn (55,18 và 50,6 g/ hộp nuôi cấy). Trong khi đó, các chủng S3 và S4 có số lượng quả thể giảm còn 1/3-1/2 so với hai chủng trên, dẫn tới sinh khối quả thể thu được giảm mạnh (19,29 và 14,93 g/ hộp nuôi cấy).

3.5. Đặc điểm thành phần gen MAT trong các chủng nấm nghiên cứu

Kết quả nghiên cứu cho thấy, cả 6 chủng kiểm tra đều không ghi nhận sự có mặt sản phẩm khuếch đại của gen MAT 1-2. Ngoài ra, sản phẩm PCR của gen MAT 1-1-1 chỉ được phát hiện ở chủng S1. Trong khi đó, sản phẩm PCR của gen MAT 1-1-2 được phát hiện trong các bào tử của các chủng S1, S2, S3, S4, nhưng không ghi nhận ở hai chủng S5 và S6.

Cụ thể, 68,57% các bào tử đơn của chủng S1 mang các gen MAT. Trong đó, tỷ lệ bào tử mang gen MAT1-1-1 là 6,25% và gen MAT1-1-2 là 62,5% (Bảng 4). Trong khi đó, bào tử của các chủng S2, S3, S4 chỉ ghi nhận sự có mặt của gen MAT1-1-2 với tỷ lệ dao động từ 34,67 tới 57,33%. Riêng với 2 chủng S5 và S6, chúng tôi không ghi nhận bào tử nào có chứa gen MAT.

Bảng 4. Tỷ lệ gen MAT của các chủng nấm

Chủng (số bào tử)	Bào tử mang gen MAT 1-1-1	Bào tử mang gen MAT1-1-2	Bào tử mang gen MAT1-2	Tỷ lệ bào tử mang gen MAT (%)
S1 (32)	2,0 ± 0,55	20,00 ± 0,71	0,00	68,57 ± 2,61
S2(28)	0,00	17,00 ± 0,55	0,00	57,33 ± 7,23
S3(28)	0,00	10,00 ± 1,14	0,00	36,00 ± 3,65
S4(26)	0,00	9,00 ± 0,84	0,00	34,67 ± 8,69
S5(10)	0,00	0,00	0,00	0,00
S6(10)	0,00	0,00	0,00	0,00

4. Thảo luận

Nuôi trồng các chủng nấm *C. Militaris* bị thoái hóa sẽ làm giảm năng suất và chất lượng nấm, đồng thời gây thiệt hại về kinh tế cho các nhà sản xuất. Do vậy, việc phát hiện các chủng nấm bị thoái hóa từ các giai đoạn đầu của quy trình nuôi cấy mang ý nghĩa rất quan trọng. Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra một số đặc điểm để nhận dạng các chủng nấm thoái hóa. Sự thay đổi màu sắc của các chủng thoái hóa và bạch tạng có thể là do giảm khả năng tích lũy và hàm lượng các sắc tố [14], [15]. Điều này cũng được ghi nhận trong nghiên cứu này của chúng tôi, trong đó hệ sợi chủng S3 và S4 có màu sắc nhạt hơn so với chủng S1 và S2. Hai chủng S5 và S6 với mức độ thoái hóa cao, hệ sợi có màu trắng và rất ít sắc tố được quan sát trên đĩa môi trường. Như vậy, màu sắc của hệ sợi nấm trên môi trường nhân giống cấp 1 có thể xem là một tiêu chí quan trọng để nhận diện sự thoái hóa của chủng nấm nghiên cứu. Ngoài ra, trong nghiên cứu này chúng tôi cũng ghi nhận sự khác biệt về dạng dịch và thể pellets của các chủng nấm có mức độ thoái hóa khác nhau trên môi trường nhân giống cấp 2. Do vậy, hình thái thể pellets và tốc độ phát triển trên môi trường dịch lỏng cũng có thể được xem là tiêu chí quan trọng để kiểm tra khả năng thoái hóa các chủng nấm nặng trùng thảo.

C. militaris là một loại nấm dị thể hay dị sản (heterothallic) có quá trình sinh sản hữu tính, được kiểm soát bởi các gen quy định kiểu bắt cặp (mating type) [16]. Các gen kiểu giao phối của *C. militaris* nằm trong nhân, một nhân đơn chứa một locus kiểu giao phối, MAT- α (chứa gen MAT 1-1) hoặc MAT-HMG (chứa gen MAT 1-2) [17]. Các chủng nhân đồng hợp (homokaryotic) chỉ chứa một locus kiểu giao phối và không thể hoàn thành vòng đời hữu tính, trong khi các chủng nhân dị hợp (heterokaryotic) chứa hai locus kiểu giao phối và có thể hoàn thành vòng đời hữu tính. Sự biến đổi các thể mang nhân dị hợp thành thể có nhân đồng hợp có

thể là một trong những nguyên nhân gây ra sự thoái hóa *C. militaris* [18]. Các chủng chứa cả hai gen kiểu giao phối đối lập (MAT 1-1 và MAT 1-2) có thể tạo ra thể quả hoàn chỉnh, trong khi các chủng chỉ chứa một gen kiểu giao phối duy nhất (MAT 1-1 hoặc MAT 1-2) tạo ra thể quả không sinh bào tử hoặc không tạo ra thể quả [19]. Tuy nhiên, các nghiên cứu trước đây cũng đã cho thấy rằng, *C. militaris* chỉ chứa một gen kiểu giao phối có thể tạo ra thể quả, trong khi *C. militaris* chứa cả hai gen kiểu giao phối ngược lại không thể tạo ra thể quả [20]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi nhận thấy các chủng nấm thoái hóa mạnh (S5, S6) không còn chứa thành phần gen MAT. Trong khi các chủng còn lại chỉ chứa một kiểu gen giao phối là MAT1-1 (MAT1-1-1 và MAT1-1-2). Tỷ lệ bào tử mang gen MAT cũng có sự tương đồng với mức độ thoái hóa của giống nhộng trùng thảo. Các chủng có tỷ lệ bào tử mang gen MAT thấp, mức độ thoái hóa cao hơn. Chủng S1 có khả năng sinh trưởng phát triển và tạo quả thể cao nhất tương ứng với tỷ lệ bào tử mang gen MAT cao nhất (68,57%), đồng thời có chứa cả hai gen MAT1-1-1 và MAT1-1-2. Như vậy, cùng với các nghiên cứu trước đây chúng tôi nhận thấy, tỷ lệ và thành phần gen MAT là chỉ tiêu quan trọng để đánh giá mức độ thoái hóa giống của nấm nhộng trùng thảo ở nước ta.

Việc sử dụng tổ hợp các đặc điểm hình thái và phân tử giúp các nhà sản xuất có thể đánh giá mức độ thoái hóa giống của các chủng nấm nhộng trùng thảo trước khi tiến hành nuôi cấy nhằm hạn chế các thiệt hại về kinh tế. Ngoài ra, các đặc điểm này cũng có thể được sử dụng để lựa chọn các chủng giống tiềm năng trong chọn dòng và sản xuất quy mô lớn.

5. Kết luận

Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy mối quan hệ chặt chẽ giữa đặc điểm phát triển hệ sợi, thể pellets và tỷ lệ gen MAT tới mức độ thoái hóa giống của nấm nhộng trùng thảo. Các đặc điểm này có thể sử dụng như tiêu chí để lựa chọn các chủng giống có chất lượng tốt, ít thoái hóa và ứng dụng vào sản xuất nhằm nâng cao hiệu quả kinh tế và giảm thiểu rủi ro cho quá trình nuôi cấy công nghiệp nấm nhộng trùng thảo.

Lời cảm ơn

Kính phí dùng trong nghiên cứu được hỗ trợ bởi đề tài thuộc chương trình 562 “Nghiên cứu tuyển chọn giống, bảo tồn và tối ưu điều kiện nuôi trồng nhằm nâng cao chất lượng nấm nhộng trùng thảo (*Cordyceps militaris*) cho sản xuất chế phẩm bảo vệ sức khỏe”, chủ nhiệm đề tài TS. Đỗ Thị Gấm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] E. B. Mains, “North American entomogenous species of *Cordyceps*,” *Mycologia*, vol. 50, pp. 169-222, 1958.
- [2] Y. Kobayasi, “Keys to the taxa of the genera *Cordyceps* and *Torrubiella*,” *Transactions of the Mycological Society of Japan*, vol. 23, pp. 329-364, 1982.
- [3] O. Stensrud, N. L. Hywel-Jones, and T. Schumacher, “Towards a phylogenetic classification of *Cordyceps*: ITS nrDNA sequence data confirm divergent lineages and paraphyly,” *Mycological Research*, vol. 109, pp. 41-56, 2005.
- [4] C. Nachshol, J. Cohen, M. D. Asatiani, V. K. Varshney, Y. Hui-Tzu, Y. C. Yang, Y. H. Li, J. L. Mau, and S. P. Wasser, “Chemical composition and nutritional and medicinal value of fruit bodies and submerged cultured mycelia of culinary-medicinal higher Basidiomycetes mushrooms,” *Int J Med Mushrooms*, vol. 16, no. 3, pp. 273-291, 2014.
- [5] J. S. L. Chan, G. S. Barseghyan, M. D. Asatiani, and P. W. Solomon, “Chemical Composition and Medicinal Value of Fruiting Bodies and Submerged Cultured Mycelia of Caterpillar Medicinal Fungus *Cordyceps militaris* CBS-132098 (Ascomycetes),” *Int J Med Mushrooms*, vol. 17, no. 7, pp. 649-659, 2015.
- [6] A. Chen, Y. Wang, Y. Shao, and B. Huang, “A novel technique for rejuvenation of degenerated caterpillar medicinal mushroom, *Cordyceps militaris* (Ascomycetes), a valued traditional chinese medicine,” *International Journal of Medicinal mushrooms*, vol. 19, no. 1, pp. 87-91, 2017.

-
- [7] J. Yin, X. Xin, Y. Weng, and Z. Gui, "Transcriptome-wide analysis reveals the progress of *Cordyceps militaris* subculture degeneration," *PLoS One*, vol. 12, 2017, Art. no. e0186279.
- [8] V. V. Le, H. T. Tran, T. B.T. Nguyen, and N. X. Ngo, "Initial research on *cordyceps militaris* L.ex Fr.) cultivation technology in Vietnam," *Journal of Science and Development*, vol. 13, no. 3, pp. 445-454, 2015.
- [9] T. X. Vu, T. B. Tran, M. T. Nguyen, C. T. Tran, M. B. Tran, D. H. Thai, T. V. Tran, and H. Q. Nguyen, "Study to determine MAT sex genes, yield and cordycepin content of some strains of *Cordyceps militaris* medicinal mushrooms being cultivated in Vietnam," *Vietnam Journal of Science and Technology*, vol. 64, no. 7B, pp. 60-64, 2022.
- [10] J. J. Doyle and J.L. Doyle, "Isolation of plant DNA from fresh tissue," *Focus*, vol. 12, pp. 13-15, 1990.
- [11] T. J. White, "Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics," In *PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications*, 1990, pp. 315-322.
- [12] N. Kang, H. Lee, H. I. Park, and Y. S. Seo, "Development of high cordycepin-producing *cordyceps militaris* strains," *Mycobiology*, vol. 45, no. 1, pp. 31-38, 2017.
- [13] T. Wen, M. Li, J. Kang, and B. X. Lei, "A molecular genetic study on the fruiting-body formation of *Cordyceps militaris*," *Korean Society of Mycology News: Proceedings of the conference*, 2009, pp. 76-95.
- [14] S. J. Sun, C. H. Deng, L. Y. Zhang, and K. H. Hu, "Molecular analysis and biochemical characteristics of degenerated strains of *Cordyceps militaris*," *Archives of microbiology*, vol. 199, pp. 939-944, 2017.
- [15] P. Zheng, Y. Xia, G. Xiao, C. Xiong, X. Hu, S. Zhang *et al.*, "Genome sequence of the insect pathogenic fungus *Cordyceps militaris*, a valued traditional Chinese medicine," *Genome biology*, vol. 12, pp. 1-22, 2012.
- [16] X. H. Gao, "Study on the mating type of *Cordyceps militaris*," *Acta Edulis Fungi*, vol. 15, pp. 1-5, 2008.
- [17] H. Wang, J. Wei, N. Lin, A. Feng, M. Chen, and D. Bao, "Distribution of mating-type genes in fruiting and non-fruiting forms of *Cordyceps militaris*," *Acta Edulis Fungi*, vol. 17, pp. 1-4. 2010.
- [18] B. Shrestha, H. K. Kim, G. Sung, H. Yin, J. W. Spatafora, and J. M. Sung, "Bipolar heterothallism, a principal mating system of *Cordyceps militaris* in vitro," *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, vol. 9, pp. 440-446, 2004.
- [19] J. Yin, X. D. Xin, Y. J Weng, S. H. Li, J. Q. Jia, and Z. Z. Gui, "Genotypic analysis of degenerative *Cordyceps militaris* cultured in the pupa of *Bombyx mori*," *Entomological Research*, vol. 48, pp. 137-144, 2018.
- [20] H. Lou, J. Lin, L. Guo, X. Wang, S. Tian, C. Liu, Y. Zhao, and R. Zhao, "Advances in research on *Cordyceps militaris* degeneration," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 103, pp. 7835-7841, 2019, doi: 10.1007/ s00253-019-10074-z.