

Phân tích phả hệ phân tử nhằm hỗ trợ định danh các mẫu nấm DL0038A và DL0038B thuộc chi *Cordyceps*

• **Vũ Tiên Luyện**

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

• **Đinh Minh Hiệp**

Trung tâm Nông nghiệp Công nghệ cao, TP.HCM

• **Trương Bình Nguyên**

Trường Đại học Đà Lạt

• **Lao Đức Thuận**

• **Trịnh Văn Hạnh**

• **Lê Huyền Ái Thúy**

Trường Đại học Mở TP.HCM

(Bài nhận ngày 11 tháng 08 năm 2015, nhận đăng ngày 28 tháng 03 năm 2016)

TÓM TẮT

Công bố trước đây của chúng tôi đã tạm thời kết luận mẫu nấm DL0038A và B là *Cordyceps takaomontana*. Nhằm củng cố hơn nữa công tác phân loại định danh các mẫu nấm này, chúng tôi tiếp tục bổ sung phân tích phả hệ đơn gen từng gen *nrSSU* (nuclear ribosomal small subunit) hay *rpb1* (largest subunit of RNA polymerase II), cũng như **Từ khóa:** *Cordyceps takaomontana*, *nrSSU*, *nrLSU*, phát sinh chủng loài, *rpb1*

phân tích kết hợp dữ liệu đa gen, bao gồm *nrLSU* (nuclear ribosomal large subunit) cùng với *nrSSU* và *rpb1*. Các kết luận phân tích phả hệ trong công bố này một lần nữa ủng hộ quan điểm các mẫu nấm DL0038A và B có quan hệ rất gần hoặc chính là *Cordyceps takaomontana* – thể hữu tính và *Isaria tenuipes* – thể vô tính.

MỞ ĐẦU

Trong công bố của Đinh Minh Hiệp và cộng sự (2014) [6], các tác giả cho biết: hai mẫu nấm ký sinh côn trùng DL0038A và DL0038B được thu nhận từ chuyển đi thực địa ở vùng núi Langbian, Lâm Đồng. Các đặc điểm hình thái và giải phẫu học nhằm sơ bộ phân loại hai mẫu nấm được tóm lược trên các hình 1 và 2, lần lượt cho hai mẫu DL0038A và DL0038B. Dựa vào các đặc điểm hình thái, giải phẫu học, cũng như phân tích sơ bộ phát sinh chủng loài phân tử gen *nrLSU* (largest subunit of RNA polymerase II), cả hai mẫu nấm đều đã được nhận định là loài *Cordyceps takaomontana* [6]. Bên cạnh đó, các kết quả nghiên cứu về khảo sát tiềm năng ứng dụng của chúng trong

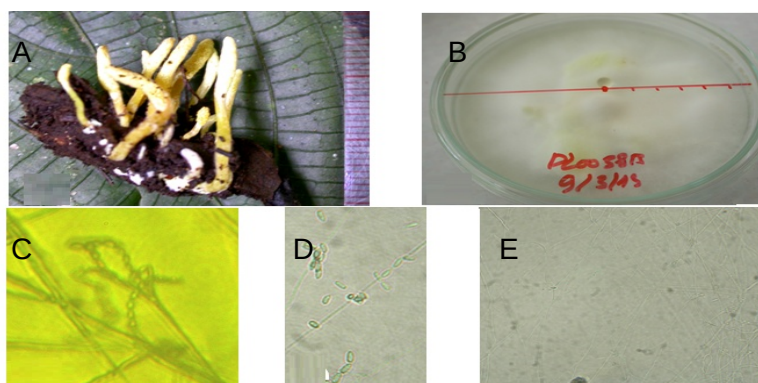
y dược của các mẫu nấm này đã ghi nhận các kết quả chính như sau: xác định sơ bộ thành phần hóa thực vật cho thấy sinh khối hệ sợi mẫu nấm này chứa nhóm hợp chất triterpenoid tự do, saponin, acid hữu cơ, chất khử và hợp chất polyuronic. Cả hai mẫu nấm được khảo sát đều cho thấy chúng có hoạt tính bắt gốc DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) tự do và năng lực khử, đồng thời có chứa polyphenol và polysaccharide. Một số mẫu cao được chọn thử nghiệm đều không gây độc tế bào HepG2 (ở dãy nồng độ xử lý từ 2 – 10 mg/ml) và đều thể hiện khả năng bảo vệ tế bào này (DNA bộ gen của tế bào HepG2 không bị gãy vỡ do tác nhân oxy hóa) [7].

Qua một số dẫn chứng trên đây, có thể thấy rằng các mẫu nấm này là rất tiềm năng để khai thác tính chất

được học trong việc phòng và trị các bệnh liên quan đến sự oxy hóa, suy giảm trí nhớ và ung thư,



Hình 1. Hình thái giải phẫu mẫu nấm DL0038A. (A) Quả thể nấm *Cordyceps takaomontana* (DL0038A) trong tự nhiên; (B) Ký chủ bị bao bọc bởi lớp sợi dày tạo giả hạch màu trắng; (C) Thể chén nhỏ cao; (D) Hệ sợi phát triển trên môi trường agar, màu vàng khi già; (E) Hệ sợi phân nhánh mạnh; (F) Thể bình; (G) Hình thành bào tử đốt; (H) bào tử đốt.



Hình 2. Hình thái giải phẫu mẫu nấm DL0038B. (A) Quả thể *Cordyceps takaomontana* (DL0038B) trong tự nhiên: quả thể còn non, được bao phủ bởi lớp bụi bào tử màu trắng, thể chén chưa nhô lên khỏi bề mặt quả thể; (B) Hệ sợi phát triển trên môi trường PGA; (C, D) Một số dạng bào tử vô tính; (E) Hệ sợi với nhiều cấu trúc thể bình.

Những năm gần đây, một số công trình đã công bố việc sử dụng nhiều gen trong hỗ trợ công tác định danh các mẫu nấm thuộc nhóm ký sinh côn trùng như: Chan và cộng sự (2011) [3, 10] phân tích trình tự vùng DNA ITS, *nrLSU*, *EF-1α*, *rpb1*, ... trong định danh loài *Cordyceps gunnii* tại Trung Quốc. Việc phân tích đa gen, bao gồm *nrSSU*, *nrLSU*, *tef*, *rpb1* và *rpb2* được ứng dụng trong định danh các mẫu nấm thuộc chi *Torrubiella* bởi Johnson và cộng sự (2009)

[8]. Trong số đó, chúng tôi đặc biệt quan tâm đến công trình của Sung và cộng sự (2007) [12] bởi trong công trình này, các tác giả đã hệ thống lại các nhóm nấm, đặc biệt thuộc họ Clavicipitaceae một cách rất tổng thể. Công trình của Sung và cộng sự (2007) đã sử dụng các dữ liệu từ 5 – 7 các gen thuộc nhóm gen thường trực (house-keeping genes) bao gồm: *nrSSU* (nuclear ribosomal small subunit - tiểu đơn vị nhỏ ribosome), *nrLSU* (nuclear ribosomal large subunit -

tiểu đơn vị lớn ribosome), *tef1* (elongation factor 1α - nhân tố kéo dài 1α), *rpb1* (largest subunit of RNA polymerase II - tiểu đơn vị lớn nhất của RNA polymerase II), *rpb2* (second largest subunit of RNA polymerase II - tiểu đơn vị lớn thứ hai của RNA polymerase II), *tub* (β tubulin) và *atp6* (mitochondrial ATP6) của 162 taxon. Qua công trình này, các tác giả đã khẳng định các loài thuộc nhóm nấm này nên được chia thành ba họ là họ Clavicipitaceae với các chi *Metacordyceps*, *Hypocrella*, *Regiocrella* và *Torrubiella*; họ Cordycipitaceae với chi *Cordyceps*; họ Ophiocordycipitaceae với hai chi *Ophiocordyceps* và *Elaphocordyceps*. Dữ liệu phân tử của 5 – 7 gen của 162 taxon từ công trình này, đặc biệt là nhóm ba gen *nrLSU*, *nrSSU* và *rpb1* cũng chính là dữ liệu phân tử lớn nhất về nấm ký sinh côn trùng cho đến thời điểm này mà chúng tôi ghi nhận được từ GenBank.

Chính vì vậy, trong nghiên cứu này, kế thừa phần lớn khối dữ liệu phân tử từ 162 trình tự trong công bố của Sung và cộng sự (2007) [12], các cây phát sinh chủng loài khác nhau được xây dựng từ các phương pháp neighbor joining (NJ), maximum parsimony (MP) và maximum likelihood (ML) dựa trên các gen *nrSSU* và *rpb1* cũng như kết hợp phân tích đa gen bao gồm *nrLSU*, *nrSSU* và *rpb1* được thực hiện nhằm tiếp tục mục đích hỗ trợ định danh các mẫu nấm ký sinh côn trùng DL0038A và DL0038B.

Một đặc điểm của các loài nấm thuộc chi nấm ký sinh côn trùng và chính đặc điểm này gây không ít khó khăn cho công tác phân loại cũng cần được nhắc đến ở đây, đó chính là đặc điểm lưỡng danh: tức là chúng có thể tồn tại ở thể hữu tính (teleomorph) và thể vô tính (anamorph). Đối với *Cordyceps takaomontana*, Kobayashi (1941) đã công bố thêm thể vô tính của loài nấm này có thể là *Isaria japonica* Yasuda. Rất lâu sau đó, Samson (1974) đã công bố

thêm rằng *Isaria japonica* cũng chính là *Paecilomyces tenuipes* hay còn gọi là *Isaria tenuipes* Peck. Tổng hợp dữ liệu cho đến nay, riêng đối với loài nấm này, chúng tôi ghi nhận các tên chính thức như sau: *Cordyceps takaomontana* (teleomorph), *Isaria tenuipes* (anamorph), *Isaria japonica* (anamorph) và *Paecilomyces tenuipes* (anamorph).

VẬT LIỆU - PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Mẫu hệ sợi nấm thuần được phân lập từ mẫu nấm ký sinh côn trùng *Cordyceps takaomontana* (ký hiệu DL0038A và DL0038B) do Khoa Sinh học, Trường Đại học Đà Lạt cung cấp.

Tách chiết DNA, phản ứng PCR khuếch đại các gen mục tiêu

Quy trình tách chiết DNA từ hệ sợi nấm được thực hiện bằng phương pháp Phenol/Chloroform, phỏng theo Chomczynski & Sacchi (1987) có biến đổi cho phù hợp với mục tiêu thu nhận DNA (thay đổi chỉ số pH của phenol từ 4 thành 8) [4]. Dùng que cấy vô trùng tiến hành thu nhận một phần hệ nấm sợi (khoảng 1,5 g) hòa tan trong ống eppendorf chứa sẵn 700 μ L dung dịch ly giải tế bào, ủ qua đêm ở nhiệt độ 65 °C. Mẫu sau khi ủ được tiến hành ly tâm thu nhận phần cặn, bổ sung 700 μ L dung dịch PCI (Phenol/Chloroform/Isoamylalcohol). Sau đó, mẫu được tiến hành ly tâm thu nhận phần nổi và tiến hành rửa bằng ethanol tuyệt đối. Sản phẩm DNA được xác định nồng độ bằng phương pháp đo mật độ quang ở bước sóng 260 nm và độ tinh sạch thông qua tỷ số OD₂₆₀/OD₂₈₀. Mẫu DNA sau khi tách chiết được lưu giữ trong dung dịch TE và bảo quản ở - 20 °C cho đến khi được sử dụng cho những thí nghiệm sau. Phản ứng PCR được thực hiện với hệ môi (Bảng 1).

Bảng 1. Trình tự các mồi sử dụng khuếch đại các gen mục tiêu

Gen mục tiêu	Tên mồi		Trình tự (5' – 3')	Sản phẩm	Tài liệu tham khảo
<i>nrSSU</i>	Mồi xuôi	NS1	GTAGTCATATGCTTGTCTC	1102 bp	[15]
	Mồi ngược	NS4	CTTCCGTCAATTCCTTTAAG		
<i>rpb1</i>	Mồi xuôi	CRPB1	CCWGGYTTYATCAAGAARGT	803 bp	[2]
	Mồi ngược	RPB1Gr	CCNGCDATNTCRTRTCCATRTA		

Phản ứng PCR được thực hiện trên máy Mxpro-Mx3005P (Stratagene) với chương trình nhiệt bao gồm 95 °C trong 5 phút (1 chu kỳ), 40 chu kỳ lặp lại với 95 °C - 30 giây, 55 °C - 30 giây, 72 °C - 2 phút và 72 °C - 5 phút (1 chu kỳ). Thể tích hỗn hợp phản ứng là 25 µl bao gồm: 1 × dung dịch đệm PCR, 0,5 µM mỗi mồi, 200 µM dNTP, 2,5 đơn vị enzyme *Taq* DNA polymerase (Fermentas), 3 mM MgCl₂. Sản phẩm PCR được tiến hành điện di trên gel agarose 1 % và được tiến hành giải trình tự tại công ty Nam Khoa. Mồi sử dụng cho phản ứng giải trình tự cũng chính là các mồi được sử dụng cho phản ứng PCR (Bảng 1), được cung cấp bởi IDT (Integrated DNA Technologies, Mỹ).

Hiệu chỉnh trình tự, xây dựng cây phát sinh loài

Các trình tự sản phẩm PCR được tiến hành hiệu chỉnh nhằm loại bỏ các tín hiệu không rõ ràng ở hai đầu, kiểm tra sự sai lệch giữa kết quả giải trình tự bằng mồi xuôi và mồi ngược, so sánh với cơ sở dữ liệu GenBank (NCBI). Các phần mềm sử dụng cho bước hiệu chỉnh bao gồm: Seaview phiên bản 4.2.12 [5], Chromas Lite phiên bản 2.1.1 [13], công cụ BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) [1]. Bộ mẫu được tiến hành đồng nhất trước khi được tiến hành dò tìm mô hình tiến hóa phù hợp nhất theo chuẩn Bayesian Information Criterion (BIC) bằng phần mềm MEGA 6.0 [14].

Cây phát sinh loài được xây dựng bằng phần mềm MEGA phiên bản 6.0 [14]. Các phương pháp được sử dụng để xây dựng cây phát sinh loài bao gồm: Neighbor joining (NJ), Maximum parsimony (MP) và Maximum likelihood (ML) với các thông số như sau: cây NJ được dựng với mô hình Tamura ba thông số (Tamura's three-parameter), phân phối chuẩn gamma, cây MP được dựng với thuật toán TBR (Tree bisection and reconnection branch swapping), cây ML được dựng với thuật toán NNI (Nearest Neighbor interchange) và mô hình tiến hóa phù hợp nhất từ kết quả dò tìm bằng phần mềm Mega 6.0; giá trị ủng hộ (bootstrap) lặp lại 1000 lần với mức đạt ý nghĩa khi giá trị ủng hộ lớn hơn 50.

KẾT QUẢ - THẢO LUẬN

Kết quả phân tách các sản phẩm PCR khuếch đại các gen mục tiêu trên gel agarose 1 % cho thấy xuất hiện các băng sáng rõ ứng với kích thước như mong đợi: 1102 và 803 nucleotide, tương ứng lần lượt với các gen *nrSSU* và *rpb1* (dữ liệu không trình bày). Từ đó, việc sử dụng các sản phẩm này để giải trình tự đã cho các kết quả giải tốt, hai mạch DNA được giải đều cho các đỉnh rõ ràng và có sự trùng khớp giữa hai mạch DNA khi một trong hai mạch được chuyển đổi bằng Seaview, chỉ trừ những đoạn lân cận đầu 3' của mồi bắt cặp với mạch khuôn (dữ liệu không trình bày). Độ dài trình tự từng gen sau hiệu chỉnh được trình bày trong Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả hiệu chỉnh và so sánh trình tự các gen thuộc hai mẫu nấm trên Genbank

Gen/mẫu		Kích thước sản phẩm PCR (bp)	Kích thước sản phẩm sau hiệu chỉnh (bp)	Loài tương tự cao nhất	Max Ident (%)
<i>nrLSU*</i>	38A	950	833	<i>Isaria tenuipes</i> (AB027380)	99
	38B		882	<i>Isaria tenuipes</i> (AB027380)	99
<i>nrSSU</i>	38A	1102	881	<i>Isaria tenuipes</i> (KC242706)	99
	38B		1017	<i>Isaria tenuipes</i> (KC242706)	100
<i>rpb1</i>	38A	803	689	<i>Isaria tenuipes</i> (HQ880899)	99
	38B		712	<i>Isaria tenuipes</i> (HQ880899)	99

Chú thích : *Trình tự gen *nrLSU* được tham khảo từ kết quả giải trước đây [6].

Các trình tự đã hiệu chỉnh được kiểm tra độ tương tự bằng công cụ BLAST tích hợp trên cơ sở dữ liệu GenBank. Chúng tôi trích sơ lược một số kết quả kiểm tra độ tương tự của các trình tự gen *nrLSU*, *nrSSU* và *rpb1* của hai mẫu nấm DL0038A và DL0038B bằng kết quả đồng nhất tối đa (Max ident) tìm được trên GenBank trong Bảng 2.

Trình tự các gen sau hiệu chỉnh của hai mẫu DL0038A và DL0038B cũng được so sánh với nhau và cho kết quả về mức độ giống nhau (identity) đạt 99 % cho cả ba gen (tính trên độ bao phủ - coverage giữa từng cặp trình tự); sự khác biệt 1 % trong trình tự ba gen giữa hai mẫu nấm như sau: 1 khoảng trống (gap) và 3 mismatch (*nrLSU*), 1 khoảng trống (*nrSSU*) và 2 mismatch (*rpb1*).

Khối dữ liệu này được đồng nhất hóa và cân nhắc kết quả cẩn thận bằng mắt cho thấy: chiều dài trung bình của các nhóm trình tự đạt 695, 851 và 477 bp, tương ứng lần lượt cho các gen *nrLSU*, *nrSSU* và *rpb1*. Cũng qua việc đồng nhất hóa này, dữ liệu trình tự tham chiếu tham khảo từ công trình của Sung và cộng sự (2007) [12] được chúng tôi lọc và loại bỏ các trình tự có độ dài không phù hợp (chứa các khoảng trống liên tục được chèn vào ngay giữa hoặc hai đầu trình tự), vì vậy số trình tự tham chiếu là 68, 56 và 80

trình tự (thuộc ba nhóm – clade A, B, C, họ *Clavicipitaceae*) tương ứng lần lượt cho các gen *nrLSU*, *nrSSU* và *rpb1*, cùng với *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld. & H. Schrenk (*Glomerellaceae*) và *Verticillium dahliae* Kleb. (*Plectosphaerellaceae*) được sử dụng làm nhóm ngoại [5]. Khối dữ liệu hoàn chỉnh và đồng bộ cho cả ba gen được tiến hành dò tìm mô hình tiến hóa tối thích ghi nhận các kết quả như sau: theo chuẩn thông tin BIC, mô hình tiến hóa phù hợp nhất cho khối dữ liệu gen *rpb1* là T92 (Tamura-3-parameter)+G+I (với các thông số được MEGA 6.0 thông báo cho mô hình T92+G+I như sau: parameters = 165, BIC (lowest score) = 23521,693, lnL = -10888,472, (+I) = 0,34, (+G) = 0,86, R = 2,69, f(A) = 0,226, f(T) = 0,226, f(G) = 0,274, f(C) = 0,274, r(AT) = 0,030, r(AC) = 0,037, r(AG) = 0,200, r(TA) = 0,030, r(TC) = 0,200, r(TG) = 0,037, r(CA) = 0,030, r(CT) = 0,165, r(CG) = 0,037, r(GA) = 0,165, r(GT) = 0,030, r(GC) = 0,037.

Cây phát sinh chủng loài ML được xuất ra từ mô hình cho kết quả như sau: xét về địa hình học (topology), cây ML này rất tương tự và tương thích với địa hình học của các cây neighbor joining (NJ), maximum parsimony (MP) và cây phát sinh loài tham

khảo từ công bố của Sung và cộng sự (2007) [12] (dữ liệu trình bày là cây ML của gen *rpb1*– Hình 3).

Điều này là phù hợp vì các trình tự trong công trình của Sung và cộng sự (2007) [12] được đưa vào làm tham chiếu để so sánh với các trình tự trong đề tài này. Trên cây ML này (Hình 3), 80 trình tự tham chiếu thuộc họ Clavicipitaceae, trong đó 27 trình tự đại diện cho nhóm A, 30 trình tự đại diện cho nhóm B và 20 trình tự đại diện cho nhóm C phân nhóm hoàn toàn hợp lý, so với công bố của Sung và cộng sự (2007) [12] và so với các trình tự nhóm ngoại (hai trình tự thuộc loài *Glomerella cingulata* và một trình tự thuộc loài *Verticillium dahliae*, là các loài nấm ký sinh trên thực vật).

Xét trong sự phân nhóm của nhóm C thuộc họ Clavicipitaceae, trước hết, hai trình tự DL0038A và DL0038B phân thành một nhóm với nhau được ủng hộ rất mạnh với các giá trị bootstrap lần lượt đạt 96/98/96. Đồng thời, hai trình tự *rpb1* của hai mẫu nấm DL0038A và B phân thành một nhóm với trình tự thuộc loài *Isaria tenuipes* (DQ522395) được ủng hộ rất mạnh với giá trị bootstrap đạt tuyệt đối 100 cho cả ba cây NJ/MP/ML (phần được đóng khung trên Hình 3), so với các tham chiếu còn lại thuộc nhóm này, bao gồm: các đại diện thuộc chi *Cordyceps* bao gồm: *C. bifusispora*, *C. militaris*, *C. scarabaeicola*, *C. tuberculata*, đại diện thuộc chi *Beauveria*: *B. caledonica*, các đại diện thuộc chi *Isaria* gồm *I. farinosa* và *I. cf. farinosa*, đại diện thuộc chi *Lecanicillium* bao gồm: *L. tenuipes*, *L. attenuatum*, *L. psalliotae*, *L. fusisporum* và *L. lecanii*, cùng với các đại diện thuộc chi *Simplicium*: *S. lamellicola*, *S. obclavatum*, *S. lanosoniveum* (Hình 3). *Isaria tenuipes* chính là thể vô tính (anamorph) của *Cordyceps takaomontana*, theo công bố của Kobayasi (1982) [9] và Sung và cộng sự (2007) [12]. Cũng rất lấy làm tiếc là cho đến thời điểm này, chúng tôi vẫn chưa tìm thấy trên cơ sở dữ liệu nào, kể cả trong công bố của Sung và cộng sự (2007) một trình tự *rpb1* nào của *Cordyceps takaomontana*. Vì vậy, tham chiếu ở thể vô tính *Isaria tenuipes* cũng chính là tham chiếu duy nhất làm đại diện được thêm vào bộ dữ liệu tham

chiếu của Sung và cộng sự (2007), và đây cũng là trình tự tham chiếu thuộc cùng nhóm nghiên cứu [11]. Từ các kết quả bước đầu này cho thấy phân tích phát sinh chủng loài phân tử trên gen *rpb1* ủng hộ quan điểm định danh dựa trên hình thái: hai mẫu DL0038A, DL0038B và *Isaria tenuipes* (DQ522395) có quan hệ rất gần hoặc chính là các mẫu nấm thuộc cùng loài với thể hữu tính *Cordyceps takaomontana*, có thể vô tính là *Isaria tenuipes*.

Các kết quả phân tích phát sinh chủng loại phân tử đơn gen khác sử dụng gen *nrSSU* đều cho kết quả tương tự như đối với gen *rpb1*, nghĩa là ủng hộ quan điểm định danh dựa trên hình thái: hai mẫu DL0038A và DL0038B là các mẫu nấm thuộc cùng loài *Cordyceps takaomontana* (dữ liệu không trình bày). Đặc biệt, đối với hai gen này, dữ liệu tham chiếu của Sung và cộng sự (2007) có đại diện thuộc *Cordyceps takaomontana* (AB044631/*nrSSU* và AB044637/*nrLSU*) [5]. Đây cũng chính là các tham chiếu phân thành đơn nhóm với các trình tự *nrLSU* và *nrSSU* của hai mẫu DL0038A và DL0038B (dữ liệu không trình bày).

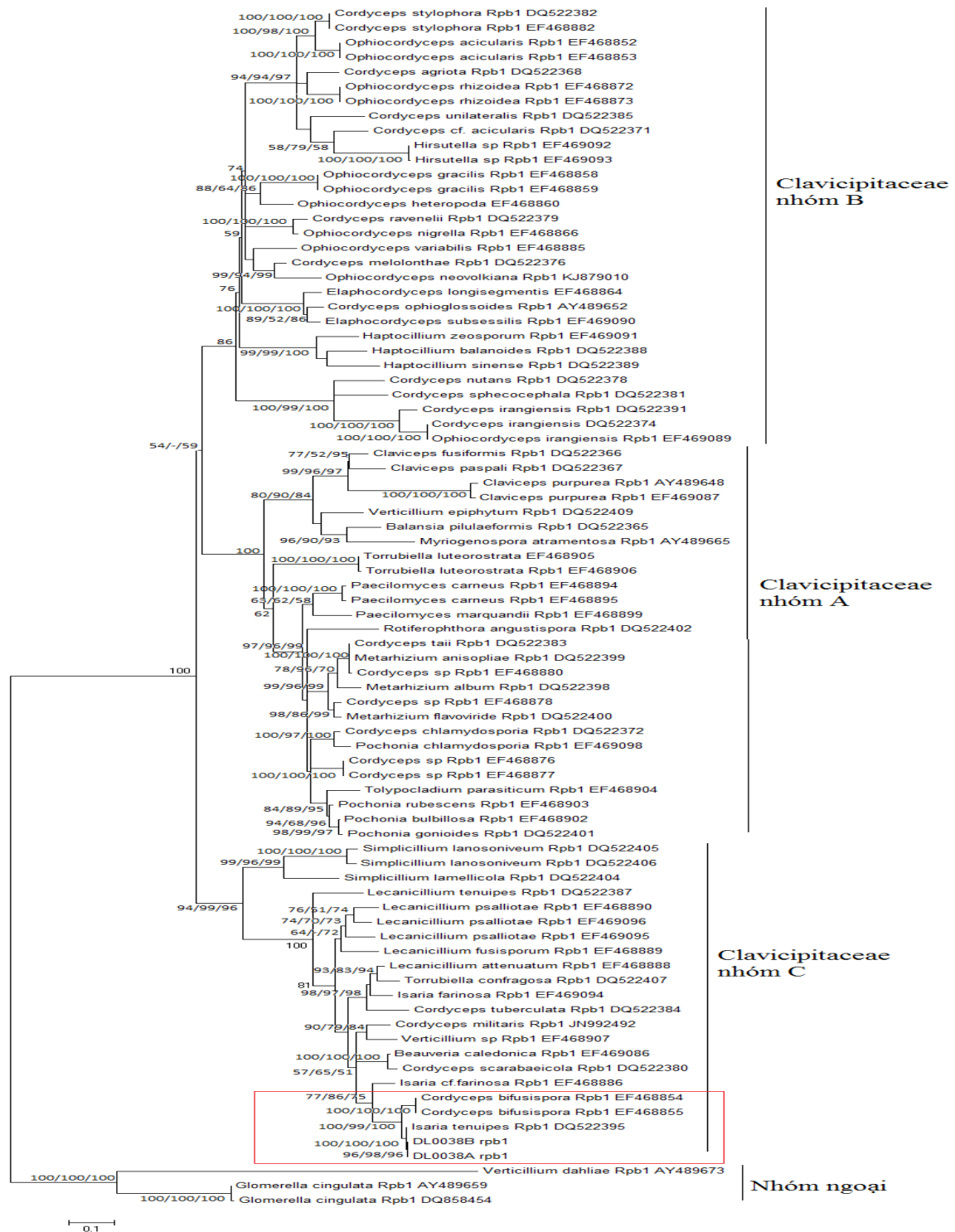
Để thực hiện phân tích đa gen, từ bộ dữ liệu tham chiếu của Sung và cộng sự (2007) [12] cho từng gen *nrLSU*, *nrSSU* và *rpb1* thuộc cùng một mẫu nấm, trước hết chúng tôi tạo bộ dữ liệu trình tự tham chiếu của ba gen kết hợp lại và cũng thực hiện sự đồng nhất hóa bộ mẫu trước khi dò tìm mô hình tiến hóa tối thích. Độ dài trình tự sau đồng nhất hóa khoảng 1892 nucleotide. Bộ dữ liệu gồm 45 trình tự này được dò tìm mô hình tiến hóa tối thích bằng MEGA 6.0. Kết quả cho thấy mô hình T92+G+I là mô hình tối ưu nhất, với các thông số được MEGA 6.0 thông báo cho mô hình này như sau: parameters = 91, BIC (lowest score) = 29682,149, lnL = -14324,556, (+I) = 0,39, (+G) = 0,34, R = 2,49, f(A) = 0,239, f(T) = 0,239, f(G) = 0,260, f(C) = 0,260, r(AT) = 0,030, r(AC) = 0,040, r(AG) = 0,190, r(TA) = 0,030, r(TC) = 0,190, r(TG) = 0,040, r(CA) = 0,030, r(CT) = 0,170, r(CG) = 0,040, r(GA) = 0,170, r(GT) = 0,030, r(GC) = 0,040.

Cây phát sinh chủng loài ML được xuất ra từ mô hình này cho kết quả như sau: địa hình học của cây phát sinh chủng loài ML ba gen cũng rất tương tự với các cây NJ và MP cũng như tương thích so với các cây đơn gen, và so với công bố của Sung và cộng sự (2007) [12]: các tham chiếu phân thành ba nhóm A, B, C cùng với nhóm ngoại (Hình 4).

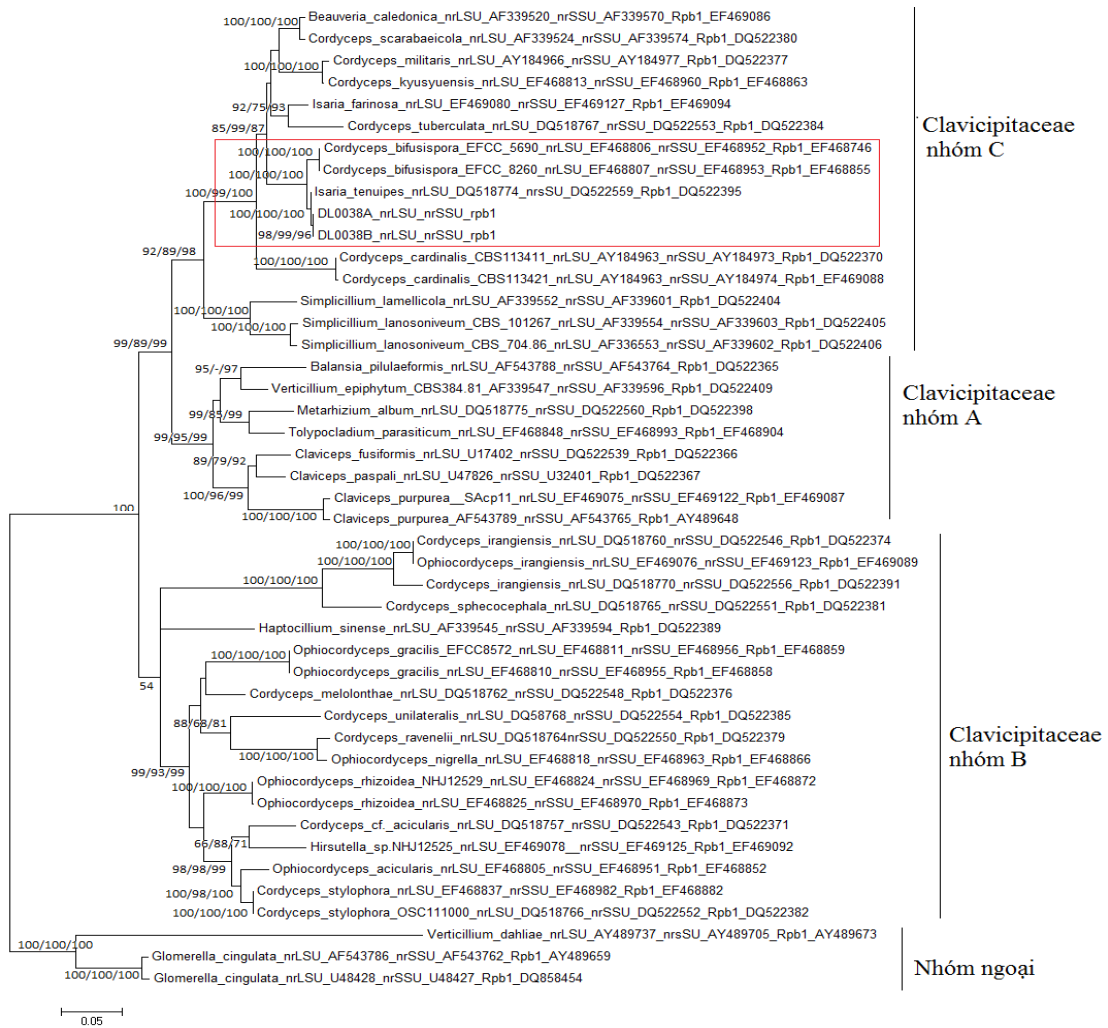
Xét trong sự phân nhóm của nhóm C thuộc họ Clavicipitaceae, trước hết hai trình tự được ghép từ ba gen của hai mẫu nấm DL0038A và DL0038B phân thành một nhóm với nhau được ủng hộ rất mạnh với các giá trị bootstrap lần lượt đạt 99/98/96 tương ứng với các cây NJ/MP/ML (phần được đóng khung trên Hình 4). Đồng thời, hai trình tự được ghép từ ba gen của hai mẫu nấm DL0038A và B phân thành một nhóm với trình tự thuộc loài *Isaria tenuipes* (DQ518774, DQ522559 và DQ522395 tương ứng lần

lượt với các gen *nrLSU*, *nrSSU* và *rpb1* thuộc mẫu nấm được ký hiệu OSC111007, theo Sparafra và cộng sự (2007) [13] được ủng hộ rất mạnh với giá trị bootstrap đạt tuyệt đối 100 cho cả ba cây NJ/MP/ML (phần được đóng khung trên Hình 4), so với các tham chiếu còn lại thuộc nhóm này. Như vậy, qua sự phân tích phát sinh chủng loài kết hợp ba gen, kết quả lại một lần nữa cho thấy các mẫu nấm DL0038A, DL0038B và *Isaria tenuipes* có quan hệ rất gần hoặc chính là cùng một loài.

Cùng với kết quả định danh dựa trên hình thái, sự hỗ trợ từ phân tích phát sinh chủng loài ở đây, lại một lần nữa ủng hộ quan điểm hai mẫu ký hiệu DL0038A và DL0038B được định danh là các đại diện thuộc loài *Cordyceps takaomontana* (với thể vô tính là *Isaria tenuipes*) được sưu tập tại vùng núi Langbian, Lâm Đồng, Việt Nam.



Hình 3. Mối quan hệ phát sinh chủng loài bằng cây ML sử dụng gen *rpb1* của 82 taxa thuộc Clavicipitaceae. Các con số được trình bày trên các nhánh là những giá trị bootstrap, ba giá trị được sắp xếp từ trái sang phải tương ứng với ba giá trị bootstrap lần lượt của các cây NJ, MP và ML. Chỉ những giá trị bootstrap > 50 được trình bày



Hình 4. Mối quan hệ phát sinh chủng loài bằng cây ML sử dụng kết hợp ba gen *nLSU*, *nrSSU*, *rpb1* của 45 taxa thuộc Clavicipitaceae. Các con số được trình bày trên các nhánh là những giá trị bootstrap, ba giá trị được sắp xếp từ trái sang phải tương ứng với ba giá trị bootstrap lần lượt của các cây NJ, MP và ML. Chỉ những giá trị bootstrap > 50 được trình bày.

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã áp dụng thành công công cụ phân tích phát sinh chủng loài đơn gen hay phân tích đa gen bao gồm *nrSSU*, *nLSU* và *rpb1* nhằm hỗ trợ định danh các mẫu nấm ký sinh côn trùng DL0038A và DL008B, thu nhận từ vùng núi Langbian, Lâm Đồng. Các kết quả phân tích phát sinh chủng loài phân tử này đã củng cố thêm kết luận về định danh các mẫu nấm là *Cordyceps takaomontana* với thể vô tính là *Isaria tenuipes*. Đây cũng là tiền đề hữu ích

cho nhóm chúng tôi tiếp tục hoàn thiện công tác định danh các mẫu nấm này cũng như phát triển tiếp đối với các mẫu nấm ký sinh côn trùng khác trong bộ sưu tập.

Lời cảm ơn: Đề tài này được thực hiện nhờ kinh phí của Sở Khoa học và Công nghệ TP. Hồ Chí Minh, Chương trình Vườn ươm 2014 – 2015, chủ nhiệm ThS. Lao Đức Thuận.

Molecular phylogenetic analysis to support the identification of samples DL0038A & DL0038B belonging to *Cordyceps* genus

- **Vu Tien Luyen**
University of Science, VNU-HCM
- **Dinh Minh Hiep**
Agricultural Hightech Park
- **Truong Binh Nguyen**
University of Da Lat
- **Lao Duc Thuan**
- **Trinh Van Hanh**
- **Le Huyen Ai Thuy**
Ho Chi Minh City Open University

ABSTRACT

In our previous publication, we have tentatively concluded that our fungal specimen DL0038A and DL0038B are *Cordyceps takaomontana*. In order to further support the identification, we continued to analyse the nrSSU (nuclear ribosomal small subunit) and rpb1 (largest subunit of RNA polymerase II) genes, as well as combined analysis the nrLSU (largest subunit of RNA polymerase II) together with nrSSU and rpb2 genes on these specimens in order to

Keywords: *Cordyceps takaomontana*, molecular phylogenetics, nrLSU, nrSSU, rpb1.

support the morphological identification of those fungi. The results show that we successfully amplified all genes. Sequencing method was then adopted and proofread before molecular phylogenetic analysis was applied with reference sequences obtained from the publication of Sung et al. (2007). Once again, this analysis strongly supports the DL0038A and DL0038B specimen as *Cordyceps takaomontana*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. S.F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, D.J. Lipman, Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 215, 403-10 (1990).
- [2]. L.A. Castlebury, A.Y. Rossman, G.H. Sung, A.S. Hyten, J.W. Spatafora, Multigene phylogeny reveals new lineage for *Stachybotrys chartarum*, the indoor air fungus. *Mycol. Res*, 108, 864-872 (2004).
- [3]. W.H. Chan, K.H. Ling, S.W. Chiu, P.C. Shaw, P. But, Molecular analyses of *Cordyceps gunnii* in China, *J. Food & Drug Anal.* 19, 18-25 (2011).
- [4]. P. Chomczynski, N. Sacchi, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162: 156-159 (1987).
- [5]. M. Gouy, S. Guindon, O. Gascuel, SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol Biol Evol*, 27, 221-224 (2010).
- [6]. Đ.M. Hiệp, L.Đ. Thuận, V.T. Luyện, T.V. Hạnh, L.H.A. Thúy, T.B. Nguyễn, Phát hiện loài nấm ký sinh côn trùng *Cordyceps takaomontana* tại núi Langbian, Lâm Đồng, Việt Nam. *Tạp chí Khoa học Công nghệ*, (đang chờ in).
- [7]. Đ.M. Hiệp, T.B. Nguyễn, Nghiên cứu nhóm nấm *Cordyceps* ở Tây Nguyên và khảo sát tiềm năng

- ứng dụng của chúng trong y dược. Kỷ yếu Hội thảo Quốc tế Hợp tác Khoa học Công nghệ & Phát triển bền vững Nông nghiệp Lâm Đồng – Tây Nguyên, 39 – 40 (2014).
- [8]. D. Johnson, G.H. Sung, N.L. Hywel-Jones, J.J. Luangsa-Ard, J.F. Bischoff, R. Kepler, J.W. Spatafora, Systematics and evolution of the genus *Torrubiella* (Hypocreales, Ascomycota), *Mycological Research*, 113, 279-289 (2009).
- [9]. Y. Kobayasi, Keys to the taxa of the genera *Cordyceps*, *Torrubiella*. *Transactions of the Mycological Society of Japan*, 23, 329 – 354 (1982).
- [10]. Z.Y. Liu, Y.J. Yao, Z.Q. Liang, A.Y. Liu, D.N. Pegler, M.W. Molecular evidence for the anamorph-teleomorph connection in *Cordyceps sinensis*. *Mycol. Res*, 105, 7, 827-32 (2001).
- [11]. J.W. Spatafora, G.H. Sung, J.M. Sung, N.L. Hywel-Jones, J.F.Jr. White, Phylogenetic evidence for an animal pathogen origin of ergot and the grass endophytes. *Mol Ecol*, 16, 1701-11 (2007).
- [12]. G.H. Sung, N.L. Hywel-Jones, J.M. Sung, J.J. Luangsa-Ard, B. Shrestha, J.W. Spatafora, Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the *Clavicipitaceous* fungi. *Stud Mycol*, 57, 5 – 59 (2007).
- [13]. Technelysium South Brisbane, Chromas Pro version 1.7.4 QLD, Australia 2003-2012.
- [14]. K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski and S. Kumar, MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725-2729 (2013).
- [15]. R. Vilgalys, B.L. Sun, Ancient and recent patterns of geographic speciation in the oyster mushroom *Pleurotus* revealed by phylogenetic analysis of ribosomal DNA sequences. *PNAS*, 91, 4599 – 4603 (1994).