

XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP LUẬN NGHIÊN CỨU HỖ TRỢ ĐỊNH DANH NẤM KÝ SINH CÔN TRÙNG BẰNG PHÂN TÍCH PHẢ HỆ PHÂN TỬ VÙNG ITS1-5.8S-ITS2

Ngày nhận bài: 15/10/2014

Ngày nhận lại: 17/11/2014

Ngày duyệt đăng: 15/12/2014

Lê Huyền Ái Thúy¹

Đinh Minh Hiệp²

Trương Bình Nguyên³

Lao Đức Thuận, Trương Kim Phượng⁴

Đỗ Ngọc Nam⁵

TÓM TẮT

Nấm ký sinh côn trùng mà đặc biệt là Đông trùng hạ thảo (*Cordyceps sinensis*) là chi nấm được nhiều quốc gia, đặc biệt ở Châu Á bao gồm Việt Nam sử dụng như một vị thuốc quý trong các bài thuốc y học cổ truyền. Tuy nhiên, hiểu biết về thành phần loài của chi nấm này còn rất hạn chế bởi nhiều nguyên nhân trong đó đặc biệt phải kể đến là các khó khăn gặp phải trong công tác phân loại, định danh. Gần đây, với việc sử dụng các phương pháp dựa trên Sinh học Phân tử kết hợp với Tin-Sinh học, công việc định danh nấm phần nào được hỗ trợ tốt. Nghiên cứu bước đầu này của chúng tôi trước hết nhằm xây dựng phương pháp luận nghiên cứu, sử dụng đoạn trình tự Internal transcribed spacer – ITS làm đích, với mục tiêu hỗ trợ định danh một số mẫu nấm ký sinh côn trùng thu thập từ vùng núi Langbian, Đà Lạt, Lâm đồng. Một quy trình thí nghiệm bao hàm tất cả các bước từ tách chiết DNA hệ sợi nấm, PCR, giải trình tự, hiệu chỉnh trình tự sau giải, các bước phân tích dữ liệu phân tử từ so sánh với dữ liệu Genbank hay xây dựng các cây phả hệ phân tử đều đã được thiết lập. Quy trình từ đó đã được giám định trên một tập hợp mẫu, trong đó kết quả hỗ trợ định danh bằng phương pháp vừa mới xây dựng đã cho thấy rất trùng khớp với những mẫu đã được định danh đến mức loài rõ ràng trước đó dựa trên hình thái. Phương pháp luận nghiên cứu vừa được xây dựng này vì vậy sẽ được áp dụng để hỗ trợ định danh cho bộ mẫu nấm ký sinh côn trùng thu thập từ vùng núi Langbian, Đà Lạt, Lâm đồng, Việt Nam.

Từ khóa: *Cordyceps*, CTAB, Hiệu chỉnh trình tự, ITS1-5.8S-ITS2, Phả hệ phân tử.

ABSTRACT

Insect-parasitic fungi, especially *Cordyceps sinensis*, parasitize larvae of insects, are used as traditional medicinal drugs in various Asian countries, including Vietnam. However, knowledge of taxonomy of these fungi is still limited, due to many factors such as the difficulties in the classification and identification. Recently, the identification of these fungi was improved by molecular and bioinformatic methods. In this preliminary study, first we want to establish the protocol including DNA extraction, PCR, sequencing then proof-reading and phylogenetic tree construction. The target sequence used for this protocol is Internal transcribed spacer – ITS. The protocol is carried out using the sample set, in which the already identified results by morphology and molecular biology combined bioinformatics were in high concordance. Therefore, this protocol will be applied in order to identify insect-parasitic fungi specimens collected from Langbian mountain, Dalat, Lamdong, Vietnam.

Keywords: *Cordyceps*, CTAB, ITS1-5.8S-ITS2, phylogenetic tree, proof-reading.

¹ PGS.TS, Trường Đại học Mở TP.HCM. Email: thuy.lha@ou.edu.vn

² TS, Ban Nông nghiệp Công nghệ cao TP.HCM.

³ TS, Trường Đại học Đà Lạt.

⁴ ThS, Trường Đại học Mở TP.HCM.

⁵ Trường Đại học Mở TP.HCM.

1. Mở đầu

Nấm kí sinh trên côn trùng có rất nhiều ứng dụng. Tiêu biểu có: *Cordyceps sinensis* (Đồng trùng hạ thảo), là loài nấm được coi như có chứa nhiều hoạt chất quan trọng dùng trong y dược nhất. Các nghiên cứu cho thấy sinh khối của loài nấm này có đến hơn 20 tác dụng chữa bệnh khác nhau đối với con người : (1) Điều chỉnh đáp ứng miễn dịch (Kuo và cs, 1996), (2) ức chế sự phát triển của tế bào khối u (Bok và cs, 1999), (3) gia tăng chức năng gan (Manabe và cs, 1996), (4) thúc đẩy việc tiết ra các hormone tuyến thượng thận (Wang và cs 2000), (5) giảm huyết áp và sự căng cơ (Chou và cs, 1994), (6) điều hòa đường máu (Kuo và cs, 1996)...vvv. Các nghiên cứu về nhóm nấm *Cordyceps* trong thời gian gần đây cho thấy không chỉ riêng *C. sinensis* mới có các tính chất như vậy. Ngày càng có nhiều loài *Cordyceps spp.* Được phát hiện có khả năng ứng dụng trong y dược hơn. Một ứng dụng tiêu biểu nữa của các loài nấm khác thuộc nhóm *Cordyceps* là sử dụng như các tác nhân đối kháng sinh học cũng đã được ứng dụng nhiều trong thực tế.

Ở Việt Nam, hiểu biết về thành phần loài của *Cordyceps* vẫn còn nhiều hạn chế. Với một chi nấm cho nhiều ứng dụng rộng rãi trong thực tế và y học, việc sưu tập, phân lập các giống thuần, khai thác thông tin khoa học định danh các loài nấm này là một việc cần thiết, trong đó, định danh nấm, đặc biệt là nấm sợi từ lâu đã là một công việc đầy khó khăn (Waddington, 2009). Vì vậy, mặc dù các nhà nấm học đã mất nhiều năm nghiên cứu, tuy nhiên những công bố về thành phần loài chi nấm này vẫn chưa thực sự hợp lý và còn nhiều mâu thuẫn, đặc biệt khi xem xét những biến đổi di truyền ảnh hưởng bởi những vùng địa lý khác nhau hay mối liên hệ giữa thể vô tính

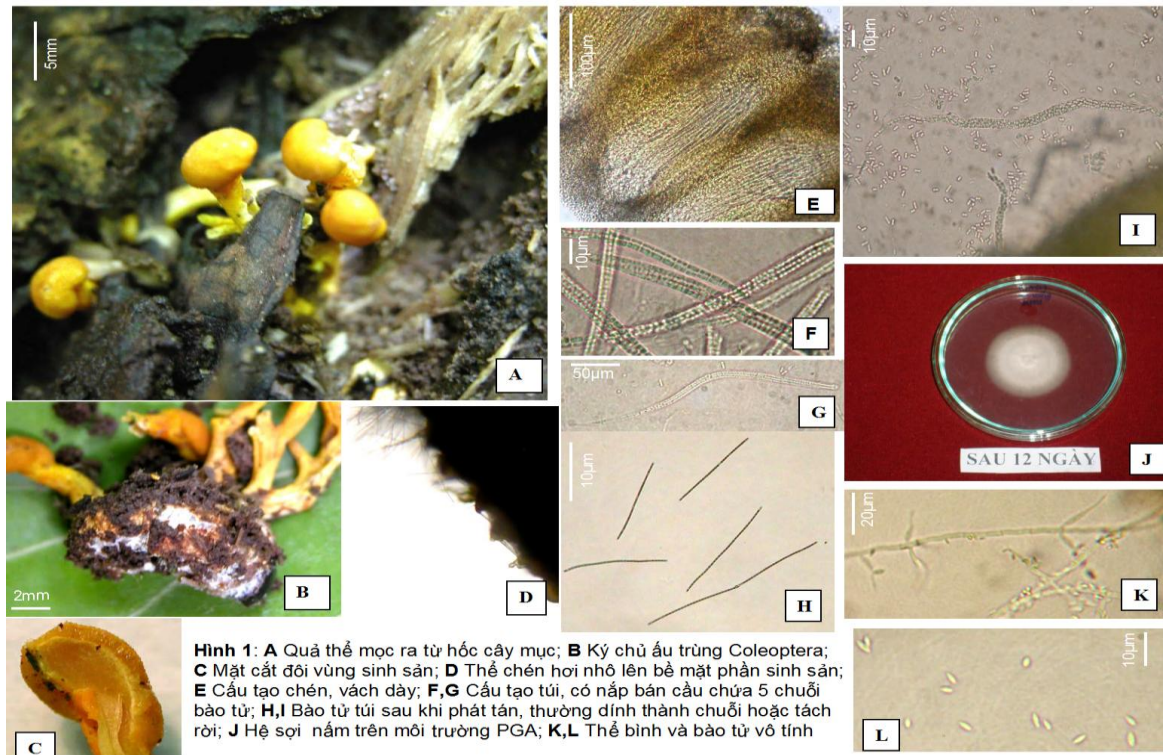
(anamorph) và thể hữu tính (teleomorph) của chúng. Trong những năm gần đây, các nghi ngờ trên đã được giải quyết hiệu quả nhờ sự đóng góp tích cực của sinh học phân tử. Với hướng tiếp cận này, trình tự ITS (internal transcribed spacer - vùng trình tự biến động cao, nằm đệm hai bên vùng mã hoá cho 5.8S rRNA) đã được sử dụng phổ biến trong những năm gần đây. Việc xác định trình tự vùng này được đề cập bởi White và cs vào năm 1990 và đã được nhiều nhà khoa học tiến hành trên đối tượng *Cordyceps* từ những năm 2000 như Park và cs, 2001, Liu và cs, 2001, Chen và cs, 2004, Stensrud và cs, 2005, Kuo và cs, 2005,... vvv, thu được nhiều kết quả khả quan.

Nghiên cứu bước đầu này vì vậy được tiến hành, kế thừa một cách có chọn lọc dữ liệu vùng ITS của các mẫu nấm ký sinh côn trùng từ Genbank, chúng tôi trước hết sử dụng đoạn trình tự ITS làm đích, mong muốn xây dựng một phương pháp luận nghiên cứu nhằm mục tiêu ứng dụng trong hỗ trợ định danh một số mẫu nấm ký sinh côn trùng thu thập từ vùng núi Langbian, Đà Lạt, Lâm đồng, Việt Nam sau này.

2. Vật liệu phương pháp

Vật liệu

27 mẫu hệ sợi nấm (được ký hiệu bằng DL00XX) được phân lập và làm thuần từ các mẫu nấm ký sinh côn trùng thu thập từ những chuyến đi thực địa tại vùng núi Langbian khu vực tỉnh Lâm Đồng do Viện Nghiên cứu khoa học Tây Nguyên cung cấp. Đặc biệt trong đó các mẫu DL0003, 6 và 7 là các mẫu phân lập từ hệ sợi của *Ophiocordyceps nevolkiana* (Lê Thùy Liên và cs. 2010) (Hình 1) và mẫu DL0002 là hệ sợi nấm *Cordyceps sinensis* do Tiến sĩ Yamanaka Katsuji (Viện nấm học, Kyoto, Nhật Bản) cung cấp.

Hình 1. Các mẫu phân lập từ hệ sợi của *Ophiocordyceps nevolkiana*

Nguồn: Lê Thùy Liên và cs, 2010

Tách chiết DNA

DNA từ hệ sợi nấm được ly trích bằng các phương pháp: sử dụng phenol/chloroform, phỏng theo Chomczynski & Sacchi (1987): một que gạt hệ sợi được cho vào eppendorf đã có chứa 100µl dung dịch TE 1X, thêm vào 900 µl Trizol, pH8. DNA sau đó được tủa bằng Isopropanol với chất trợ tủa GlycoBlue. DNA được giữ trong dung dịch TE 1X (Tris-EDTA) và bảo quản ở -20°C cho đến khi sử dụng. Một số biện pháp thay đổi trong tách chiết khác cũng được áp dụng, điển hình là bổ sung CTAB (Cetyl Trimethylammonium Bromide) vào dịch chứa hệ sợi trước khi tách chiết.

Phản ứng PCR

Phản ứng PCR được thực hiện trên máy Mxpro-Mx3005P (Stratagene) với chương trình nhiệt bao gồm 95°C- 5' (1 chu kỳ), 40 chu kỳ lặp lại với 94°C- 30", 50°C- 30", 72°C- 30" và 72°C- 5' (1 chu kỳ). Thể tích hỗn hợp phản ứng là 50 µl bao gồm: 1× dung dịch đệm PCR, 100 nmol/L mỗi, 400 µmol/L mỗi loại dATP, dGTP, dCTP và dTTP, 1.5 units hot-start Taq DNA polymerase, 3 mmol/L MgCl₂.

Trình tự của hai môi sử dụng trong phản ứng PCR (và cũng là phản ứng giải trình tự) tham khảo từ công trình của White và cs (1990) như sau: một trong hai môi xuôi ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG), hoặc ITS5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) và ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC).

Sản phẩm PCR sẽ được phân tích trên gel agarose và sau đó gửi đến công ty Macrogen (Hàn quốc) để tinh sạch và giải trình tự.

Hiệu chỉnh trình tự

Được thực hiện bằng cách sử dụng các phần mềm Sea View phiên bản 4.2.12 (Gouy Manolo, 2011), Chromas Pro phiên bản 1.7.4 (Technelysium, 2003-2012), công cụ BLAST (Basic Local Alignment search tool) (Altschul và cs, 1990) nhằm loại bỏ những tín hiệu không chính xác ở hai đầu trình tự khảo sát, kiểm tra các sai lệch giữa hai kết quả giải trình tự từ môi xuôi và môi ngược, so sánh với cơ sở dữ liệu GenBank.

Dò tìm mô hình tiến hóa và xây dựng cây phát sinh loài

Xác định mô hình tiến hoá phù hợp nhất theo chuẩn Akaike Information Criterion (AIC) bằng phần mềm jModelTest phiên bản 0.1.1 (Posada, 2008). Cây phát sinh loài được xây dựng bằng các phần mềm PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2002) và MrBayes 3.2 (Ronquist và Huelsenbeck, 2003) trong đó các thông số cơ bản được cài đặt theo mẫu chuẩn. Mẫu được chạy 1.500.000 lần với 1 chuỗi lạnh và 3 chuỗi nóng, cây được lưu sau mỗi 100 lần chạy. Cây phát sinh loài sau đó được hiển thị bằng phần mềm TreeView để phân tích kết quả.

3. Kết quả – biên luận

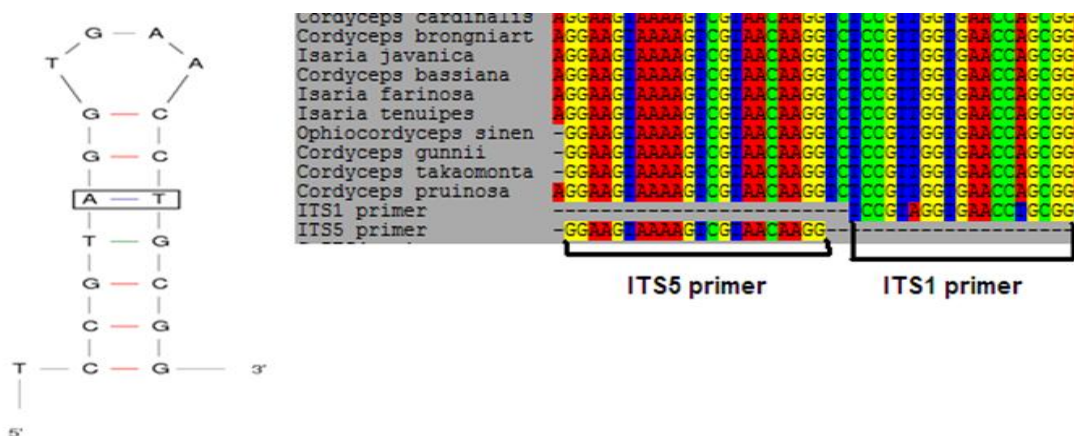
3.1. Kết quả xây dựng phương pháp luận dựa trên các kỹ thuật Sinh học phân tử và Tin-Sinh học trong hỗ trợ định danh nấm ký sinh côn trùng

- Yếu tố chất lượng DNA sau tách**

chiết: Chúng tôi đã thử nghiệm nhiều quy trình tách chiết DNA khác nhau, như sử dụng phenol/chloroform, bổ sung thêm proteinase K, bổ sung thêm SDS và bổ sung dung dịch CTAB. Quy trình tách chiết DNA được lựa chọn sau cùng là quy trình bổ sung dung dịch CTAB bởi chất lượng DNA thu được là tốt nhất (thông qua các chỉ số đo mật quang tại các bước sóng 230, 260 và 280 nm), DNA này đảm bảo khuếch đại PCR thành công.

- ***Yếu tố môi:*** thử nghiệm PCR đầu tiên được tiến hành với cặp ITS1/ITS4; tuy nhiên kết quả đã xuất hiện một vài trường hợp khuếch đại không thành công. Qua kiểm tra trình tự môi, chúng tôi nhận thấy đối với một số đại diện thuộc chi nấm ký sinh côn trùng, trình tự môi ITS1 có hai sai lệch và khả năng hình thành cấu trúc bậc hai khá bền vững (Hình 2) để có thể gây cản trở cho việc khuếch đại. Môi ITS5 vì thế được dùng thay cho ITS1.

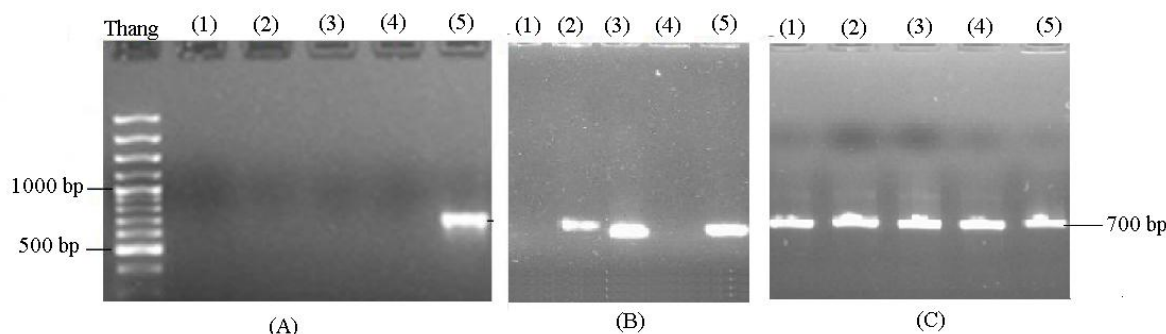
Hình 2. Vị trí hai môi xuôi ITS5 và ITS1 khi so sánh với các trình tự *Cordyceps* trên GenBank



Tổng hợp cả hai yếu tố “chất lượng DNA” và “môi”, quá trình khuếch đại PCR từ hệ sợi nấm ký sinh côn trùng đã thành công. Hình 3 minh họa kết quả tách điện di sản phẩm PCR từ 5 mẫu hệ sợi nấm cho thấy sử dụng các mẫu DNA tách bằng phenol/chloroform xuất hiện một số trường hợp âm tính (Hình 3A). Kiểm tra tỷ lệ OD260/230 cho thấy rất thấp (ví dụ mẫu số 1, tỷ lệ này đạt 0.1 so với tiêu chuẩn: lớn hơn 0.5). Việc bổ sung CTAB với mục tiêu loại bỏ các tạp chất thuộc nhóm

polysaccharide, acid hữu cơ,... đã chứng tỏ được hiệu quả của nó thông qua tỷ lệ OD260/230 ở các mẫu đã tăng lên đáng kể (từ 3-10 lần, ví dụ mẫu số 1, tỷ lệ này đạt 1.0) bên cạnh tỷ lệ OD260/280 nằm trong khoảng 1.7-2. Các mẫu DNA này đã cho phép PCR khuếch đại thành công 3/5 mẫu (với việc sử dụng cặp mồi ITS1/ITS4) (Hình 3B) và khuếch đại thành công hoàn toàn 5/5 mẫu (với việc sử dụng cặp mồi ITS5/ITS4) (Hình 3C).

Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm PCR với cặp mồi (A) ITS1/ITS4; (B) ITS5/ITS4, trong đó DNA được tách chiết theo phương pháp Phenol/Chloroform; và (C) cặp mồi ITS5/ITS4, trong đó DNA được tách chiết theo phương pháp CTAB



3.2. Kết quả phân tích thành phần nucleotide vùng ITS1-5.8S-ITS2

Kết quả này được trình bày trong Bảng 1 cho thấy: tổng chiều dài ba vùng dao động khá lớn, từ 486 – 660 nucleotide và dao động về tỷ lệ G+C từ 40.30% - 61.95%, trong đó vùng ITS1 có tỷ lệ G+C dao động cao giữa các loài nằm khảo sát từ 38.74% (DL0043) - 60.64% (DL0003) và chiều dài từ 182 (DL0008) đến 333 nucleotide (DL0043); Vùng ITS2 có tỷ lệ G+C dao động từ 41.90% (DL0043) – 63.13%

(DL0006), chiều dài dao động từ 282 (DL0002) – 372 nucleotide (DL0030). So sánh chung giữa hai vùng ITS1 và ITS2 cho thấy hai vùng này có chiều dài tương đương nhưng tỷ lệ G+C vùng ITS2 hầu như luôn cao hơn vùng ITS1 khoảng 1-5%. Vùng 5.8S rất ít biến động chiều dài toàn bộ các mẫu khảo sát là 157 nucleotide, tỷ lệ G+C dao động cũng rất ít trong khoảng 46.5% – 49%. Như vậy qua kết quả phân tích có thể nhận thấy vùng ITS1 và ITS2 là những vùng rất biến động, sự sai khác giữa các loài là rất lớn.

Bảng 1. Sự biến động về chiều dài và thành phần G+C của vùng ITS1 và ITS2

Mẫu	ITS1		ITS2		TỔNG	
	%GC	Chiều Dài	%GC	Chiều Dài	%GC	Chiều Dài
DL0001	51.96	204	57.79	289	55.38	493
DL0002	54.15	205	58.36	281	56.58	486
DL0003	60.64	249	62.87	342	61.93	591
DL0006	60.32	247	63.13	339	61.95	586
DL0007	60.16	246	62.68	343	61.63	589
DL0008	47.25	182	56.91	304	53.29	486
DL0024	59.84	249	62.37	295	61.21	544
DL0025	57.79	244	60.47	296	59.26	540
DL0027	54.39	239	57.96	314	56.42	553
DL0028	59.66	233	57.93	328	58.65	561
DL0029	55.13	234	57.45	329	56.48	563
DL0030	48.08	260	47.58	372	47.78	632
DL0031	50.64	235	54.35	333	52.82	568

Mẫu	ITS1		ITS2		TỔNG	
	%GC	Chiều Dài	%GC	Chiều Dài	%GC	Chiều Dài
DL0040	57.03	263	57.74	310	57.42	573
DL0041	59.64	262	61.04	308	60.35	570
DL0042	59.07	259	60.77	311	60	570
DL0043	38.74	333	41.90	327	40.30	660
DL0044	52.89	242	56.92	318	55.18	560
DL0045	50.23	217	57.82	339	54.86	556
DL0046	44.66	309	42.86	336	43.72	645
DL0047	54.62	238	57.88	311	56.47	549
DL0048	59.55	267	60.19	314	59.90	581
DL0049	51.74	259	54.88	328	53.49	587
DL0077	47.27	220	55.88	340	52.50	560
DL0081	48.95	237	54.4	318	52.07	555
DL0082	49.21	252	55.89	331	53.00	583
DL0088	45.62	217	53.05	328	50.09	545
DL0090	55.19	241	57.64	314	56.58	555

3.3. Kết quả so sánh với cơ sở dữ liệu Genbank

Trình tự vùng ITS1-5.8S-ITS2 sau khi hiệu chỉnh có độ dài trong khoảng 486 – 660 bp được dùng làm “input” nhằm tìm kiếm trình tự tương đồng trong cơ sở dữ liệu Genbank. Ghi nhận đầu tiên là kết quả so sánh cho thấy toàn bộ 28 mẫu “input” đều có độ tương đồng cao, cao nhất với các trình tự thuộc *Cordyceps* và các thể anamorph của *Cordyceps* từ các chi liên quan bao gồm *Paecilomyces*, *Isaria*, *Simplicillium*, *Beauveria* và *Metarhizium* với độ bao phủ (query coverage) và độ tương đồng cao nhất (Max ident) đạt lần lượt 99-100% (Bảng 2). Một vài mẫu có các nucleotide sai lệch so với trình tự trên cơ sở dữ liệu, tuy nhiên khi kiểm tra lại biểu đồ huỳnh quang tại các vị trí này, các tín hiệu tại đây rất rõ nên việc đọc sai base không thể xảy ra (Dữ liệu không trình bày), do đó kết quả hiệu chỉnh vẫn được giữ nguyên như cũ (Bảng 2).

Kết quả so sánh này đồng thời cho thấy các mẫu nấm thu thập không bị lẫn tạp, có độ tin cậy cao cũng như quá trình phân lập làm

thuần hệ sợi đã được thực hiện tốt. Kết quả BLAST này cũng giúp chúng tôi suy luận thông tin để chọn lựa các loài tham chiếu cũng như phân tích các cây phả hệ phân tử sau này.

3.4. Kết quả dò tìm mô hình tiến hóa

Bộ dữ liệu có 77 trình tự bao gồm 28 trình tự trực tiếp từ đề tài này và 49 trình tự tham khảo trên GenBank dài 667 nucleotide được chuyển vào phần mềm jModelTest để xác mô hình tiến hóa tối ưu. Tất cả các trình tự chúng tôi tham khảo từ Genbank làm tham chiếu đều có nguồn gốc rõ ràng: bài báo công bố, với mã số truy cập trình tự trên Genbank và nhất là tên loài của mẫu được cung cấp rất đầy đủ kèm tên “Ngân hàng giống”, ví dụ: CBS: Centraal bureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands, ARSEF: Agricultural Research Service Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures, U.S, ATCC: American Type Culture Collection Center... vvv (Bảng 3). Kết quả dò tìm cho bộ dữ liệu trên cho thấy mô hình tiến hóa phù hợp nhất là TIM2ef+G, với các thông số như sau: partition = 010232, -lnL = 5889.6148,

K = 228, R(a) [AC] = 1.6233, R(b) [AG] = 3.1434, R(c) [AT] = 1.6233, R(d) [CG] = 1.0000, R(e) [CT] = 5.1094, R(f) [GT] = 1.0000, gamma shape = 0.5270.

Khối dữ liệu này được đưa vào phần mềm PAUP* 4.0b10 [16] và MrBayes 3.2 để xây dựng cây phát sinh loài.

3.5. Kết quả xây dựng cây phát sinh loài

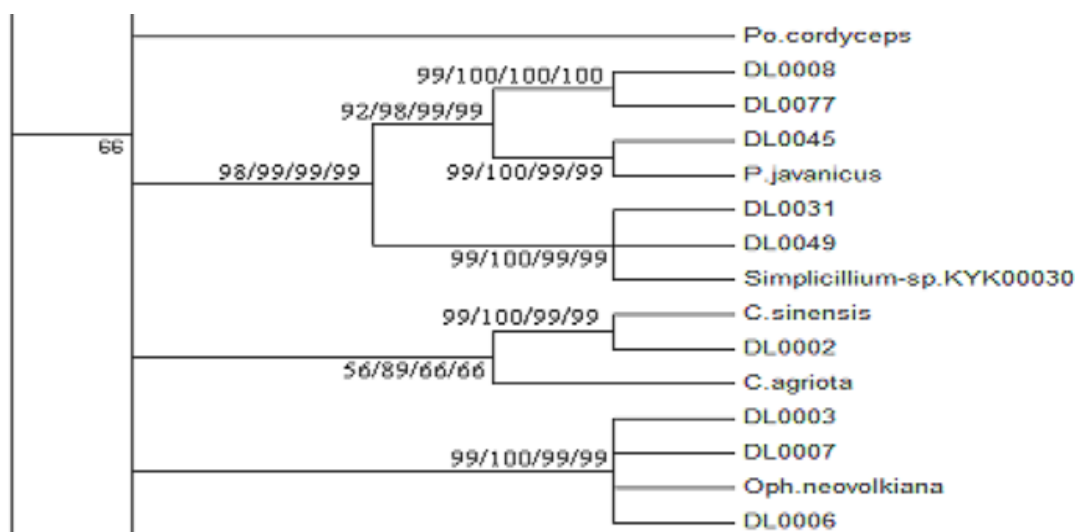
Địa hình học (topology) của các cây phát sinh loài được xây dựng bằng bốn phương pháp Neighbor Joining (NJ), Maximum Parsimony (MP), Maximum Likelihood (ML) và MrBayer đều rất tương tự nhau và tương thích với cây mà nhóm Kuo và cs (2005) đã thực hiện. Điều này là phù hợp vì các trình tự chúng tôi sử dụng làm tham chiếu trong phương pháp dựng cây đa số đều trùng với công trình của Kuo và cs (2005). Các giá trị bootstrap trên tất cả các cây phả hệ đều có ý nghĩa (lớn hơn 50).

Mẫu DL0002 là hệ sợi nấm *Cordyceps sinensis* mà chúng tôi nhận được từ sự giúp đỡ của Tiến sĩ Yamanaka Katsuji (Viện Nấm học, Kyoto, Nhật bản). Trình tự ITS của DL0002 quả thực là luôn phân nhóm với đại diện tham chiếu *Cordyceps sinensis* thuộc ngân hàng CCRC với mã số CCRC 36421 (Kuo và cs,

2005) với bootstrap đạt 99 % (cây MP; MB; ML) và 100% trên cây phả hệ NJ. Đồng thời, kết quả so sánh với Genbank cho kết quả tương đồng cao nhất với *Cordyceps sinensis* (AF291749). Vậy một lần nữa, phương pháp luận nghiên cứu được xây dựng ở đây hoàn toàn ủng hộ kết quả định danh trình tự ITS của DL0002 chính là của *Cordyceps sinensis*.

Ba trình tự DL0003, DL0006 và DL0007 là các mẫu phân lập khác nhau của mẫu nấm đã được chúng tôi công bố thành phần loài *Ophiocordyceps nevolkiana* (Lê Thùy Liên và cs, 2010). Sự phân nhóm với trình tự tham chiếu duy nhất mà chúng tôi có được từ Genbank (HM856642) trên cả bốn cây phả hệ với bootstrap đạt 99-100% so với 49 trình tự tham chiếu với rất nhiều đại diện khác của chi *Cordyceps* cũng như các chi khác lân cận. Đồng thời, kết quả so sánh với Genbank cho kết quả tương đồng cao nhất với *Ophiocordyceps nevolkiana* (HM856642). Hay nói cách khác, phương pháp luận nghiên cứu được xây dựng ở đây lại thêm một lần nữa được chứng minh tính đúng đắn qua quan điểm hoàn toàn ủng hộ kết quả định danh trình tự ITS của các mẫu DL0003, DL0005 và DL0007 chính là các biến thể khác nhau của loài *Ophiocordyceps nevolkiana*.

Hình 4. Một phần cây phả hệ phân tử được xây dựng bằng phương pháp Maximum Parsimony, trong đó xuất hiện các đơn nhóm của các mẫu DL0002 với *Cordyceps sinensis*, DL0003-DL0006 và DL0007 với *Ophiocordyceps nevolkiana*. Các con số hiển thị trên cây là giá trị bootstrap của 1000 lần lặp lại, lần lượt của các cây MP/NJ/ML/MrBayer)



Bảng 2. Kết quả so sánh trình tự ITS đã hiệu chỉnh với các trình tự trên GenBank

Mẫu	Loài tương đồng nhất trên Genbank	Mã số truy cập	Chiều dài (bp)	Độ bao phủ (Query coverage)	Độ tương đồng cao nhất (Max ident)	E-value	Số mismatch	Tái kiểm tra (*)
DL0001	<i>Cordyceps bassiana</i>	EU086423	493	100%	100%	0.0	0	Chấp nhận
DL0002	<i>Cordyceps sinensis</i>	AF291749	486	96%	100%	0.0	0	Chấp nhận
DL0003	<i>Ophiocordyceps neovolkiana</i>	HM856642	591	99%	100%	0.0	0	Chấp nhận
DL0006	<i>Ophiocordyceps neovolkiana</i>	HM856642	586	100%	100%	0.0	0	Chấp nhận
DL0007	<i>Ophiocordyceps neovolkiana</i>	HM856642	589	99%	100%	0.0	0	Chấp nhận
DL0008	<i>Paecilomyces javanicus</i>	AB099944	486	100%	97%	0.0	0	Chấp nhận
DL0024	<i>Isaria tenuipes</i>	EF411223	544	100%	100%	0.0	0	Chấp nhận
DL0025	<i>Cordyceps ninchukispora</i>	FJ765278	540	99%	100%	0.0	0	Chấp nhận
DL0027	<i>Isaria javanica</i>	JN204422	553	100%	100%	0.0	0	Chấp nhận
DL0028	<i>Isaria farinosa</i>	HQ608087	561	99%	96%	0.0	0	Chấp nhận
DL0029	<i>Isaria javanica</i>	EF990131	563	97%	100%	0.0	0	Chấp nhận
DL0030	<i>Cordyceps</i> sp	GU207309	632	94%	99%	0.0	0	Chấp nhận
DL0031	<i>Simplicillium</i> sp.	AB378534	568	100%	99%	0.0	0	Chấp nhận
DL0041	<i>Cordyceps takaomontana</i>	EU807995	570	100%	99%	0.0	0	Chấp nhận
DL0042	<i>Cordyceps takaomontana</i>	EU807995	570	100%	99%		0	Chấp nhận
DL0043	<i>Cordyceps</i> sp	AY728273	660	100%	99%	0.0	0	Chấp nhận
DL0045	<i>Paecilomyces javanicus</i>	AB099944	556	100%	99%	0.0	0	Chấp nhận
DL0046	<i>Cordyceps</i> sp	JQ868750	645	100%	100%	0.0	0	Chấp nhận

Bảng 3. Thông tin 49 trình tự tham chiếu dùng để xây dựng dữ liệu vùng trình tự ITS1-5.8S-ITS2

STT	TÊN KHOA HỌC	NGUỒN GỐC	MÃ SỐ TRUY CẬP TRÊN GENBANK
1	<i>Cordyceps agriota</i>	ARSEF 5692	AY245626
2	<i>Cordycesp bifusispora</i>	ARSEF 5690	AY245627
3	<i>Cordyceps brongniartii</i>	ATCC 66779	AY245628
4	<i>Cordyceps dipterigena</i>	CCRC 35725	AY245629
5	<i>Cordyceps heteropoda</i>	IFO 33060	AY245630
6	<i>Cordyceps japonica</i>	IFO 9647	AY245645
7	<i>Cordyceps memorabilis</i>	CCRC 32218	AY245632
8	<i>Cordyceps militaris*</i>	CBS 178.59	AY245634
9	<i>Cordyceps militaris</i>	CCRC 32219	AY245633
10	<i>Cordyceps myrmecophila</i>	CCRC 35726	AY245635
11	<i>Cordyceps ochraceostromata</i>	ARSEF 5691	AY245646
12	<i>Cordyceps ophioglossoides</i>	CCRC 32220	AY245636
13	<i>Cordyceps scarabaeicola</i>	ARSEF 5689	AY245639
14	<i>Cordyceps sinensis</i>	CCRC 36421	AY245638
15	<i>Cordyceps sphingum</i>	CBS 114.22	AY245641
16	<i>Phytocordyceps ninchukispora</i>	CCRC 31900	AY245642
17	<i>Podostroma cordyceps</i>	IFO 9019	AY245647
18	<i>Cordyceps roseostromata</i>	AR 4870	AY245637
19	<i>Metarhizium anisopliae</i>	KACC 40029	AF293842
20	<i>Isaria fumosorosea</i>	GZU-BCECWQ16	GU194181
21	<i>Isaria javanica</i>	RCEF4687	JN204422
22	<i>Isaria tenuipes</i>	SCSGAF0058	JN851008
23	<i>Isaria japonica</i>	BCC 2821	EU828662
24	<i>Isaria takamizusanensis</i>	F1724	GU980039
25	<i>Isaria xylariiiformis</i>	GZUIFR-4606	FJ479746
26	<i>Beauveria amorphia</i>	BCC 1665	EF411228
27	<i>Beauveria asiatica</i>	FJAT-9623	JQ320364
28	<i>Beauveria caledonica</i>	ARSEF 4302	HQ880821
29	<i>Beauveria cf. caledonica</i>	ARSEF 2251	AY532003
30	<i>Beauveria sp.</i>	IMI 228343	DQ376247
31	<i>Beauveria sp.</i>	SY07A	JN817641
32	<i>Beauveria sungii</i>	ARSEF 7279	HQ880813

STT	TÊN KHOA HỌC	NGUỒN GỐC	MÃ SỐ TRUY CẬP TRÊN GENBANK
33	<i>Beauveria felina</i>	MTCC_6294	JQ266212
34	<i>Beauveria varroae</i>	ARSEF 2694	HQ880802
35	<i>Beauveria vermiconia</i>	ARSEF 2922	HQ880822
36	<i>Beauveria sp.</i> SJL0910	SJL0910	HM135176
37	<i>Metarhizium robertsii</i>	A103	KC355183
38	<i>Ophiocordyceps neovolkiana</i>	DL0004	HQ215593
39	<i>Paecilomyces javanicus</i>	Yokoyama, E. và Hara, A	AB099944
40	<i>Isaria farinose</i>	TR053	HQ608087
41	<i>Beauveria sp.</i>	RCEF3903	HQ270152
42	<i>Beauveria sp.</i>	NHJ-11927	EF411231
43	<i>Beauveria sp.</i>	MTCC_4502	JQ266178
44	<i>Gibellula sp.</i>	BCC14505	GQ250021
45	<i>Metarhizium sp.</i>	KACC 40230	AF293843
46	<i>Cordyceps bassiana</i>	IMI391043	EU086423
47	<i>Cordyceps ninchukispora</i>	BCC1422	FJ765278
48	<i>Simplicillium sp.</i>	KYK00030	AB378534
49	<i>Cordyceps takaomontana</i>	BCC 1409	EU807995

4. Kết luận

Chúng tôi đã thành công trong việc xây dựng phương pháp luận nghiên cứu, từ việc chọn quy trình tách chiết DNA phù hợp từ hệ sợi nấm ký sinh côn trùng, chọn môi phù hợp cho khuếch đại vùng gen ITS1-5,8S-ITS2, giải trình tự gen, hiệu chỉnh trình tự để xuất ra những trình tự chính xác nhất (về mặt thực nghiệm đã thu được). Phân tích trình tự vùng ITS cho thấy tính biến động của vùng trình tự ITS phù hợp mục tiêu xây dựng cây phát sinh loài hiệu quả trong hỗ trợ định danh. Việc

chọn các trình tự tham chiếu đáng tin cậy từ cơ sở dữ liệu Genbank, dò tìm được mô hình tiến hóa tối thích và xây dựng các cây phả hệ phân tử từ bộ dữ liệu phân tử đã được kiểm tra chặt chẽ đã cho phép đưa ra các kết luận về loài của những mẫu đã được định danh (về loài) trước đó là hoàn toàn trùng khớp.

Phương pháp luận nghiên cứu vừa được xây dựng tốt này sẽ được áp dụng để hỗ trợ định danh cho bộ mẫu nấm ký sinh côn trùng thu thập từ vùng núi Langbian, Đà Lạt, Lâm đồng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Altschul, S.F., et al (1990). Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215403–410.
- Bok J. W., Lerner L., Chilton J., Klingeman H.G., Towers G. H (1999). Antitumor sterols from the mycelia of *Cordyceps sinensis*. Phytochemistry 51(7):891-8.
- Chen Y.Q., Wang N., Qu L.H., Li T.H., Zhang W. M (2004), Determination of the anamorph of *Cordyceps sinensis* inferred from the analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacers and 5.8S rDNA. Biochem. Syst. Ecol. 29, 597–607.
- Chou, ZG (1994). *Cordyceps sinensis* effect on activity of NK and LAK cells in leucocythemia patients. Shanghai J. Immunol. 14-30.

- Chomczynski P, Sacchi N (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162(1): 156-9.
- Gouy, M. Guindon, S. & Gascuel, O. (2010). SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution* 27(2):221-224.
- Kuo H. C., Su Y. L., Yang H. L., Chen T. Y (2005). Identification of Chinese Medicinal Fungus *Cordyceps sinensis* by PCR-Single-Stranded Conformation Polymorphism and Phylogenetic Relationship. *J. Agric. Food Chem.*
- Kuo Y. C., Tsai W. J., Shiao M. S., Chen C. F., Lin C. Y (1996). *Cordyceps sinensis* as an immunomodulatory agent. *Am J Chin Med.*;24(2):111-25.
- Liên L. T., Hoàng P. N. K., Lý D. T. T, Thúy L. H. A, Hiệp D. M., Nguyễn T. B (2010). Phát hiện loài nấm ký sinh côn trùng *Cordyceps neovolkiana* tại núi Langbian – Đà Lạt, Việt nam. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 8(3A): 1007-1013, 2010.
- Liu ZY, Liang ZQ, Whalley AJS, Liu AY, Yao YJ (2001). A new species of *Beauveria*, the anamorph of *Cordyceps sobolifera*. *Fungal Diversity* 7: 61-69.
- Manabe N., Sugimoto M., Azuma Y., Taketomo N., Yamashita A., Tsuboi H., Tsunoo A., Kinjo N., Nian-Lai H., Miyamoto H (1996). Effects of the mycelial extract of cultured *Cordyceps sinensis* on in vivo hepatic energy metabolism in the mouse. *Jpn J Pharmacol.*; 70(1):85-8.
- Park J. E., Kim G. Y., Park H. S., Nam B. H., An W. G., Cha J. H., Lee T. H., Lee J. D (2001). Phylogenetic analysis of caterpillar fungi by comparing ITS1 -5.8S -ITS2 ribosomal DNA sequences. *Mycobiology* 29(3): 121-131.
- Posada D (2008). jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol.* 2008 Jul;25(7):1253-6.
- Ronquist F. and Huelsenbeck J.P (2003). MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- Stensrud N. L., Hywel J., Trond S (2005). Towards a phylogenetic classification of *Cordyceps*: ITS nrDNA sequence data confirm divergent lineages and paraphyly. *Mycological Research* Vol 109: 41-56.
- Swofford DL (2002). PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), version 4.0b10 (Alvitec). Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.
- Technelysium South Brisbane, QLD, Australia (2003-2012): Chromas Pro phiên bản 1.7.4
- Waddington M., 2009. Identification of Fungi Using Ribosomal Internal Transcribed Spacer (ITS) DNA Sequences. *Pharmaceutical Technology*.
- Wang S. Y., Shiao M. S (2000). Pharmacological Functions of Chinese Medicinal Fungus *Cordyceps sinensis* and Related Species. *Journal of Food and Drug Analysis*, Vol. 8, No. 4: 248-257.
- White T. J., Bruns T., Lee, S., Taylor J (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Trong Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J., (Eds) *PCR protocols, a guide to methods and applications*. Academic Press: San Diego, pp 315-322.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được thực hiện bởi sự hỗ trợ kinh phí từ Sở Khoa học & Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh.