

ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI VÀ SINH HỌC PHÂN TỬ CÁC CHỦNG NẤM *ISARIA* TẠI VƯỜN QUỐC GIA XUÂN SƠN VÀ KHU BẢO TỒN THIÊN NHIÊN COPIA

Nguyễn Đình Việt¹, Nguyễn Thị Thùy Vân^{1,2}, Trương Xuân Lam³ và Dương Minh Lam^{1*}

¹*Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội*

²*Viện Khoa học Cảnh sát, Học viện Cảnh sát Nhân dân*

³*Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*

Tóm tắt. *Isaria* là chi nấm kí sinh côn trùng quan trọng chiếm số lượng loài lớn trong họ nấm Cordycipitaceae, có vùng phân bố rộng trên toàn cầu, với 72 loài được công nhận và có nhiều ứng dụng trong y dược, nông nghiệp. Cho đến thời điểm này, Việt Nam đã ghi nhận 11 loài *Isaria*. Trong quá trình nghiên cứu tại khu bảo tồn thiên nhiên Copia - Sơn La, Vườn quốc gia Xuân Sơn - Phú Thọ 51 mẫu nấm côn trùng đã được thu thập, trong đó có 05 mẫu được định loại là các loài thuộc chi *Isaria*. Các kí chủ được định loại là ấu trùng bộ Lepidoptera và Coleoptera. Kết quả nghiên cứu đặc điểm hình thái và phân tích trình tự ADN của một số đoạn gen cho thấy các mẫu nấm nghiên cứu là các loài *Isaria cicadae*, *I. fumosorosea*, *I. tenuipes* và *I. amoene-rosea*. Mẫu *Isaria* sp. XS97 cần có những nghiên cứu về sinh học phân tử và đặc điểm sinh học khác cần được tiến hành để định danh đến loài.

Keywords: *Isaria*, insect fungi, Copia, SơnLa, Xuân Sơn, Phú Thọ.

1. Mở đầu

Isaria là chi nấm kí sinh côn trùng quan trọng chiếm số lượng loài lớn trong họ nấm Cordycipitaceae, có vùng phân bố rộng trên toàn cầu. Trong lịch sử nghiên cứu nấm học, 284 loài đã được miêu tả với tên *Isaria* [1]. Tuy nhiên, sự phát triển của hóa phân loại, sinh học phân tử và công nghệ thông tin đã cho phép sàng lọc và phân biệt rõ các loài với nhau hơn. Hiện nay, 72 loài *Isaria* đã được chấp nhận [2]. Các loài *Isaria* thường được định loại dựa trên các đặc điểm hình thái đặc trưng như: bó sợi (synnemata) phân nhánh, thể bình (phialide) hình bình thu hẹp đột ngột tạo thành một cổ khác biệt, bào tử đính (conidia) đơn tế bào, không màu (hyaline), nhẵn, subglobose (gần giống hình cầu) đến subcylindrical (gần giống hình trụ) dạng chuỗi. Tuy nhiên, việc định loại chỉ dựa vào hình thái đã gây ra nhiều tranh cãi về các loài trong chi *Isaria* và *Paecilomyces*. Các nghiên cứu của Luangsa-Ard, (2004, 2005), Gams (2005) dựa trên dữ liệu sinh học phân tử cho thấy hầu hết các loài *Paecilomyces* sect., *Isarioidea* kí sinh trên côn trùng (*Paecilomyces amoeneroseus*, *P. cateniannulatus*, *P. cateniobliquus*, *P. cicadae*, *P. coleopterorus*, *P. farinosus*, *P. fumosoroseus*, *P. ghanensis*, *P. javanicus*, *P. tenuipes*) là các loài thuộc chi *Isaria* họ *Clavicipitaceae* (Hypocreales) [2-4]. Các nghiên cứu cũng chỉ ra rằng định loại dựa vào các đặc điểm hình thái, đặc biệt là hình dạng của thể bình và bào tử đính để xác định loài thuộc *Isaria* là chưa đủ để thuyết phục. Sung *et al.* (2007) dựa trên phân tích trình tự 5 - 7 vùng gen mục tiêu là: *nrSSU*, *nrLSU*, *tef1*, *rpb1*, *rpb2*, β -*tubulin* (*tub*) và *atp6* đã chứng minh tính đa hình của

Ngày nhận bài: 20/2/2021. Ngày sửa bài: 13/3/2021. Ngày nhận đăng: 20/3/2021.

Tác giả liên hệ: Dương Minh Lam. Địa chỉ e-mail: duong.minhnam@gmail.com

Clavicipitaceae và *Cordyceps*. Nghiên cứu này đã thành lập 3 họ Clavicipitaceae, Cordycipitaceae, và Ophiocordycipitaceae. Trong đó chi nấm *Isaria* được xếp vào họ Cordycipitaceae, bộ Hypocreales, lớp Sordariomycetes, ngành Ascomycota [5] Tại Việt Nam, dựa trên các đặc điểm hình thái, Lê Tấn Hưng và cs. đã công bố *Isaria javanica*, *I. tenuipes* và *Isaria* sp. tại khu vực vườn Quốc gia Cát Tiên [6] Phạm Quang Thu và cs. (2011) đã công bố *Isaria tenuipes* và *Isaria farinose*, tại Vườn Quốc gia Pù Mát, Nghệ An; Năm 2013, Trương Xuân Sinh, Nguyễn Thị Thúy đã công bố thêm 4 loài *Isaria amoene-rosea* Henn., *I. carneus*, *I. javanica*, *I. xylariiformis* [7, 8]. Dựa trên đặc điểm hình thái và sinh học phân tử các mẫu nấm thu được tại Langbian được xác định thuộc ba loài *Isaria tenuipes*, *I. javanicus* và *I. amoenerosea* [9] Các kết quả nghiên cứu trên thế giới và Việt Nam về chi *Isaria* cho thấy tiềm năng phát triển, nghiên cứu khai thác ứng dụng của các loài nấm thuộc chi *Isaria* ở nước ta là rất lớn.

Trong đợt khảo sát năm 2018 tại Vườn quốc gia Xuân Sơn - Phú Thọ, Khu bảo tồn thiên nhiên Cópia - Thuận Châu, Sơn La, chúng tôi đã phát hiện 51 mẫu nấm kí sinh côn trùng có trạng thái vô tính và đã nghiên cứu đặc điểm hình thái đồng thời xác định được 5 mẫu của 05 loài thuộc chi nấm *Isaria*. Các kết quả nghiên cứu đặc điểm hình thái kết hợp với sinh học phân tử trong định loại *Isaria* được trình bày trong bài báo này.

2. Nội dung nghiên cứu

2.1. Vật liệu và phương pháp

* *Vật liệu nghiên cứu*

Các mẫu nấm *Isaria* được thu tại khu bảo tồn thiên nhiên Cópia, Sơn La và Vườn Quốc gia Xuân Sơn - Phú Thọ.

* *Phương pháp nghiên cứu*

- *Thu mẫu, bảo quản*

Mẫu được thu thập một cách ngẫu nhiên tại Cópia, Sơn La và Vườn Quốc gia Xuân Sơn - Phú Thọ, có tọa độ vị trí thu mẫu, được loại bỏ đất và lá cây, đựng trong túi giấy vô trùng, đảm bảo giữ ẩm cho mẫu và chuyển về phòng thí nghiệm. Mẫu nấm được bảo quản ở 4 °C trong trong 1 tuần để nghiên cứu đặc điểm hình thái và phân lập. Sau đó, mẫu được làm khô trong điều kiện 4 °C, và được sấy khô trong điều kiện nhiệt độ 45 °C và bảo quản lâu dài tại bộ môn Công nghệ sinh học - Vi sinh, trường Đại học sư phạm Hà Nội.

- *Phân lập và bảo quản chủng nấm*

Bào tử được hòa tan trong 100µl nước vô trùng, sau đó chuyển qua môi trường PDA (khoai tây 200 g, Dextrose 20 g, Agar 17 g, Nước cất 1000 ml) và Môi trường SDAY (Dextrose 40 g, peptone 10 g, chiết xuất nấm men (yeast extract) 10 g, agar 17 g, có bổ sung 100 mg/L Chloramphenicol). Các bào tử này chồi được quan sát và tách dưới kính hiển vi soi nổi sau 24 - 48 giờ phân lập [10]. Các ống nghiệm chứa giống nấm đã thuần sau 4 - 5 ngày nuôi cấy sẽ được bảo quản ở 4 °C và được cấy truyền định kỳ 2 - 4 tháng 1 lần.

- *Phân tích đặc điểm hình thái, định loại mẫu [11]*

Đặc điểm hình thái được ghi nhận gồm định loại và trạng thái của kí chủ, màu sắc, hình dạng, kích thước phần bó sợi. Đặc điểm của chủng nấm được xác định bằng cách quan sát trực tiếp nấm trên tiêu bản dưới kính hiển vi quang học. Các đặc điểm ghi nhận gồm kích thước, hình dạng và màu sắc của cuống bào tử đỉnh (conidiophore), thể bình, bào tử đỉnh.

- *Phương pháp sinh học phân tử*

Tách DNA: 300 mg sinh khối từ quá trình nuôi cấy dịch lỏng của nấm được cho ống eppendorf 1,5 ml vô trùng chứa 500 μ l 2X CTAB và được nghiền nhỏ bằng siêu âm trong 30 giây. Hỗn hợp dịch sau nghiền được ủ ở 65 °C trong thời gian 60 phút. Sau đó 500 μ l Chloroform: isoamyl alcohol (24:1) được bổ sung, trộn đều, li tâm 13.000 vòng/p và dịch nổi được thu lại và chuyển sang ống eppendorf mới. Bước này được lặp lại 2 lần. Sau đó 2/3 thể tích Isopropanol (lạnh) được bổ sung, trộn đều và để trong điều kiện (-20 °C) trong 24 giờ. Kết tủa ADN được thu lại bằng cách ly tâm 13000 vòng/p trong thời gian 20 phút ở 4 °C và được rửa bằng 1 ml cồn 70 %. ADN được để khô tự nhiên và sau đó được hòa tan trong 50 μ l H₂O khử ion vô trùng và được bảo quản ở -20 °C cho các nghiên cứu tiếp theo [12].

Phản ứng PCR: Cặp mồi ITS4 - ITS5 được sử dụng để khuếch đại đoạn trình tự ITS [13]; cặp mồi LROR- L7 để khuếch đại đoạn *nrLSU* [14-16], cặp mồi Crpb1A- RPB1Cr được sử dụng cho đoạn *Rpb1* [17]. Thành phần các chất cho một phản ứng PCR (50 μ l) bao gồm: PCR master mix 25 μ l, mỗi loại mồi 1,5 μ l (10 pM), H₂O 19 μ l và ADN 3 μ l. Quá trình PCR diễn ra với biến tính khởi đầu ở 94 °C trong 3 phút, sau đó là 35 chu kỳ gồm: (1) biến tính ở 94 °C trong 40 giây; (2) bắt cặp mồi ở 48 °C trong 40 giây; (3) kéo dài đoạn ở 72 °C trong 1 phút 20 giây; Thời gian kéo dài cuối cùng là 8 phút ở 72 °C. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1% chứa 1.5 μ l red - safe, tại 80V trong 60 phút và hiển thị trên đèn cực tím.

Phân tích trình tự ADN và xây dựng cây phát sinh phân loại:

Giải trình tự ADN được thực hiện bởi công ti First Base sử dụng mồi xuôi và mồi ngược trong phản ứng PCR. Sau đó, các trình tự xuôi, ngược được đóng hàng và cho ra trình tự thống nhất bằng cách sử dụng phần mềm BioEdit [18]. Các trình tự ADN liên quan trong phân tích được lấy từ ngân hàng gen NCBI thông qua công cụ tìm kiếm Blast và được đóng hàng với trình tự nghiên cứu sử dụng phần mềm ClustalX1.83 [19]. Tất cả các trình tự nghiên cứu và trình tự ADN cần thiết được đóng hàng và được sử dụng để phân tích mối quan hệ phân loại, quan hệ phát sinh chủng loại. Kết quả phân tích trình tự gen được thể hiện qua cây tiến hóa được hiển thị bằng phần mềm Mega X [20].

2.2. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

2.2.1. Mô tả mẫu đặc điểm hình thái các mẫu

* *Isaria cicadae*

Kí hiệu mẫu CPA60

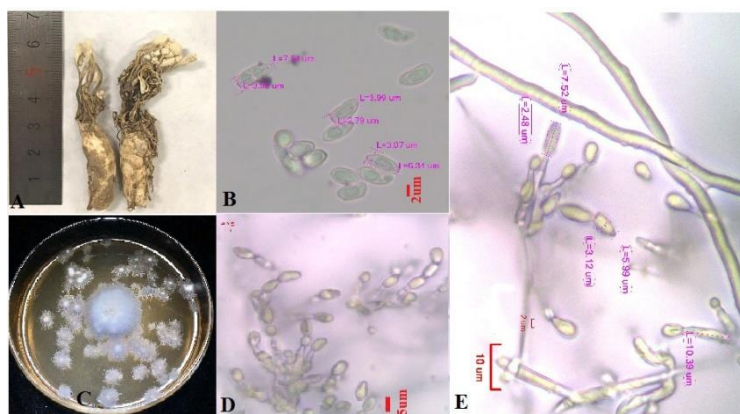
Mẫu có trạng thái vô tính, kí sinh trên cá thể ve sầu non, thu được tại Khu bảo tồn thiên nhiên Cópia ở tọa độ 21,317069°N - 103,593373°E, độ cao 1405,5 m, nơi có sinh cảnh đất nương rẫy, mẫu tìm thấy trong đất, có mật độ che phủ của rừng thấp, nhiều cỏ tranh và cây bụi.

Bó sợi mọc thẳng và đơn độc, tập trung ở phần đầu của kí chủ, màu vàng, kích thước 3 - 3,5 cm; phần đỉnh có phân nhánh kích thước khoảng 0,5 - 1cm, có lớp bào tử mịn, dạng bột, màu trắng (Hình 1A).

Các bào tử không có màng bao bọc, hình elip thon nhọn ở 2 đầu, kích thước 3,02 - 3,07 μ m \times 6,34 \times 7,54 μ m, bào tử không bắt màu với thuốc nhuộm Melzer's (Hình 1B).

Các khuẩn lạc khi cấy trên môi trường PDA phát triển mạnh, có hệ sợi màu trắng, sau 14 ngày nuôi cấy trong điều kiện 25 °C, chiếu sáng 12h phía đỉnh của hệ sợi nấm có xuất hiện các bào tử dạng bột trắng, dần chuyển đục màu (Hình 1C).

Thể bình có hình dạng bình cầu, kích thước 10,39 μ m. Bào tử đỉnh lớn, kích thước 2,48 μ m - 3,12 μ m \times 5,99 μ m - 7,52 μ m (Hình 1D,1E).



Hình 1. Chủng nấm *Isaria cicadae* CPA60

* *Isaria fumosorosea*



Hình 2. Chủng nấm *Isaria fumosorosea* XS69

Kí hiệu mẫu: XS69

Mẫu có trạng thái vô tính, kí sinh trên bộ *Lepidoptera*, thu được tại VQG Xuân Sơn - Phú Thọ ở tọa độ 21°6'170"N - 104°56,292'E, độ cao 800 m, nơi có mật độ che phủ của rừng lớn.

Bó sợi mọc thẳng và đơn độc kích thước 2 - 3 cm (Hình 2A, 2B), phân nhánh bắt đầu từ gốc, các nhánh là nơi tập trung của bào tử màu nâu - tím, dạng bột mịn.

Bào tử không có màng bao bọc, hình hạt đậu, có hai thành lõm, kích thước kích thước 2,5 - 2,86 $\mu\text{m} \times$ 3,57 - 3,72 μm , bào tử không bắt màu với thuốc nhuộm Melzer's (Hình 2C).

Đặc điểm hình thái nuôi cấy: khi nuôi cấy trên môi trường SDAY có hệ sợi màu trắng. Sau dần chuyển nâu như mẫu thu ngoài tự nhiên (Hình 2D, 2E). Bào tử đính có dạng chuỗi, trên các chuỗi có các bào tử hình hạt đậu kích thước 1,4 - 2,26 $\mu\text{m} \times$ 2,5 - 3,6 μm , liên kết với nhau. Thể bình phình to thuôn dài phía cổ, kích thước 4,4 - 6,5 $\mu\text{m} \times$ 2,5 - 3,0 μm (Hình 2F).

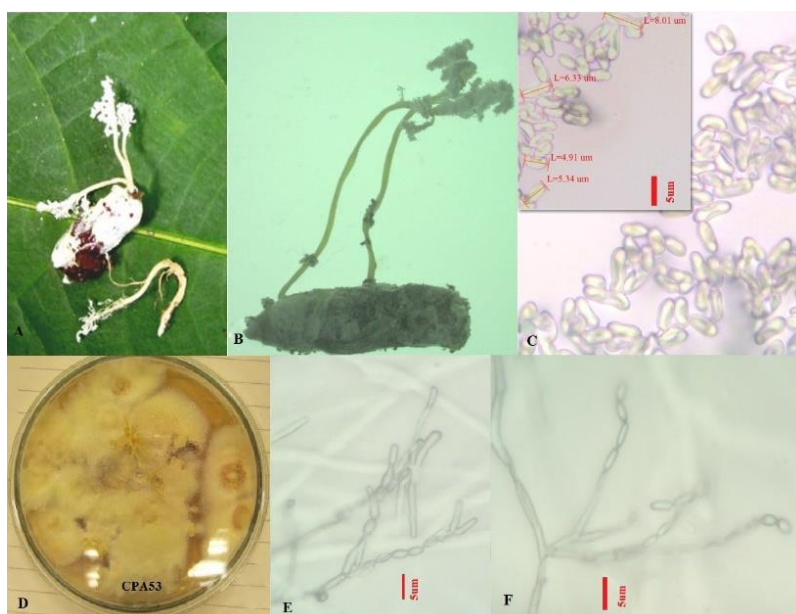
* *Isaria tenuipes*

- Kí hiệu mẫu: CPA53

- Mẫu có trạng thái vô tính, kí sinh trên bộ *Lepidoptera*, thu được tại KBTTN Copia ở tọa độ 21,328464°N - 103,584488°E, độ cao 1520,5 m, nơi có sinh cảnh rừng hỗn tạp, phục hồi sau khi cháy, dưới lớp đất mùn.

Bó sợi mọc thẳng, màu vàng nhạt, có kích thước 6 - 7cm, bào tử thường tập trung ở phần đỉnh của bó sợi. Tuy nhiên, dọc theo bó sợi cũng có thể có các phân phân nhánh, phía đỉnh có các bào tử màu trắng (Hình 3A, 3B). Bào tử có hình cong giống hạt đậu, có hai thành lõm. Bào tử không có màng bao bọc, kích thước từ 1,41 - 2,23 μm \times 4,9 - 8 μm (Hình 3C).

Đặc điểm hình thái nuôi cấy: mẫu nấm khi nuôi cấy trên môi trường SDAY có hệ sợi màu vàng, mịn. Sau 4 ngày nuôi cấy thấy xuất hiện các bào tử màu trắng (Hình 3D). Bào tử dính có dạng chuỗi, trên các chuỗi có các bào tử hình hạt đậu kích thước 1,41 - 2,1 μm \times 4,5 - 5 μm , liên kết với nhau. Thể bình dạng sợi, phình to thuôn dài phía cổ, kích thước 4,6 - 7,5 μm \times 2,2 - 2,5 μm (Hình 3E, 3F).



Hình 3. chủng nấm *Isaria tenuipes* CPA53

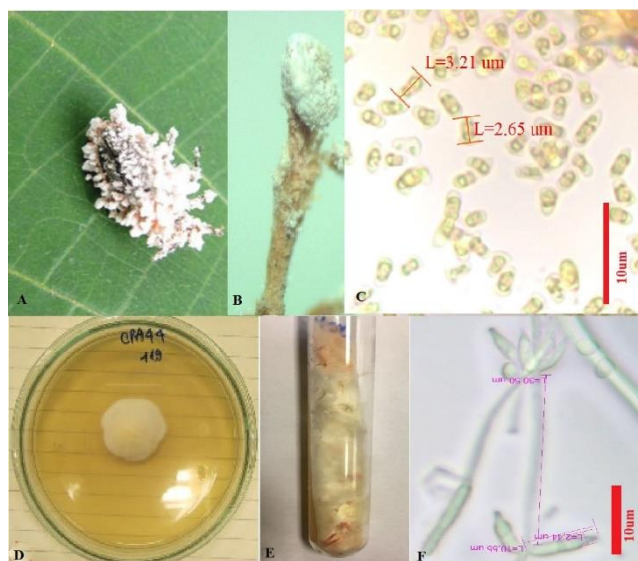
* *Isaria amoenerosea*

Kí hiệu mẫu: CPA44

Mẫu có trạng thái vô tính, kí sinh trên bộ *Coleoptera*, thu được tại KBTTN Copia ở tọa độ 21,317025°N - 103,593334°E, độ cao 1407,5 m, nơi có sinh cảnh rừng hỗn tạp, mật độ che phủ thấp, nhiều cây bụi.

Phần bó sợi mọc thẳng, kích thước 1 - 1.5 cm, có màu vàng cam, hoặc hồng, bào tử màu trắng tập trung ở phần đỉnh của bó sợi (Hình 4A, 4B). Quan sát bào tử có hình cầu nhỏ hoặc hình hạt đậu kích thước 2,65 - 3,21 μm , không bắt màu với thuốc nhuộm Melzer; Bào tử được chứa trong lớp màng bao bọc mỏng, xuất hiện các cấu trúc một đầu bao lệch (Hình 4C).

Đặc điểm hình thái nuôi cấy: mẫu nấm khi nuôi cấy trên môi trường SDAY có hệ sợi màu vàng, mịn. Sau 10 ngày nuôi cấy bó sợi có màu hồng xuất hiện trên môi trường ống nghiệm thạch (Hình 4D, 4E). Bào tử dính nhỏ, hình dạng có thể dạng tròn, dạng elip, kích thước 2,5 - 3,5 \times 1,7 - 2,2 μm , không ghi nhận dạng chuỗi, không liên kết với nhau. Thể bình phình to dạng bình, thuôn dài phía cổ, kích thước 2,55 \times 10,55 μm . (Hình 4F).



Hình 4. chủng nấm *Isaria amoenerosea* CPA44

*** *Isaria* SP. XS97**

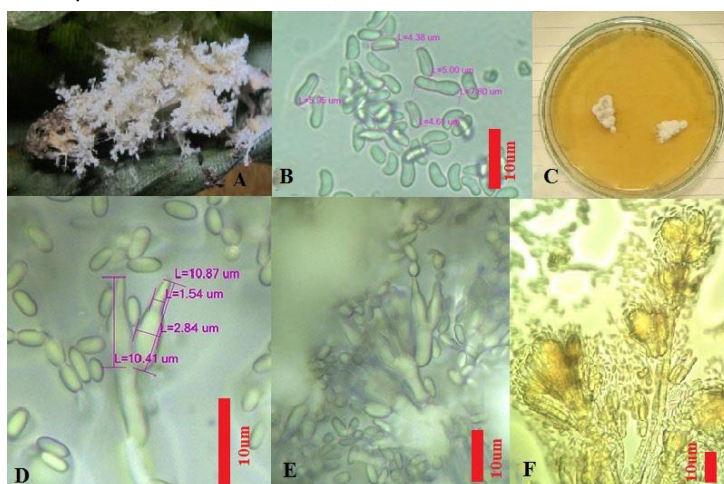
Kí hiệu mẫu: XS97

Mẫu có trạng thái vô tính, kí sinh trên bộ *Lepidoptera*, thu được tại VQG Xuân Sơn, ở tọa độ 21°6', 174°N - 104°56', 292°E, độ cao 639,5 m, nơi có mật độ che phủ của rừng lớn.

Phần bố sợi mọc thẳng, kích thước 1 - 1,5cm, có màu vàng nhạt, phân nhánh từ gốc, trên các nhánh có các bào tử màu trắng tập trung (Hình 5A).

Quan sát bào tử có hình hạt đậu, có thể cong ở giữa hoặc thắt eo ở giữa, kích thước 1,5 - 2 μm × 4,48 - 7,80 μm, không bắt màu với thuốc nhuộm melzer (Hình 5B).

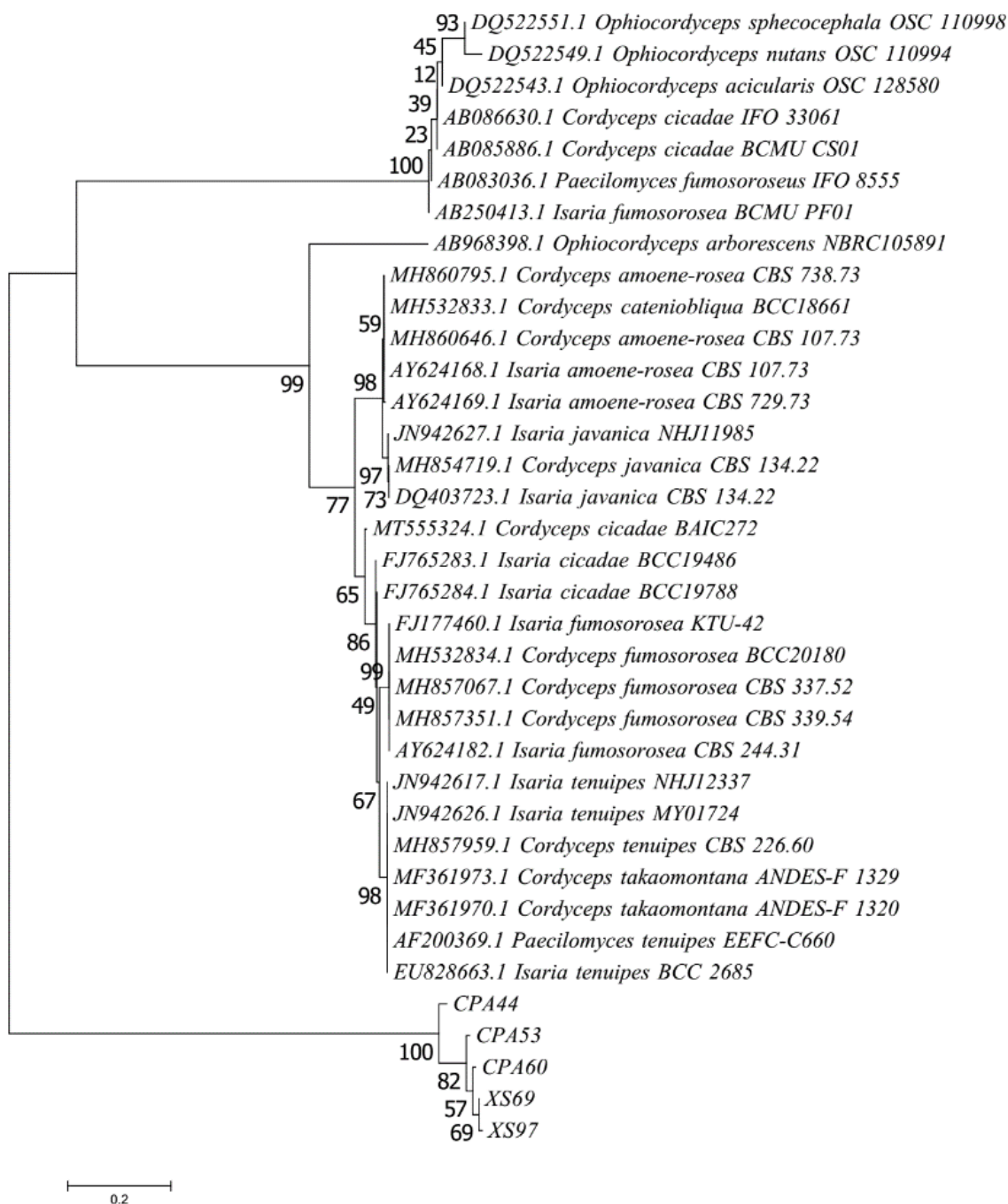
Đặc điểm hình thái nuôi cấy: mẫu nấm khi nuôi cấy trên môi trường SDAY có hệ sợi màu trắng, mịn, ăn sâu xuống thạch, phát triển chậm (Hình 5C). Bào tử đính nhỏ, hình dạng có dạng elip, kích thước 1,68 - 1,9 μm × 4,5 - 4,9 μm, liên kết với nhau dạng chuỗi. Thể bình phình to, tập trung thành cụm dạng bình, thuôn dài phía cổ, kích thước 2,5 - 2,84 μm × 10,41 - 10,87 μm, kích thước cổ 1,54 × 4 μm. (Hình 5D, 5E, 5F)



Hình 5. chủng nấm *Isaria* SP XS97

2.2.2. Định loại phân tử

Cây phát sinh chủng loại của cá chủng nấm CPA60, XS69, CPA53, CPA44, XS97 dựa xây dựng bởi trình tự các vùng gen *nrLSU*, *ITS*, *Rpb1*, bằng phương pháp Neighbor Joining, với bootstrap 1000 sử dụng phần mềm MEGA10, lần được các kết quả như Hình 6, 7, 8.

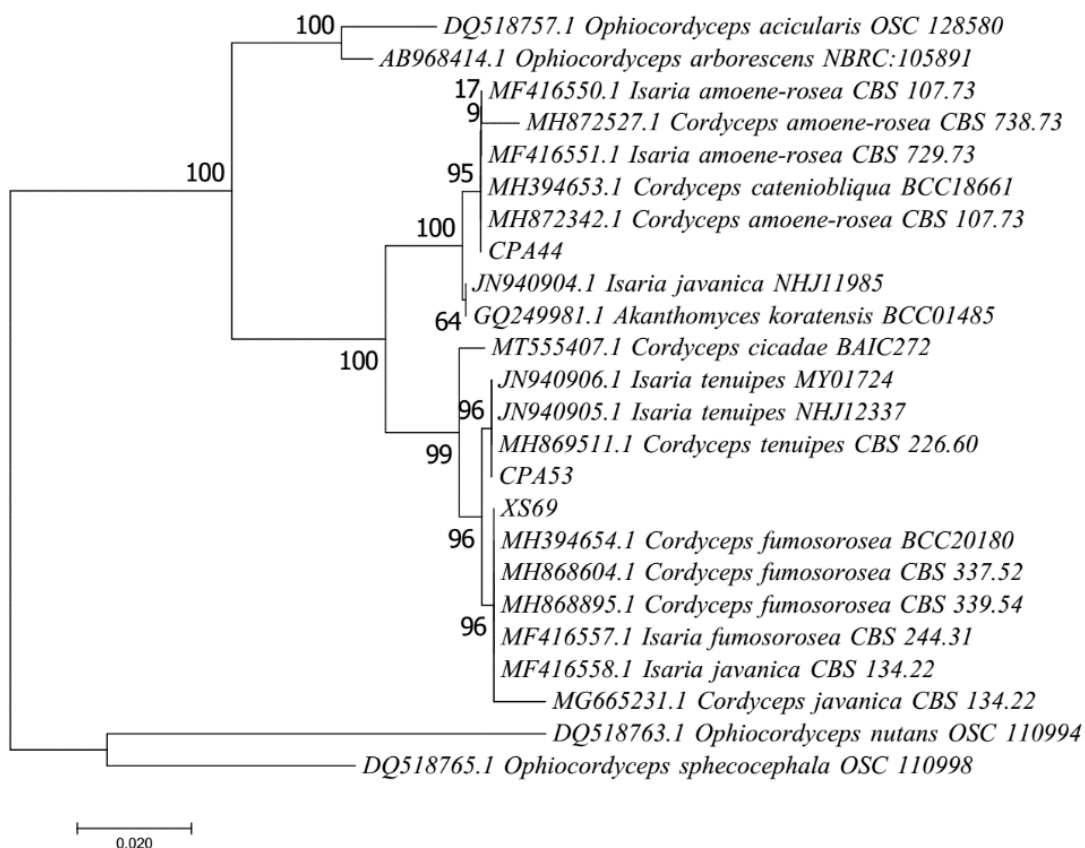


Hình 6. Kết quả xây dựng cây phát sinh loài dựa trên vùng gen *ITS1-5.8S rDNA-ITS2*

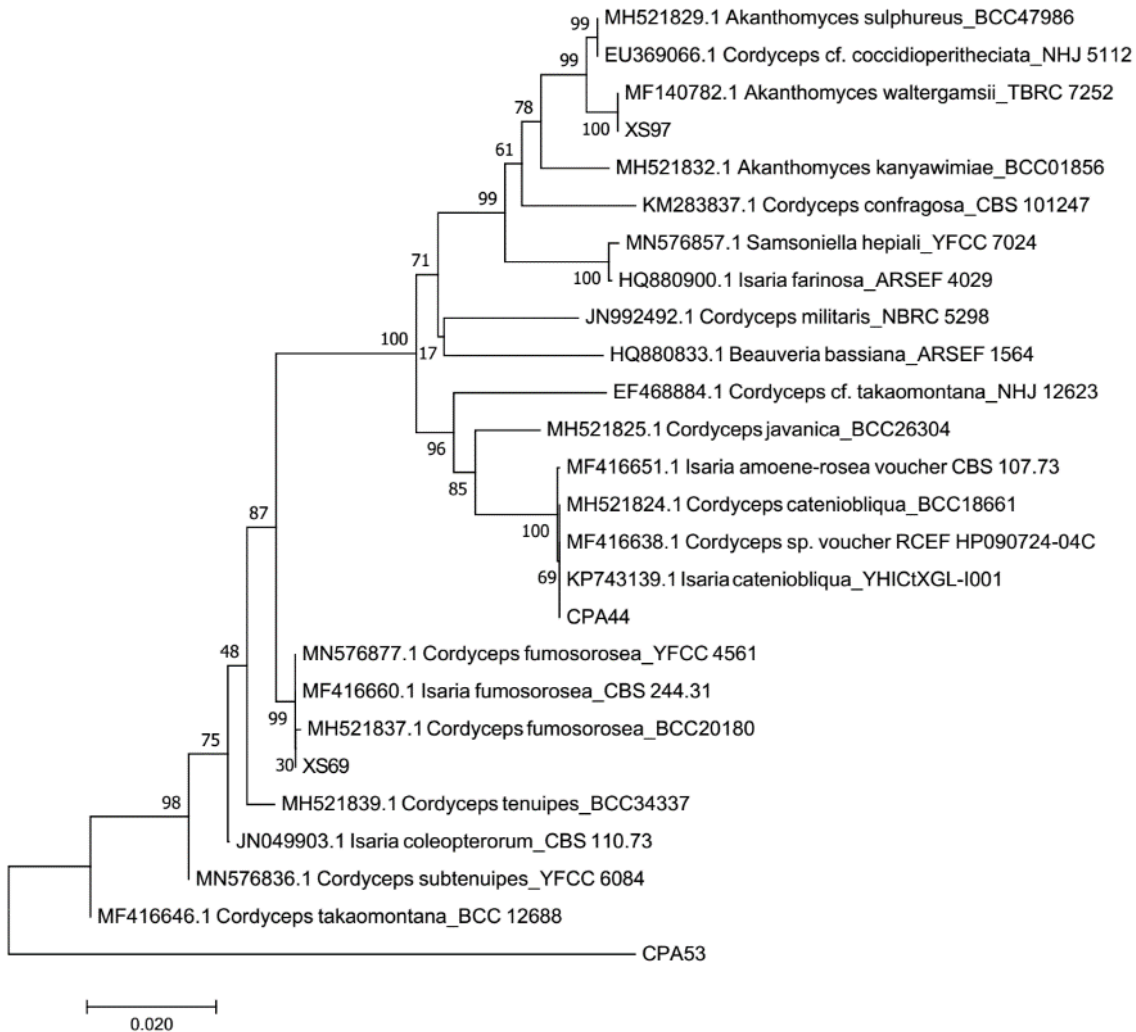
Cây phát sinh chủng loại khi nghiên cứu vùng ITS thấy các chủng nấm CPA60, XS69, CPA53, CPA44, XS97 thuộc cùng 1 nhóm, với các loài nấm thuộc họ Cordycipitaceae. Đối với chủng nấm CPA60 khi nghiên cứu trình tự vùng ITS có tỉ lệ tương đồng với chủng nấm *Cordyceps cicadae* BCMU CS01 trình tự gen AB085886.1, *Cordyceps cicadae* IFO 33061 trình tự gen AB086630.1 là 99,64%; chủng CPA44 có tỉ lệ tương đồng với chủng nấm *Cordyceps amoene-rosea* trình tự gen MH860795.1 là 99,83%; chủng XS69 tương đồng với các chủng nấm *Isaria fumosorosea* KTU-42 mã số gen FJ177460.1 là 99,64%; chủng XS97 tương đồng với *Cordyceps fumosorosea* BCC20180 mã số gen MH532834.1 là 98,76%; chủng CPA53 tương đồng với chủng nấm *Isaria tenuipes* NHJ12337 mã số gen JN942617.1 là 99,63%.

Cây phát sinh chủng loại của vùng gen *nrLSU* cho thấy chủng CPA44 được xếp vào nhóm các loài *Cordyceps amoene-rosea*, *Isaria amoene-rosea*; chủng XS69 được xếp cùng nhóm với *Isaria fumosorosea*; chủng CPA 53 được xếp cùng nhóm với *Isaria tenuipes*, *Cordyceps tenuipes*; Đối với chủng XS97 khi nghiên cứu vùng gen ITS tương đồng với *Cordyceps fumosorosea* BCC20180 mã số gen MH532834.1 là 98,76%, nhưng khi nghiên cứu vùng gen *Rpb1* lại không nằm cùng nhóm với *Cordyceps fumosorosea*, mặt khác khi phân tích hình thái chủng nấm XS97 có các đặc điểm bó sợi, màu sắc và hình thái của bào tử, đặc điểm hình thái nuôi cấy khác với loài *Isaria fumosorosea*. Vì vậy, để có thể khẳng định chính xác tên loài của mẫu XS97 cần có các nghiên cứu tiếp theo.

Như vậy bằng phân tích đặc điểm hình thái và phân tích phát sinh chủng loại chúng tôi kết luận các mẫu CPA60, XS69, CPA53, CPA44, XS97 là các loài: *Isaria cicadae* CPA60, *Isaria fumosorosea* XS69, *Isaria tenuipes* CPA53, *Isaria amoene-rosea* CPA44, *Isaria* SP. XS97.



Hình 7. Kết quả xây dựng cây phát sinh loài dựa trên vùng gen *nrLSU*



Hình 8. Kết quả xây dựng cây phát sinh loài dựa trên vùng gen Rpb1

*** Về đặc điểm sinh thái**

Các loài *Isaria* được ghi nhận phân bố ở nhiều nơi trên thế giới như: Thái Lan, Trung Quốc, Úc, Nam Mỹ, Bắc Mỹ, trong điều kiện khô nóng của Châu Phi, hoặc điều kiện ôn đới như ở châu Âu, đặc biệt là các khu vực phía bắc của Bắc Cực các nghiên cứu đã ghi nhận sự có mặt chủ yếu của một số loài *Tolypocladium xiindrosporium*, *Beauveria bassiana* và *Metarhizium anisopliae* họ Ophiocordycipitaceae, Cordycipitaceae ở Na Uy, Phần Lan [21-29].

Trong nghiên cứu này mẫu nấm các mẫu nấm *Isaria* thu được ở các sinh cảnh: núi đất có kiểu rừng cây nhiệt đới, độ che phủ lớn, độ cao từ 200 - 600 m tại VQG Xuân Sơn - Phú Thọ; và tại các khu vực có điều kiện che phủ rừng thấp, có điều kiện nhiệt độ khô lạnh, mùa đông có nhiệt độ thấp, có độ cao trên 1400m của KBTN Copia - Sơn La. Việc bắt gặp các mẫu ở các khu vực có điều kiện độ cao, điều kiện che phủ của rừng, điều kiện nhiệt độ khác nhau cho thấy khả năng thích nghi với các điều kiện sinh thái khác nhau của chi nấm *Isaria*. Các ghi nhận này phù hợp với các nghiên cứu trước đó tại khu vực địa lý khác nhau trên thế giới. Điều này chứng tỏ loài thuộc chi *Isaria* có phạm vi phân bố rộng.

3. Kết luận

Dựa trên đặc điểm hình thái, nuôi cấy và sinh học phân tử, các mẫu nấm *Isaria* đã thu thập tại VQG Xuân Sơn - Phú Thọ và KBTN Copia - Sơn La được định danh thuộc 4 loài: *Isaria cicadae* CPA60, *I. fumosorosea* XS69, *I. tenuipes* CPA53, *I. amoene-rosea* CPA44, chủng nấm XS97 chưa xác định được chính xác tên loài *Isaria* sp. XS97. Kết quả nghiên cứu này bổ sung khu vực phân bố của các loài này ở Việt Nam, đồng thời làm cơ sở cho các nghiên cứu cơ bản và ứng dụng sau này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] [Http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp](http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp).
- [2] Gams W, Hodge KT, Samson RA, Korf RP, Seifert KA, 2005. Proposal to Conserve the Name *Isaria* (Anamorphic Fungi) with a Conserved Type. *Taxon*, 54(2), pp. 537.
- [3] Luangsa-Ard JJ, Hywel-Jones NL, Manoch L, Samson RA, 2005. On the Relationships of *Paecilomyces* Sect. *Isarioidea* Species. *Mycological Research*, 109(5), pp. 581-589.
- [4] Luangsa-Ard JJ, Hywel-Jones NL, Samson RA, 2004. The Polyphyletic Nature of *Paecilomyces* Sensu Lato Based on 18s-Generated rDNA Phylogeny. *Mycologia*, 96(4), pp. 773-780.
- [5] Sung GH, Hywel-Jones NL, Sung JM, Luangsa AJJ, Shrestha B, Spatafora JW, 2007. Phylogenetic Classification of *Cordyceps* and the Clavicipitaceous Fungi. *Stud Mycol.*, 57(1), pp. 5-59.
- [6] Lê Tấn Hưng, Võ Thị Hạnh, Lê Thị Bích Phượng, Trần Thanh Phong, Trương Thị Hồng Vân, Somsak Sivichai, 2010. *Nấm Côn Trùng Tại Vườn Quốc Gia Cát Tiên: Nguồn Tài Nguyên Quý Cho Các Ứng Dụng Sinh Học*. Hội nghị Khoa học kỉ niệm 35 năm Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam - Hà Nội, tr. 1-10.
- [7] Phạm Quang Thu, 2011. Thành Phần Loài Nấm Kí Sinh Côn Trùng Tại Vườn Quốc Gia Pù Mat - Nghệ An. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 2(1), tr. 88-94.
Trương Xuân Sinh, Nguyễn Thị Thúy, 2013. Đa dạng sinh học nấm kí sinh côn trùng ở Vườn Quốc gia Pù Mát, Nghệ An. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 2(1), tr. 28-35.
- [8] Đỗ Thị Thiên Lý, Phạm Nữ Kim Hoàng, Phan Hữu Hùng, Nguyễn Việt Trường, Lê Huyền Ái Thúy, Trương Bình Nguyên, 2015. *Bước Đầu Nghiên Cứu Chi Nấm Isaria Tại Núi Langbian Thuộc Cao Nguyên Lâm Viên*. Hội nghị Khoa học toàn quốc về Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật lần thứ 6, tr. 228-236.
- [9] Choi YW, Hyde KD, Ho WH, 1999. Single Spore Isolation of Fungi. *Fungal Diversity*, 3(1), pp. 29-38.
- [10] Samson RA, 1974. *Paecilomyces* and Some Allied Hyphomycetes. *Studies in Mycology*, 6, pp. 1-119.
- [11] Doyle J, 1987. A Rapid DNA Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19(1), pp. 11-15.
- [12] Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W, 2012. Fungal Barcoding, Consortium and Fungal Barcoding Consortium Author, List. Nuclear

- Ribosomal Internal Transcribed Spacer (Its) Region as a Universal DNA Barcode Marker for Fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109(16), pp. 6241-6.
- [13] Rehner S, Samuels GJ, 1994. Taxonomy and Phylogeny of Gliocladium analysed from Nuclear Large Subunit Ribosomal DNA Sequences. *Mycological Research*, 98(6), pp. 625-634.
- [14] Sung GH, Sung JM, Hywel-Jones NL, Spatafora JW, 2007. A Multi-Gene Phylogeny of Clavicipitaceae (Ascomycota, Fungi): Identification of Localized Incongruence Using a Combinational Bootstrap Approach. *Mol Phylogenet Evol.*, 44(3), pp. 1204-23.
- [15] Vilgalys R, Hester M, 1990. Rapid Genetic Identification and Mapping of Enzymatically Amplified Ribosomal DNA from Several Cryptococcus Species. *Journal of Bacteriology*, 172(8), pp. 4238-4246.
- [16] Castlebury LA, Rossman AY, Sung GH, Hyten AS, Spatafora JW, 2004. Multigene Phylogeny Reveals New Lineage for Stachybotrys Chartarum, the Indoor Air Fungus. *Mycol Res*, 108(8), pp. 864-72.
- [17] Hall TA, 2011. Bioedit: An Important Software for Molecular Biology. *GERF Bulletin of Biosciences*, 2(1), pp. 60-61.
- [18] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG, 1997. The Clustal_X Windows Interface: Flexible Strategies for Multiple Sequence Alignment Aided by Quality Analysis Tools. *Nucleic Acids Research*, 25(24), pp. 4876-4882.
- [19] Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K, 2018. Mega X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.*, 35(6), pp. 1547-1549.
- [20] Luangsa-ard JJ, Tسانathai K, Mongkolsamrit S, Hywel-Jones NL, 2007. *Atlas of Invertebrate-Pathogenic Fungi of Thailand: Volume 1*. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology,
- [21] Luangsa-ard JJ, Tسانathai K, Mongkolsamrit S, Hywel-Jones NL, 2008. *Atlas of Invertebrate-Pathogenic Fungi of Thailand: Volume 2*. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology,
- [22] Dong C, Guo S, Wang W, Liu X, 2015. Cordyceps Industry in China. *Mycology*, 6(2), pp. 121-129.
- [23] Klingen, I., Eilenberg, J., Meadow, R, 2002. Effects of Farming System, Field Margins and Bait Insect on the Occurrence of Insect Pathogenic Fungi in Soils. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 91(1-3), pp. 191-198.
- [24] Vänninen I, 1996. Distribution and Occurrence of Four Entomopathogenic Fungi in Finland: Effect of Geographical Location, Habitat Type and Soil Type. *Mycological Research*, 100(1), pp. 93-101.
- [25] Hubregtse J, 2018. *Fungi in Australia. Part 2: Ascomycota*. Field Naturalists Club of Victoria Inc, Australia.
- [26] Catania MdV, Sanjuan TI, Robledo GL, 2018. South American Cordyceps S. L. (Hypocreales, Ascomycota): First Assessment of Species Diversity in Argentina. *Nova Hedwigia*, 106(3-4), pp. 261-281.
- [27] Bates ST, Miller AN, 2018. The Protochecklist of North American Nonlichenized Fungi. *Mycologia*, 110(6), pp. 1222-1348.
- [28] Masee G, 1895. A Revision of the Genus Cordyceps. *Annals of Botany*, 9(33), pp. 1-44.

ABSTRACT

Morphological and molecular characteristics of *Isaria* at Xuan Son National Park and Copia Nature Reserve

Nguyen Dinh Viet¹, Nguyen Thi Thuy Van^{1,2}, Truong Xuan Lam³, Duong Minh Lam^{1,*}

¹*Faculty of Biology, Hanoi National University of Education*

²*Department of Forensic Science, The People's Police Academy*

³*Institute of Ecology and Biological Resource, Vietnam Academy of Science and Technology*

The fungal genus *Isaria* includes important entomopathogenic species, which account for a large number of species of the Cordycipitaceae. Currently, *Isaria* species have been found in all continents of the Earth with 284 species described but 72 species were widely accepted, and with many applications in pharmacy and agriculture. There have been 11 *Isaria* species recorded in Vietnam. In our study at Copia Nature Reserve, Son La province and Xuan Son National Park, Phu Tho province, 51 fungal samples were collected on *Lepidoptera* and *Coleoptera* larvae, of which 5 fungal samples belonged to the *Isaria* genus. Based on morphological and molecular characteristics, the samples were identified to *Isaria cicadae*, *I. fumosorosea*, *I. tenuipes* and *I. amoene-rosea*. Further studies are needed to clarify *Isaria* sp. XS97 identification.

Keywords: *Isaria*, insect fungi, Copia, Son La, Xuan Son, Phu Tho.