

## EVALUATION OF SOME CHEMICAL COMPONENTS AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF *Cordyceps militaris* HYBRID STRAINS

Nguyen Truong Khoa<sup>1</sup>, Nguyen Dinh Viet<sup>2</sup>, Tran Duy Cuong<sup>1</sup>, Le Thi Khanh<sup>2</sup>, Tran Thi Phuong Thuy<sup>2</sup>, Ha Huy Cong<sup>2</sup>, Nguyen Phuong Dai Nguyen<sup>3</sup>, Duong Van Cuong<sup>4</sup>, Le Thi Tuoi<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Agricultural Genetics Institute, <sup>2</sup>Hanoi National University of Education

<sup>3</sup>Tay Nguyen University, <sup>4</sup>TNU - University of Agriculture and Forestry

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 03/5/2024	<i>Cordyceps militaris</i> is an insect parasitic fungus of high pharmacological and economic value. The process of artificially cultivating this fungus has been successful and is increasingly expanding, requiring strain stability. Previous research results showed that single-spore hybrid fungal strains ensure stability. In this study, ascospores from different parental sources were genotyped by <i>MATI-1-1</i> and <i>MATI-2-1</i> genes and hybridized on rice-pupa media. The morphology and fruiting body yield of 8 hybrid strains showed that hybrid CT1 and CT2 had long fruiting body morphology and dry yield of 4.4 and 5.0 g/jar, respectively. Meanwhile, the CT4 hybrid fruit body extract has cordycepin, adenosine, and total phenolic content, as well as DPPH free radical scavenging activity nearly twice as high as the CT1 and CT2 hybrids. The tyrosinase enzyme inhibitory activity of CT2 hybrid fruit body extract (59.0%) was higher than that of other hybrids. The results show that hybrid strains CT1, CT2, and CT4 are potential strains for breeding strategies to develop new strains with high yield and quality.
Revised: 10/6/2024	
Published: 24/6/2024	
<b>KEYWORDS</b>	
Biological activity	
Chemical component	
Cordycepin	
<i>Cordyceps militaris</i>	
Hybrid strain	

## ĐÁNH GIÁ MỘT SỐ THÀNH PHẦN HOÁ HỌC VÀ HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA MỘT SỐ CHỦNG NẤM *Cordyceps militaris* LAI HỮU TÍNH

Nguyễn Trường Khoa<sup>1</sup>, Nguyễn Đình Việt<sup>2</sup>, Trần Duy Cường<sup>1</sup>, Lê Thị Khánh<sup>2</sup>, Trần Thị Phương Thủy<sup>2</sup>, Hà Huy Công<sup>2</sup>, Nguyễn Phương Đại Nguyên<sup>3</sup>, Dương Văn Cường<sup>4</sup>, Lê Thị Tươi<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Viện Di truyền Nông nghiệp Việt Nam, <sup>2</sup>Trường Đại học Sư phạm Hà Nội

<sup>3</sup>Trường Đại học Tây Nguyên, <sup>4</sup>Trường Đại học Nông Lâm - ĐH Thái Nguyên

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 03/5/2024	<i>Cordyceps militaris</i> là loài nấm kí sinh trên côn trùng có giá trị cao về dược lí và kinh tế. Quy trình nuôi cấy nhân tạo loài nấm này đã thành công và ngày càng mở rộng, điều này đòi hỏi sự ổn định về chủng giống. Những kết quả nghiên cứu trước đây cho thấy chủng nấm lai từ bào tử đơn tính đảm bảo sự ổn định. Trong nghiên cứu này, các bào tử hữu tính từ các nguồn bố mẹ khác nhau được xác định kiểu gene giới tính <i>MATI-1-1</i> và <i>MATI-2-1</i> và được lai tạo trên môi trường gạo - nhộng. Hình thái và năng suất quả thể của 8 chủng lai cho thấy phép lai CT1 và CT2 có hình thái quả thể dài và năng suất khô tương ứng đạt 4,4 và 5,0 g/bình. Trong khi đó, dịch chiết quả thể phép lai CT4 có hàm lượng cordycepin, adenosin và phenolic tổng số, cũng như hoạt tính quét gốc tự do DPPH cao gần gấp hai lần so với phép lai CT1 và CT2. Hoạt tính ức chế enzyme tyrosinase của dịch chiết quả thể phép lai CT2 (59,0%) cao hơn các phép lai khác. Kết quả cho thấy các chủng lai CT1, CT2 và CT4 là những chủng tiềm năng cho chiến lược lai tạo phát triển chủng giống mới năng suất và chất lượng cao.
Ngày hoàn thiện: 10/6/2024	
Ngày đăng: 24/6/2024	
<b>TỪ KHÓA</b>	
Hoạt tính sinh học	
Thành phần hoá học	
Cordycepin	
<i>Cordyceps militaris</i>	
Chủng lai tạo	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.10271>

\* Corresponding author. Email: [tuoilt@hnue.edu.vn](mailto:tuoilt@hnue.edu.vn)

## 1. Giới thiệu

*Cordyceps militaris* thuộc chi *Cordyceps* (Hypocreales, Ascomycetes), là một loại nấm ký sinh trên ấu trùng hoặc nhộng của côn trùng cánh vẩy. Tương tự như loài *Ophiocordyceps sinensis*, một loại nấm thảo dược của Trung Quốc, *C. militaris* sinh tổng hợp nhiều chất có hoạt tính sinh học và được sử dụng rộng rãi như một loại thuốc cổ truyền và thực phẩm tốt cho sức khỏe [1]. Do hiện nay đang được sử dụng rộng rãi trong việc điều trị nhiều bệnh trong y học hiện đại nên *C. militaris* được coi là mục tiêu của cuộc cách mạng dược phẩm xanh vì tính an toàn và thân thiện với môi trường. Với hoạt chất chính là cordycepin có nhiều hoạt tính như chống khối u, chống di căn, kháng khuẩn, loại nấm dược liệu *C. militaris* là một trong những ứng cử viên quan trọng cho nguồn dược liệu cơ bản trong tương lai [2].

Trong sản xuất hàng loạt với quy mô lớn, sự ổn định của chủng giống đóng vai trò quan trọng. Sự thoái hoá giống ở nấm *C. militaris* [3], [4] có thể gây ảnh hưởng đến sản xuất. Phương pháp lai đơn bào tử ở nấm *Coryceps bassiana* đã được báo cáo có thể tạo ra sự ổn định của chủng giống [5]. Phương pháp lai đơn bào tử được dựa trên sự kết hợp của các đơn bào tử mang các gene quy định kiểu giới tính gồm có locus MAT1-1 và locus MAT1-2. Trong nghiên cứu của Shrestha và cộng sự (2004), những gene giới tính (*MAT1-1-1* thuộc locus MAT1-1 và *MAT1-2-1* thuộc locus MAT1-2) được ứng dụng thành công trong việc lai tạo quả thể nấm *C. militaris* và duy trì sự ổn định của chủng giống [6], cải thiện năng suất của chủng giống [7]. Nghiên cứu tương tự của Kang và cộng sự (2017) và Lee và cộng sự (2017) đã tạo chủng sinh cordycepin cao với phương pháp lai bào tử hữu tính dựa trên kiểu gene xác định kiểu giới tính. Hàm lượng cordycepin cao nhất là 6,63 mg/g (trọng lượng khô), tăng 35% so với các chủng bố mẹ [8], [9].

Trong nghiên cứu này, các gene quy định kiểu giới tính của các đơn bào tử hữu tính được xác định làm cơ sở ghép cặp lai. Năng suất quả thể cũng như một số thành phần hoá học và hoạt tính sinh học của dịch chiết quả thể nấm được đánh giá, làm cơ sở cho nghiên cứu ứng dụng và phát triển các chủng nấm lai.

## 2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Vật liệu

Các đơn bào tử thu được từ quả thể hữu tính của chủng *Cordyceps militaris*-NBRC 9787 (kí hiệu NB) được cung cấp bởi Viện Di truyền Nông nghiệp Việt Nam và chủng *Cordyceps militaris* thương mại từ Hàn Quốc (kí hiệu HQ) đã được định danh bằng trình tự ITS và được cung cấp bởi Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội được lưu giữ và bảo quản ở -80°C tại phòng thí nghiệm sinh học phân tử, Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Phương pháp tách chiết DNA và xác định gene quy định kiểu giới tính

Sinh khối sợi nấm của từng đơn bào tử phân lập từ các chủng bố mẹ NB và HQ thu từ môi trường nuôi cấy PDB (gồm 20 g dextrose và nước luộc từ 200 g khoai tây cho 1 lít môi trường) được làm khô và nghiền trong nitơ lỏng. Sinh khối nấm sau khi nghiền được bổ sung CTAB 2% và ủ ở 65°C trong 90 phút, mẫu được đảo đều trong quá trình ủ; dung dịch chloroform:isoamyl alcohol (tỉ lệ 24:1) được bổ sung, trộn đều và ly tâm 13000 vòng/phút để thu phần dịch trong phía trên ống eppendorf. Bổ sung isopropanol (tỉ lệ 1:1), ly tâm ở 13000 vòng/phút, loại bỏ dịch nổi để thu tủa DNA. Mẫu DNA được để khô ở nhiệt độ phòng, hoà tan bằng đệm TE và lưu giữ ở -20°C.

Gene quy định kiểu giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1* được kiểm tra bằng phản ứng PCR với cặp mồi tương ứng được thiết kế dựa trên trình tự của các gene này, dự kiến cho băng sản phẩm với kích thước 1463 bp cho *MAT1-1-1* và 717 bp cho *MAT1-2-1*. Trình tự mồi MAT1-1-1-F (5'-3'): ATGGAACACAGATCGAGC; mồi MAT1-1-1-R (5'-3'): AGTCTTCATGAGGATTATACTCG; Trình tự mồi MAT1-2-1-F (5'-3'): GATCTGCAACTGGATCGG; mồi MAT1-2-1-R (5'-3'): CTACATGATTGACTCCGGG. Chu

trình của phản ứng PCR gồm: 95°C trong 1 phút, tiếp theo là 30 chu kỳ 95°C trong 30 giây, 53°C (gene *MATI-1-1*) và 54°C (gene *MATI-2-1*) trong 15 giây và 72°C trong 40 giây, và kết thúc bằng việc kéo dài ở 72°C trong 5 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 0,8%.

### 2.2.2. Phương pháp lai hữu tính và nuôi trồng nấm *C. militaris*

Các mẫu đơn bào tử được kích hoạt trên môi trường PDA (thành phần môi trường PDB bổ sung 15 g/L agar) thạch nghiêng, nuôi trong điều kiện 25°C, tối hoàn toàn 7 ngày sau đó để điều kiện sáng tối (12h/12h) trong 20 ngày. Bào tử vô tính từ ống giống được nuôi trong môi trường PDB, lắc ở tốc độ 130 vòng/phút trong 5-7 ngày. Sau đó tiến hành cấy chuyển sang môi trường gạo lứt, nhộng tằm (25g gạo lứt tẻ/bình nuôi cấy cùng 50 ml dung dịch dinh dưỡng có các thành phần (nhộng tằm, cao nấm men, peptone,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  và  $\text{MgSO}_4$ ) [8] để tạo quả thể. Bổ sung 4 ml hỗn hợp dung dịch (theo tỷ lệ 1:1) giống nuôi bào tử có gene *MATI-1-1* và *MATI-2-1*. Các bình nuôi được để tối 10 ngày sau đó chuyển sang điều kiện chiếu sáng (12h/12h) trong 45 ngày tiếp theo, trong điều kiện 25°C, độ ẩm không khí được duy trì khoảng 70-80%.

### 2.2.3. Phương pháp chiết quả thể nấm *C. militaris*

Quả thể nấm sau khi thu hoạch được đông khô và nghiền thành bột mịn. Mỗi gram mẫu khô được ngâm chiết với 40 mL ethanol 60% trong 3 ngày. Dịch chiết được để lắng, lấy phần dịch li tâm (13000 vòng/phút) trong 30 phút. Phần dịch trong được thu lại và sử dụng cho các phân tích thành phần hoá học và hoạt tính sinh học.

### 2.2.4. Phương pháp xác định thành phần hoá học

#### *Phương pháp xác định hàm lượng cordycepin và adenosine*

Mẫu dịch chiết nấm được phân tích sử dụng sắc kí lỏng hiệu năng cao (HPLC), trên máy Thermo Fisher UltiMate 3000 HPLC (Thermo Scientific) với Cột Mightysil RP-18 GP 250-4.6 (5  $\mu\text{m}$ ). Dung môi pha động gồm nước: acetonitril (9:1) chạy với chương trình 20 phút và tốc độ dòng 0,5 mL/phút, ở bước sóng UV 260 nm [8]. Để xác định hàm lượng cordycepin và adenosin, các chất chuẩn adenosin được pha ở nồng độ khác nhau từ 0,5 đến 50  $\mu\text{g/ml}$ , cordycepin được pha từ 0,5 đến 20  $\mu\text{g/ml}$  và được phân tích trên máy HPLC để xây dựng đường chuẩn. Đường chuẩn của adenosin:  $y = 63694x - 2723,3$  ( $R^2 = 1,0$ ); đường chuẩn của cordycepin:  $y = 46980x + 24521$  ( $R^2 = 0,9818$ ).

#### *Phương pháp xác định hàm lượng phenolic tổng số*

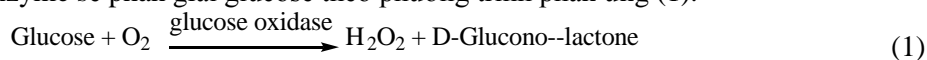
Phenolic tổng số được xác định bằng phân tích quang phổ với thuốc thử Folin-Ciocalteu [10]. Mẫu dịch chiết quả thể nấm được pha loãng 10 lần, sau đó 100  $\mu\text{L}$  mẫu được trộn với 10  $\mu\text{L}$  thuốc thử Folin-Ciocalteu. Sau 5 phút, thêm 100  $\mu\text{L}$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$  7,5% vào và trộn đều. Độ hấp thụ của dung dịch màu xanh lam được đo ở bước sóng 765 nm (Biotek, Hoa Kỳ) sau khi ủ ở nhiệt độ phòng trong 90 phút. Đường chuẩn của gallic acid được xây dựng với giá trị độ hấp thụ ở các nồng độ: 0; 20; 40; 60; 80 và 100  $\mu\text{g/mL}$ . Phương trình đường chuẩn:  $y = 0,024x + 0,0466$  ( $R^2 = 0,9991$ ). Hàm lượng phenolic tổng số được biểu thị bằng đương lượng gallic acid (GAE) tính bằng microgram trên mL dịch chiết quả thể nấm.

#### *Phương pháp xác định hàm lượng flavonoid tổng số*

Hàm lượng flavonoid tổng số được xác định dựa trên sự hình thành phức hợp Al-flavonoid [11]. Độ hấp thụ được đo ở bước sóng 415 nm. Quercetin được dùng làm chất chuẩn. Mẫu và chất chuẩn được pha trong dung dịch methanol 80%. Dung dịch quercetin chuẩn được pha với dãy nồng độ: 0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3 mg/mL. Trộn 100  $\mu\text{l}$  chất chuẩn hoặc mẫu với 20  $\mu\text{l}$   $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$  10%; 20  $\mu\text{l}$  K-acetate 1M và 860  $\mu\text{l}$  methanol 80%. Lắc đều rồi ủ trong 40 phút và đo ở máy quang phổ với bước sóng 415 nm. Phương trình đường chuẩn quercetin:  $y = 2,6728x + 0,0287$ . Hàm lượng flavonoid tổng số của các mẫu nghiên cứu biểu thị bằng đương lượng quercetin (QE) tính bằng microgram trên mL dịch chiết quả thể nấm.

### Phương pháp xác định hàm lượng glucose

Dịch chiết nấm được pha loãng 10 lần bằng nước cất và đo hàm lượng glucose bằng máy phân tích thành phần hoá sinh Biochemistry Analyzers YSI 2900. Sử dụng màng cố định enzyme glucose oxidase, enzyme sẽ phân giải glucose theo phương trình phản ứng (1).



Dựa vào hàm lượng  $\text{H}_2\text{O}_2$  được tạo ra, lượng glucose sẽ được tính toán tự động.

### 2.2.5. Phương pháp xác định hoạt tính sinh học

#### Hoạt tính chống oxi hoá

Phương pháp đánh giá hoạt tính chống oxi hoá dựa trên khả năng quét gốc tự do DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) dựa trên phương pháp mô tả của Mohammad và cộng sự (2019) với một số thay đổi [12]. Dung dịch DPPH 0,1 mM (180  $\mu\text{L}$ ) được trộn với 20  $\mu\text{L}$  dịch chiết quả thể nấm trong các giếng đĩa 96 giếng. Hỗn hợp phản ứng được để trong tối ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Độ hấp thụ của hỗn hợp được đo bằng quang phổ ở bước sóng 517 nm bằng Microplate Reader (Biotek, Hoa Kỳ). Ascobic acid được sử dụng làm đối chứng dương.

Phần trăm hoạt tính quét gốc tự do DPPH được tính theo công thức (2).

$$\% \text{ Quét gốc tự do DPPH} = 100\% \times (1 - (A_1 - A_{1bi}) / (A_0 - A_{0bi})) \quad (2)$$

$A_1$ : Giá trị độ hấp thụ của mẫu;  $A_{1bi}$ : Giá trị độ hấp thụ mẫu trắng của mẫu;  $A_0$ : Giá trị độ hấp thụ dung môi;  $A_{0bi}$ : Giá trị độ hấp thụ mẫu trắng dung môi.

#### Hoạt tính ức chế tyrosinase

Các dịch chiết quả thể nấm được pha loãng 2 lần trong đệm sodium phosphate 50 mM pH = 6,5. Tyrosinase và L-DOPA được pha trong đệm phosphat với nồng độ tương ứng là 1000 U/mL và 10 mM. Hỗn hợp phản ứng gồm 10  $\mu\text{L}$  dung dịch cao chiết/chất chuẩn, 120  $\mu\text{L}$  dung dịch đệm phosphate, 10  $\mu\text{L}$  tyrosinase 1000 U/mL, được ủ trong đĩa 96 giếng ở nhiệt độ phòng 10 phút, sau đó thêm 40  $\mu\text{L}$  L-DOPA 10 mM, ủ tiếp ở nhiệt độ phòng 10 phút. Mẫu được đem đo quang phổ ở bước sóng 475 nm, kojic acid được sử dụng làm đối chứng dương với nồng độ từ 5 -100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  [13]. Phần trăm ức chế tyrosinase được tính theo công thức (3).

$$\% \text{ Ức chế} = \frac{(A-B) - (C-D)}{(A-B)} \times 100 \quad (3)$$

Trong đó: A: độ hấp thụ của mẫu đối chứng (đệm phosphate, dung môi, enzyme và L-DOPA).

B: độ hấp thụ của mẫu trắng đối chứng (đệm phosphate, dung môi, L-DOPA).

C: độ hấp thụ của mẫu thử (đệm phosphate, cao chiết, enzyme và L-DOPA).

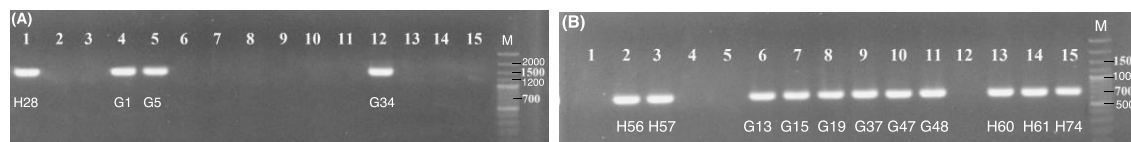
D: độ hấp thụ của mẫu trắng của mẫu thử (đệm phosphate, cao chiết, L-DOPA).

### 2.2.6. Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu được phân tích phương sai đa chiều và so sánh trung bình được thực hiện bằng thử nghiệm Tukey (SPSS 26.0). Sự khác biệt giữa các giá trị trung bình được coi là có ý nghĩa ở giá trị  $p < 0,05$ .

## 3. Kết quả và bàn luận

### 3.1. Kết quả xác định gene quy định kiểu giới tính của các đơn bào tử



**Hình 1.** Kết quả PCR các đơn bào tử với mỗi MAT 1-1-1 (A) và MAT 1-2-1 (B)

(Giếng M: DNA maker kích thước 100 bp; các giếng từ 1-15 là các đơn bào tử nghiên cứu; tên của các đơn bào tử được viết dưới mỗi băng sản phẩm PCR với tên bắt đầu bằng chữ G là các bào tử phân lập từ chủng NB, tên bắt đầu bằng chữ H là bào tử phân lập từ chủng HQ)

Các đơn bào tử được tách chiết DNA và làm khuôn cho phản ứng PCR với cặp môi gene *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1*. Kết quả điện di sản phẩm PCR ở hình 1 cho thấy có 4 bào tử được mang gene *MAT1-1-1* với kích thước băng sản phẩm mong đợi khoảng 1500 bp, trong khi 11 bào tử còn lại mang gene *MAT1-2-1* với kích thước mong đợi khoảng 700 bp.

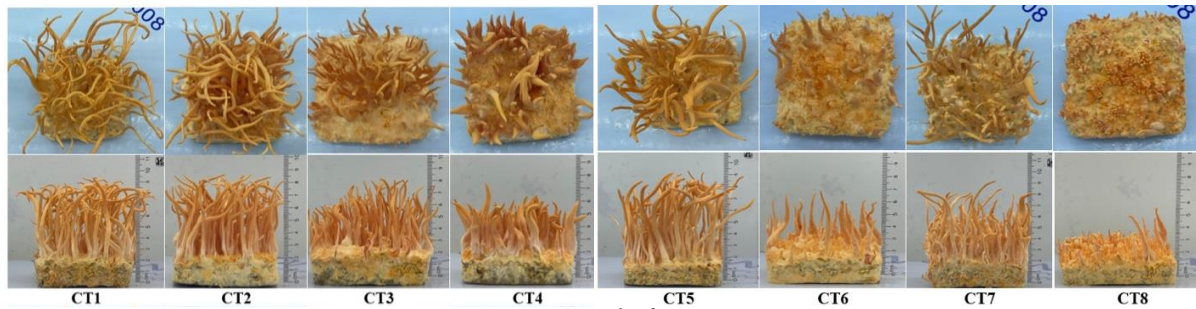
### 3.2. Kết quả đánh giá hình thái và năng suất quả thể nấm của các chủng lai

Hệ sợi nấm của từng đơn bào tử được nuôi riêng rẽ trong môi trường PDB trước khi được kết hợp giữa hệ sợi mang gene *MAT1-1-1* và hệ sợi mang gene *MAT1-2-1* trên môi trường gạo - nhộng. Hai bào tử *MAT1-1-1* (H28 và G34) được kết hợp ngẫu nhiên với bốn bào tử *MAT1-2-1* trong số 11 bào tử. Kết quả đánh giá chiều cao quả thể và năng suất quả thể của 8 phép lai được thể hiện ở bảng 1 và hình 2. Kết quả cho thấy, hình thái quả thể nấm dài và đồng đều hơn ở phép lai CT1, CT2. Các phép lai này cũng có năng suất nổi trội hơn các phép lai còn lại với khối lượng khô/bình tương ứng khoảng 4,4 và 5,0 g/bình. Phép lai CT2 cho năng suất khô (5 g/bình) và tươi (41,33 g/bình) cao nhất trong số 8 phép lai. Phép lai CT4 có năng suất quả thể tươi và khô không tương ứng là 34,6 g/bình và 3,7 g/bình, có hình thái quả thể ngắn và to khác biệt với các phép lai khác.

**Bảng 1.** Đặc điểm hình thái và năng suất quả thể của các chủng lai

Kí hiệu phép lai	Chủng lai <i>MAT1-1-1</i> và <i>MAT1-2-1</i>	Chiều cao (cm)	Khối lượng tươi (g/bình)	Khối lượng khô (g/bình)	Tỉ lệ khối lượng khô/tươi (%)
CT1	H28xG37	6,9-7,8	31,25±3,39 <sup>a</sup>	4,4±0,34 <sup>a</sup>	14,08±1,2 <sup>a</sup>
CT2	H28xG47	5,2-7,1	41,33±3,2 <sup>b</sup>	5,0±0,45 <sup>b</sup>	12,09±1,3 <sup>a</sup>
CT3	H28xH56	4,1-5,5	24,0±2,3 <sup>c</sup>	3,3±0,26 <sup>c</sup>	13,75±1,0 <sup>a</sup>
CT4	H28xH57	2,9-4,5	34,6±3,2 <sup>a</sup>	3,7±0,44 <sup>c,d</sup>	10,69±0,61 <sup>a</sup>
CT5	G34xG37	6,8-7,6	23,5±3,6 <sup>c</sup>	3,9±0,43 <sup>d</sup>	16,59±2,22 <sup>b</sup>
CT6	G34xG47	2,5-4,6	11,8±2,2 <sup>d</sup>	2,27±0,27 <sup>c,e</sup>	19,23±1,18 <sup>b</sup>
CT7	G34xH56	4,5-7,3	24,8±3,12 <sup>c</sup>	3,7±0,58 <sup>c</sup>	14,91±1,33 <sup>a</sup>
CT8	G34xH57	2,5-3,4	3,3±2,0 <sup>e</sup>	0,6±0,45 <sup>f</sup>	18,18±1,2 <sup>b</sup>

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức  $p < 0,05$ .

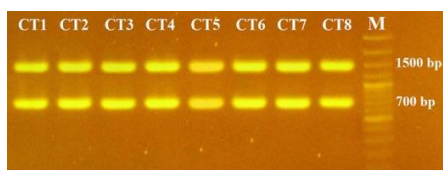


**Hình 2.** Hình thái quả thể nấm của các phép lai

Quả thể của mỗi phép lai được tách chiết DNA và dùng làm khuôn cho phản ứng PCR với cặp môi gene *MAT1-1-1* và cặp môi gene *MAT1-2-1*, sau đó sản phẩm PCR của mỗi chủng lai được kiểm tra đồng thời trên bản gel agarose. Kết quả ở hình 3 cho thấy quả thể của các phép lai đều mang hai gene *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1*.

Có thể quan sát thấy trong số các phép lai thực hiện trong nghiên cứu này, phép lai CT6 và CT8 được coi là không thành công trong việc hình thành quả thể. Kết quả tương tự cũng đã được báo cáo rằng trong số 35 cặp lai giữa các bào tử đơn tính thì chỉ có 23% kết cặp thành công trong việc tạo ra quả thể [6]. Ngoài yếu tố gene quy định giới tính của các đơn bào tử, nguyên nhân của hiện tượng này có thể do các yếu tố khác cần thiết để cảm ứng chu trình sinh sản hữu tính. Sự suy thoái về hình thái quả thể nấm có thể liên quan đến sự biểu hiện của các gene liên quan đến cảm ứng hình thành quả thể và chu trình sinh sản hữu tính [6].





**Hình 3.** Kết quả PCR các gene MAT 1-1-1 (1500 bp) và MAT 1-2-1 (700 bp) của quả thể từ các phép lai được kí hiệu từ CT1 đến CT8

### 3.3. Kết quả xác định thành phần hoá học của dịch chiết quả thể nấm

Hàm lượng cordycepin và adenosine của dịch chiết quả thể nấm các chủng lai được xác định bằng phương pháp HPLC dựa trên đường chuẩn diện tích đỉnh (peak) của các chất chuẩn ở các nồng độ khác nhau. Hàm lượng cordycepin và adenosine được tính cho 1 gram bột quả thể nấm khô. Kết quả ở bảng 2 cho thấy phép lai CT4 cho kết quả nổi bật về hàm lượng các hoạt chất này trong cả dịch chiết nấm và khi xét đến năng suất cho mỗi bình, cao gần gấp hai lần so với hàm lượng tương ứng của phép lai CT1 và CT2.

Kết quả báo cáo của Kang và cộng sự (2017) đánh giá hàm lượng cordycepin của 8 chủng lai đã chứng minh chủng KSP8 cho hàm lượng cordycepin cao nhất. Có lẽ đó là sự tái tổ hợp gene từ sinh sản hữu tính. Sự kết hợp của hai bào tử đơn gây ra hiện tượng hợp nhân và giảm phân kích thích sự tái tổ hợp của gene liên quan đến tổng hợp cordycepin. Do đó, hàm lượng cordycepin trong chủng lai có thể thay đổi so với chủng bố mẹ [6].

Như vậy, có thể thấy được tiềm năng của phương pháp lai hữu tính trong việc tạo ra và chọn lọc được chủng lai mang những đặc điểm, tính trạng mong muốn. Trong nghiên cứu này của chúng tôi, có thể quan sát thấy phép lai CT1 và CT2 có ưu thế hơn về hình thái và năng suất, trong khi CT4 có ưu thế hơn về hàm lượng cordycepin và adenosin. Trong nghiên cứu tiếp theo, những chủng lai này có thể là nguồn chủng giống để thu thập bào tử hữu tính cho các phép lai nhằm cải thiện chất lượng chủng giống.

**Bảng 2.** Hàm lượng và năng suất cordycepin và adenosine của các chủng lai

Phép lai	Adenosine ( $\mu\text{g/g}$ nấm khô)	Năng suất adenosine ( $\mu\text{g/bình}$ )	Cordycepin ( $\mu\text{g/g}$ nấm khô)	Năng suất cordycepin ( $\mu\text{g/bình}$ )
CT1	1207 $\pm$ 8,9 <sup>a</sup>	5310,8 $\pm$ 40,5 <sup>a</sup>	88,0 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	387,2 $\pm$ 10,6 <sup>a</sup>
CT2	1043 $\pm$ 11,7 <sup>a</sup>	5215,0 $\pm$ 33,8 <sup>a</sup>	76,2 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>	381,0 $\pm$ 9,5 <sup>a</sup>
CT3	1140 $\pm$ 10,8 <sup>a</sup>	3762,0 $\pm$ 16,3 <sup>b</sup>	84,0 $\pm$ 0,7 <sup>a</sup>	277,2 $\pm$ 8,0 <sup>b</sup>
CT4	1917 $\pm$ 15,4 <sup>b</sup>	7092,9 $\pm$ 19,9 <sup>c</sup>	187,6 $\pm$ 1,1 <sup>c</sup>	694,1 $\pm$ 11,3 <sup>c</sup>
CT5	892 $\pm$ 9,6 <sup>c</sup>	3478,8 $\pm$ 13,4 <sup>b</sup>	62,8 $\pm$ 0,4 <sup>d</sup>	244,9 $\pm$ 7,1 <sup>b</sup>
CT6	941 $\pm$ 7,3 <sup>c,d</sup>	2136,0 $\pm$ 17,0 <sup>e</sup>	61,3 $\pm$ 0,5 <sup>d</sup>	139,2 $\pm$ 3,5 <sup>c</sup>
CT7	1330 $\pm$ 16,8 <sup>a</sup>	4921,0 $\pm$ 15,4 <sup>a,d</sup>	76,0 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>	281,2 $\pm$ 5,8 <sup>b</sup>
CT8	864 $\pm$ 8,5 <sup>c</sup>	518,4 $\pm$ 6,8 <sup>f</sup>	52,2 $\pm$ 0,6 <sup>e</sup>	31,32 $\pm$ 1,9 <sup>d</sup>

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức  $p < 0,05$ .

Các thành phần hoá học khác bao gồm hàm lượng phenolic tổng số, hàm lượng flavonoid tổng số và hàm lượng glucose của dịch chiết quả thể nấm được thể hiện ở bảng 3. Phép lai CT4 có hàm lượng phenolic tổng số cao nhất trong 8 phép lai đạt 149,3  $\mu\text{g}$  GAE/mL, tiếp sau là phép lai CT1, CT2. Không xác định được hàm lượng flavonoid tổng số ở mẫu dịch chiết quả thể ở các mẫu từ CT2 đến CT7, hai phép lai còn lại có hàm lượng 0,6 và 1,7  $\mu\text{g}$  QE/mL tương ứng với CT1 và CT8 (Bảng 3). Hàm lượng glucose cao nhất và khác biệt ở phép lai CT2, đạt 0,34 g/L, trong khi các phép lai khác đạt khoảng 0,17 - 0,27 g/L.

Kết quả định lượng đường tự do của *C. militaris* cũng được báo cáo bởi Reis và cộng sự (2013). Đường tự do tìm thấy ở *C. militaris* là mannitol (2,01 g/100 g mẫu khô) và trehalose (24,71 g/100 g mẫu khô), hàm lượng đường tổng số là 26,72 g/100 g mẫu khô. Trong nghiên cứu của chúng tôi, hàm lượng glucose của mẫu CT2 được quy đổi tương đương 1,36 g/100 g mẫu khô. Manitol là một trong những hợp chất của *C. militaris* có hoạt tính được lý, có tác dụng lợi

tiêu, chống ho và chống gốc tự do [2], [14]. Trehalose phổ biến trong quả thể nấm chưa trưởng thành và có vai trò là một chất dự trữ được chuyên hóa khi các thể quả sinh bào tử chuyển sang giai đoạn trưởng thành [14].

**Bảng 3.** Hàm lượng phenolic tổng số, flavonoid tổng số và glucose của các phép lai

Phép lai	Hàm lượng phenolic tổng số ( $\mu\text{g GAE/mL}$ )	Hàm lượng flavonoid tổng số ( $\mu\text{g QE/mL}$ )	Hàm lượng glucose (g/L)
CT1	130,2 $\pm$ 1,6 <sup>a</sup>	0,6 $\pm$ 0,02	0,23 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
CT2	127,7 $\pm$ 2,3 <sup>a</sup>	ND	0,34 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>
CT3	129,3 $\pm$ 1,7 <sup>a</sup>	ND	0,17 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup>
CT4	149,3 $\pm$ 1,3 <sup>b</sup>	ND	0,27 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>
CT5	109,3 $\pm$ 1,5 <sup>c</sup>	ND	0,17 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>
CT6	99,3 $\pm$ 0,8 <sup>c</sup>	ND	0,25 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>
CT7	115,6 $\pm$ 1,1 <sup>a,c</sup>	ND	0,17 $\pm$ 0,05 <sup>c</sup>
CT8	104,3 $\pm$ 1,9 <sup>c</sup>	1,7 $\pm$ 0,08	0,19 $\pm$ 0,07 <sup>c</sup>

Ghi chú: ND - không xác định

### 3.4. Kết quả đánh giá hoạt tính sinh học của dịch chiết quả thể nấm

#### 3.4.1. Hoạt tính chống oxi hoá

Hoạt tính chống oxi hoá của các mẫu dịch chiết quả thể các phép lai được thể hiện ở bảng 4, cho thấy phép lai CT4 có khả năng quét gốc tự do tốt hơn các phép lai khác với 30,9%, cao hơn gần gấp 2 lần so với phép lai CT1 và CT2. Kết quả này cũng tương quan thuận với hàm lượng phenolic tổng số cũng như hàm lượng cordycepin và adenosin của phép lai CT4.

**Bảng 4.** Hoạt tính quét gốc tự do DPPH và khả năng ức chế tyrosinase của dịch chiết quả thể nấm các phép lai

Phép lai	Khả năng quét gốc tự do DPPH (%)	Khả năng ức chế tyrosinase (%)
CT1	16,5 $\pm$ 2,3 <sup>a</sup>	41,0 $\pm$ 3,3 <sup>a</sup>
CT2	16,4 $\pm$ 1,5 <sup>a</sup>	59,0 $\pm$ 4,7 <sup>b</sup>
CT3	18,9 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>	60,9 $\pm$ 5,2 <sup>b</sup>
CT4	30,9 $\pm$ 3,2 <sup>b</sup>	48,7 $\pm$ 2,8 <sup>a</sup>
CT5	12,2 $\pm$ 1,7 <sup>c</sup>	51,9 $\pm$ 6,5 <sup>c</sup>
CT6	6,6 $\pm$ 0,5 <sup>d</sup>	39,7 $\pm$ 4,6 <sup>a</sup>
CT7	8,7 $\pm$ 0,8 <sup>d,e</sup>	47,4 $\pm$ 3,5 <sup>a</sup>
CT8	6,6 $\pm$ 0,5 <sup>d</sup>	16,6 $\pm$ 1,4 <sup>d</sup>

Mối tương quan này cũng tương tự như kết quả được báo cáo trước đây bởi Prommaban và cộng sự (2022) giữa hoạt tính chống oxi hoá với hàm lượng phenolic tổng số và hàm lượng adenosine. Hàm lượng adenosine là yếu tố ảnh hưởng mạnh mẽ đến hoạt động ức chế peroxide hóa lipid. Adenosine có thể tương tác với các thụ thể adenosine (A1 và A3AR), khiến các enzyme chống oxi hóa được kích hoạt và dẫn đến giảm peroxide hóa lipid trong tế bào [13], [15]. Hoạt tính chống oxi hóa của *C. militaris* cũng có thể bị ảnh hưởng bởi các hợp chất khác có trong quả thể như các polysaccharide, ergothioneine, carotenoid, hợp chất phenolic [16], [17].

Hoạt tính chống oxi hóa của loài *C. militaris* đã được báo cáo là do các polysaccharide có trong quả thể nấm [16]. Hoạt động chống oxi hóa của loài *C. militaris* có mối tương quan với các hoạt động bảo vệ thần kinh hoặc bảo vệ gan [16]. Các hợp chất carotenoid, chịu trách nhiệm tạo ra màu vàng cam đậm của quả thể loài *C. militaris* gồm  $\beta$ -carotene, lycopene, lutein và zeaxanthin cũng góp phần vào hoạt tính chống oxi hoá của loài *C. militaris* [16].

#### 3.4.2. Hoạt tính ức chế tyrosinase

Kết quả ở bảng 4 cho thấy hoạt tính ức chế tyrosinase của dịch chiết quả thể phép lai CT2 và CT3 cao hơn so với các phép lai khác, tương ứng là 59 và 60,9%. Giá trị này tương đương với hoạt tính ức chế của khoảng 421  $\mu\text{g/mL}$  kojic acid (đối chứng dương). IC<sub>50</sub> (khả năng ức chế

50% hoạt tính tyrosinase) của kojic acid là 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Trong báo cáo của Cha và cộng sự (2013) báo cáo hoạt tính ức chế tyrosinase của dịch chiết loài *C. militaris* (1  $\text{mg}/\text{mL}$ ) là 13,7% [18]. Tyrosinase, một loại enzyme tham gia vào cơ chế hình thành sắc tố đen, được tìm thấy ở động vật có vú, thực vật và vi sinh vật. Tyrosinase cũng thể hiện các hoạt động monophenolase và diphenolase, xúc tác quá trình hydroxyl hóa L-tyrosine thành L-DOPA và quá trình oxy hóa L-DOPA thành dopaquinone, sau đó có thể được polymer hóa theo cách không cần enzyme để tạo ra sắc tố sẫm màu [19]. Trong nghiên cứu đã được báo cáo trước đây, hoạt tính ức chế tyrosinase của chiết xuất từ loài *C. militaris* và *Isaria tenuipes* được phân tích. Kết quả được báo cáo rằng, chiết xuất sợi nấm loài *C. militaris* có hoạt tính ức chế tyrosinase cao hơn chiết xuất từ quả thể *C. militaris*, chiết xuất từ quả thể loài *Isaria tenuipes* và chiết xuất sợi nấm *I. tenuipes*. Hoạt tính ức chế tyrosinase của chiết xuất sợi nấm *C. militaris* lần lượt là  $28,9 \pm 0,6$  và  $23,1 \pm 0,6\%$  khi cơ chất là L-tyrosine và L-DOPA [13].

#### 4. Kết luận

Trong số 8 chủng lai được thiết lập dựa trên gene xác định giới tính, chủng lai CT1 và CT2 có ưu thế về năng suất và hình thái quả thể, trong khi chủng lai CT4 có ưu thế về hàm lượng các hoạt chất cordycepin, adenosin và hàm lượng phenolic tổng số cùng với hoạt tính chống oxy hoá. Chủng lai CT2 có hoạt tính ức chế tyrosinase tốt nhất. Những chủng lai này là những chủng lai tiềm năng cho chiến lược phát triển chủng giống của loài *C. militaris* cho năng suất và chất lượng.

#### Lời cảm ơn

Đề tài được thực hiện với kinh phí từ đề tài mã số I-3-D-6233-1 của Quỹ IFS (International Foundation for Science) Thụy Điển.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] L. Wang *et al.*, "Genetic variation of *Cordyceps militaris* and its allies based on phylogenetic analysis of rDNA ITS sequence data," *Fungal Diversity*, vol. 31, pp. 147-155, 2008.
- [2] S. K. Das *et al.*, "Medicinal uses of the mushroom *Cordyceps militaris*: current state and prospects," *Fitoterapia*, vol. 81, no. 8, pp. 961-968, 2010.
- [3] J. M. Sung *et al.*, "Effect of preservation periods and subcultures on fruiting body formation of *Cordyceps militaris* in vitro," *Mycobiology*, vol. 34, no. 4, pp. 196-199, 2006.
- [4] H. Lou *et al.*, "Advances in research on *Cordyceps militaris* degeneration," *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 103, pp. 7835-7841, 2019.
- [5] J. O. Lee *et al.*, "Stable formation of fruiting body in *Cordyceps bassiana*," *Micobiology*, vol. 35, no. 4, pp. 230-234, 2007.
- [6] B. Shrestha *et al.*, "Bipolar heterothallism, a principal mating system of *C. militaris* in vitro," *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, vol. 9, pp. 440-446, 2004.
- [7] G. Zhang and Y. Liang, "Improvement of fruiting body production in *Cordyceps militaris* by molecular assessment," *Arch Microbiol*, vol. 195, pp. 579-585, 2013.
- [8] N. Kang *et al.*, "Development of High Cordycepin-Producing *Cordyceps militaris* Strains," *Mycobiology*, vol. 45, no. 1, pp. 31-38, 2017.
- [9] H. H. Lee *et al.*, "Characterization of Newly Bred *Cordyceps militaris* Strains for Higher Production of Cordycepin through HPLC and URP-PCR Analysis," *J Microbiol Biotechnol*, vol. 27, no. 7, pp. 1223-1232, 2017.
- [10] D.-O. Kim *et al.*, "Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums," *Agric Food Chem*, vol. 51, no. 22, pp. 6509-6515, 2003.
- [11] L. J. Zhao *et al.*, "Determination of Total Flavonoids Contents and Antioxidant Activity of *Ginkgo biloba* Leaf by Near-Infrared Reflectance Method," *Int J Anal Chem*, vol. 2018, 2018, Art. no. 8195784.
- [12] N. A. Mohammad *et al.*, "Optimization of the antioxidant-rich xanthone extract from mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) pericarp via microwave-assisted extraction," *Heliyon*, vol. 5, no. 10, 2019, Art. no. e02571.



- 
- [13] A. Prommaban *et al.*, "Comparison of chemical profiles, antioxidation, inhibition of skin extracellular matrix degradation, and anti-tyrosinase activity between mycelium and fruiting body of *Cordyceps militaris* and *Isaria tenuipes*," *Pharm Biol*, vol. 60, no. 1, pp. 225-234, 2022.
- [14] F. S. Reis *et al.*, "The methanolic extract of *Cordyceps militaris* (L.) Link fruiting body shows antioxidant, antibacterial, antifungal and antihuman tumor cell lines properties," *Food Chem Toxicol*, vol. 62, pp. 91-98, 2013.
- [15] S. B. Maggirwar *et al.*, "Adenosine acts as an endogenous activator of the cellular antioxidant defense system," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 201, no. 2, pp. 508-515, 1994.
- [16] K. J. Jedrejko, J. Lazur, and B. Muszyn'ska, "Cordyceps militaris: An Overview of Its Chemical Constituents in Relation to Biological Activity," *Foods*, vol. 10, no. 11, 2021, Art. no. 2634.
- [17] H. M. Yu *et al.*, "Comparison of Protective Effects between Cultured *Cordyceps militaris* and Natural *Cordyceps sinensis* against Oxidative Damage," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 54, pp. 3132-3138, 2006.
- [18] J. -Y. Cha and S.-Y. Kim, "Anti-melanogenesis in B16F0 Melanoma Cells by Extract of Fermented *Cordyceps militaris* Containing High Cordycepin," *Journal of Life Science*, vol. 23, no. 12, pp. 1516-1524, 2013.
- [19] H. Cui *et al.*, "Antioxidant and tyrosinase inhibitory activities of seed oils from *Torreya grandis* Fort. ex Lindl.," *Biomed Res Int.*, vol. 2018, 2018, Art. no. 5314320.