XÁC ĐỊNH LOCUS KIỂU GIAO PHỐI Ở NẤM *Cordyceps militaris* BẰNG KỸ THUẬT MULTIPLEX PCR

Nguyễn Minh Lý[1], Võ Bá Duy[1], Đinh Xuân Tú[2*]

[1]Khoa Sinh - Môi trường, Trường Đại học Sư phạm - Đại học Đà Nẵng
[2]Trung tâm Ươm tạo và Hỗ trợ doanh nghiệp khoa học và công nghệ

[*]Tác giả liên hệ: dinhxt@gmail.com

Ngày nhận bài: 01.03.2023 Ngày chấp nhận đăng: 05.10.2023

TÓM TẮT

Trong chọn tạo giống nấm *Cordyceps militaris* bằng phương pháp lai bào tử đơn, việc xác định kiểu gen của locus kiểu giao phối có ý nghĩa quan trọng trong xây dựng sơ đồ lai. Hiện nay, các phản ứng PCR riêng lẻ đã được hoàn thiện để xác định các locus kiểu giao phối MAT1-1, MAT1-2 ở loài nấm này. Nghiên cứu đã được thực hiện với mục tiêu thiết kế các đoạn mồi đặc hiệu cho phản ứng Multiplex PCR để xác định hiệu quả locus kiểu giao phối ở loài với chi chí thấp trong thời gian ngắn. Trình tự các đoạn mồi được xác định dựa trên trình tự của 2 locus kiểu giao phối MAT1-1 (AB194982) và MAT1-2 (AB084257) trên cơ sở dữ liệu của GenBank bằng công cụ Primer-BLAST. Kết quả nghiên cứu cho thấy, phản ứng Multiplex PCR gồm 03 cặp mồi MAT1-1-1-MUL; MAT1-1-2-MUL và MAT1-2-1-MUL đã khuếch đại thành công các trình tự DNA với kích thước 527bp; 323bp và 222bp lượt lượt từ các gen MAT1-1-1, MAT1-1-2, MAT1-2-1. Phản ứng Multiplex có tính đặc hiệu và độ tin cậy cao trong xác định kiểu gen giao phối ở nấm *C. militaris* và ứng dụng trong Chọn giống dựa vào chỉ thị phân tử ở loài nấm *C. militaris*.

Từ khoá: *Cordyceps militaris*, MAT, multiplex PCR, Locus kiểu giao phối.

Identification of the Mating-type Loci of *Cordyceps militaris* by Multiplex PCR

ABSTRACT

In the cross-breeding of Cordyceps militaris using single spores, determining the genotype of the mating type locus is crucial for constructing a cross diagram. Individual PCRs have been conducted to identify the mating type loci MAT1-1 and MAT1-2 in this fungus. The research aimed to design specific primers for Multiplex PCR to efficiently and simply identify mating-type loci in a shorter time. The primer sequences were derived from the sequences of two mating type loci MAT1-1 (AB194982) and MAT1-2 (AB084257) retrieved from the GenBank database using the Primer-BLAST tool. The research results indicate that the Multiplex PCR, comprising three primer pairs MAT1-1-1-MUL, MAT1-1-2-MUL, and MAT1-2-1-MUL, successfully amplified products with sizes of 527bp, 323bp, and 222bp from the MAT1-1-1, MAT1-1-2, and MAT1-2-1 genes, respectively. The Multiplex reaction exhibits high specificity and reliability in determining mating genotypes in *C. militaris*, making it a valuable tool for applications in breeding selection based on molecular markers in *C. militaris*.

Keywords: *Cordyceps militaris*, molecular marker, MAT, multiplex PCR.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trên thế giới đã có hơn 400 loài nấm thuộc chi *Cordyceps* được tìm thấy và nghiên cứu, trong đó đã xác định được 36 loài có khả năng nuôi cấy nhân tạo và sản xuất (Wang, 1995; Sung, 1996; Li & cs., 2006; Shonkor & cs., 2010). Trong đó, *Cordyceps militaris* là loài được nhân giống phổ biến nhất trên quy mô công nghiệp hiện nay do có dược tính cao và thời gian sản xuất ngắn (Li & cs., 2006). Nấm *C. militaris* còn chứa một số dược liệu quan trọng như cordycepin (3'-deoxyadenosine) (Yi & cs., 2014), ergosterol, axit cordycepic, adenosine, polysaccharide (Bi & cs., 2018) và một số dược chất khác. Trong đó, cordycepin là một trong những hoạt chất chính của *C. militaris*, nhiều nghiên cứu đã cho thấy cordycepin có nhiều

hoạt tính sinh học khác nhau, chẳng hạn như tác dụng chống khối u và kháng khuẩn, cũng như khả năng cải thiện hệ miễn dịch (Lee & cs., 2011; Ahn & cs., 2000).

Trong những năm gần đây, kỹ thuật nuôi trồng đã được tập trung nghiên cứu và hoàn thiện. Tuy nhiên, để tiếp tục nâng cao năng suất cũng như hàm lượng các chất, việc chọn tạo giống cũng đã rất được chú trọng. Trong đó, phương pháp chọn tạo giống lai F_1 bằng kỹ thuật lai bào tử đơn đang được ứng dụng rộng rãi và có một số thành tựu trong tạo giống mới hoặc phục hồi các giống đã có (Sung & cs., 2006; Lin & cs., 2021). *C. militaris* là một loại nấm ascomycete dị hợp, có khả năng sinh sản hữu tính được xác định bởi 2 locus kiểu giao phối MAT 1-1 và MAT 1-2 (Zheng & cs., 2011). Locus MAT1-1 có 2 gen là MAT1-1-1, MAT1-1-2, trong khi đó locus MAT1-2 có một gen MAT1-2-1. Để tạo được giống lai cần tiến hành lai tạo bào tử đơn có chứa locus MAT1-1 với bào tử đơn mang locus MAT1-2. Như vậy, việc xác định locus kiểu giao phối sẽ cho phép lựa chọn bào tử phù hợp để lập sơ đồ lai và cũng như để xác định sự hình thành tổ hợp lai F_1.

Để nhận diện được các locus kiểu giao phối có thể sử dụng các chỉ thị phân tử liên kết với ba cặp mồi đặc hiệu (Tan & cs., 2011). Tuy nhiên, cho đến nay việc xác định ba gen MAT1-1-1, MAT1-1-2, MAT1-2-1 cần thực hiện ba phản ứng PCR với các cặp mồi riêng lẻ (Kang & cs., 2017; Lin & cs., 2021). Để rút ngắn thời gian và chi phí xác định các locus kiểu giao phối, trong công bố này đã thực hiện thiết kế phản ứng Multiplex PCR với các cặp mồi đặc hiệu mới.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Trong nghiên cứu đã sử dụng hai trình tự locus kiểu giao phối MAT1-1 (AB194982) và MAT1-2 (AB084257) đã được công bố trên GenBank để làm mạch khuôn thiết kế trình tự mồi.

Để đánh giá hiệu quả các cặp mồi được thiết kế sử dụng hai chủng nấm *C. militaris* được thu thập tại viện Viện Di truyền Nông nghiệp (P1), Viện Nghiên cứu Thảo dược Việt Nam (P2 - chủng lai); hai bào tử đơn S1, S2 được phân lập lần lượt từ các chủng nấm P1 và P2. Trong đó, chủng P1 và bào tử S1 chứa hai gen MAT1-1-1, MAT1-1-2. Chủng P2 mang ba gen MAT1-1-1, MAT1-1-2, MAT1-2-1. Bào tử S2 mang gen MAT1-2-1.

Ngoài ra, cũng sử dụng ba cặp mồi MAT1-1-1; MAT1-1-2 và MAT1-2-1 đã được công bố trong các nghiên cứu trước đây để có cơ sở đánh giá hiệu quả của các cặp mồi mới được thiết kế (Bảng 1).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập bào tử đơn

Quy trình phân lập bào tử đơn của nấm *C. militaris* được tiến hành theo phương pháp Single Spore Extraction (SSE) (Lê Văn Kiêm, 2021). Quả thể *C. militaris* được khử trùng bằng dung dịch HCl 0,3N trong 15 phút. Sau đó, rửa sạch quả thể bằng nước cất vô trùng. Cắt một đoạn 0,5-1cm ở phần đầu quả thể cho vào ống eppendorf 1,5ml. Dùng chày nghiền nhẹ để giải phóng bào tử trong 1ml nước cất vô trùng. Cuối cùng dịch huyền phù được lọc qua màng lọc 20µm và pha loãng ở nồng độ 10^{-2}. Cấy trang dịch huyền phù đã pha loãng trên môi trường PDA và nuôi ở điều kiện 18-22°C, không có ánh sáng. Sau 3-5 ngày tiến hành thu bào tử đơn.

2.2.2. Thiết kế trình tự đoạn mồi cho phản ứng Multiplex PCR

Các cặp mồi mới của phản ứng Multiplex PCR ở *C. militaris* được thiết kế dựa trên hai trình tự vùng locus kiểu giao phối (MAT) bao gồm MAT1-1 (MAT1-1-1; MAT1-1-2) và MAT1-2 (MAT1-2-1). Sử dụng công cụ Primer-BLAST (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) trên NCBI để đưa ra danh sách những cặp mồi phù hợp.

Độ phù hợp, kích thước sản phẩm, tỉ lệ bắt cặp và nhiệt độ bắt cặp, nhiệt độ nóng chảy của các cặp mồi được mô phỏng trên phần mềm FastPCR phiên bản 6.8.24. Phản ứng multiplex PCR *in silico* với các cặp mồi được thiết kế trên trình tự hệ gen đầy đủ của nấm *C. militaris* (chủng ATCC 34164) đã được thực hiện để đánh giá tính đặc hiệu của phản ứng, kích thước sản phẩm tạo thành, tỉ lệ bắt cặp, nhiệt độ bắt cặp và nhiệt độ nóng chảy của đoạn mồi. Ngoài ra,

để đánh giá hiện tượng tự bắt cặp (Self-primer và coss dimer) giữa các đoạn mồi được thực hiện trên công cụ Multiple Primer Analyzer của Thermofisher (https://www.thermofisher.com/vn/en/home/) bằng cách thiết lập giá trị độ nhạy phát hiện dimer ở các mức độ khác nhau được quy đổi từ 1 tới 4. Trong đó, độ nhạy phát hiện tối đa tương ứng với giá trị 1, giá trị 3 là độ nhạy phát hiện tối ưu.

Sau khi thiết kế các cặp mồi, sử dụng công cụ BLASTn (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) trên NCBI để kiểm tra độ đặc hiệu của mồi bằng cách đối sánh cặp mồi thiết kế so với các chủng trên GenBank.

2.2.3. Tách chiết DNA theo phương pháp CTAB (Doyle & Doyle, 1987)

Sợi nấm được nuôi cấy trên môi trường thạch PDA ở 20°C trong 10 ngày, thu nhận sợi nấm bằng cách cạo lớp sinh khối trên bề mặt của đĩa petri và chuyển vào ống eppendorf 1,5ml có chứa cát vô trùng. Tiếp theo, nghiền mẫu thực hiện trong 700µl đệm chiết (Sorbitol 0,35M; Tris-HCl 2M pH 8,0; EDTA 0,5M; NaCl 5M; CTAB 2%; Sakosy 5%) và ủ mẫu ở 65°C trong 60 phút, vortex 15 phút 1 lần.

DNA được tinh sạch bằng 700µl hỗn hợp CI (chloroform/isoamyl alcohol - 24:1) và ly tâm 13.000 vòng/phút trong 10 phút. Tiếp theo, 600µl dịch nổi được chuyển sang ống Eppendorf 1,5ml mới. Kết tủa DNA được tiến hành bằng isopropanol. Kết tủa được rửa hai lần bằng 500µl ethanol 70%. Cuối cùng, kết tủa được hòa loãng trong 50µl nước cất vô trùng và bảo quản ở 4°C.

2.2.4. Phản ứng PCR

Phản ứng PCR được tiến hành trên máy PCR Aeris Thermal Cycler (ESCO, Singapore). Phản ứng PCR với tổng thể tích 20 µl/mẫu gồm những thành phần sau: 1X Master Mix (Công ty TNHH MTV Sinh Hóa Phù Sa), 50-100ng DNA tổng số, 0,5 pmol mồi xuôi, 0,5 pmol mồi ngược. Đối với phản ứng Multiplex PCR, nồng độ mỗi mồi là 0,5 pmol. Phản ứng bắt đầu ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút; sau đó là 30 chu kỳ ở nhiệt độ 95°C trong 30 giây; nhiệt độ 52-62°C trong 30 giây; nhiệt độ 72°C trong 60 giây. Cuối cùng là 72°C trong 10 phút. Sản phẩm PCR được bảo quản ở 4°C.

2.2.5. Điện di gel agarose

Điện di chất lượng DNA tổng số và sản phẩm PCR được thực hiện trên thiết bị thiết bị MultiSUB Midi (Cleaver Scientific- England) với nồng độ gel Agarose 1%; dung dịch đệm TBE 1X; 100V; 100mA trong 70 phút. Kết quả điện di được quan sát thông qua máy soi mẫu (MS UVDI). Trong đó, các mẫu được đối sánh với thang chuẩn DNA (HyperLadder 1kb).

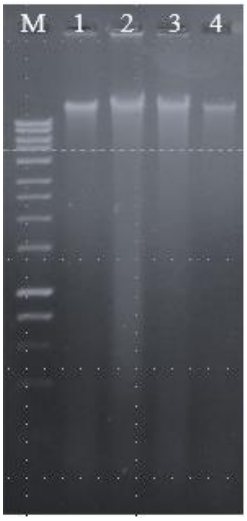
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả tách chiết DNA tổng số

Hai chủng *C. militaris* P1, P2 và hai bào tử đơn S1, S2 được tiến hành tách chiết DNA tổng số bằng phương pháp CTAB (Hình 1). Dựa vào kết quả điện di cho thấy các mẫu đều có DNA tổng số, chất lượng DNA với độ tinh sạch tương đối. Tất cả DNA tổng số đã tách chiết đều đủ điều kiện để sử dụng cho các bước tiếp theo.

Bảng 1. Trình tự ba cặp mồi xác định locus kiểu giao phối MAT1-1-1, MAT1-1-2, MAT 1-2-1 đã được công bố trước đây

Tên mồi	Trình tự (5'-3')	Sản phẩm PCR (bp)	Nguồn
MAT1-1-1F	ATGGAACACAGATCGAGCGACAC	459	Tan & cs. (2011)
MAT1-1-1R	ATATACCTTCGCGATCATTGCCCAG		
MAT1-1-2F	GTCCTGCTGGTCAAAGAAGC	217	Lê Văn Kiêm (2021)
MAT1-1-2R	GACGGGACCATGTCTCAGAT		
MAT1-2-1F	TGTTTTGTCGCGATGGTTCTGG	338	Kang & cs. (2017)
MAT1-2-1R	CCTCTGGAGGTTCTGCATTCCA		



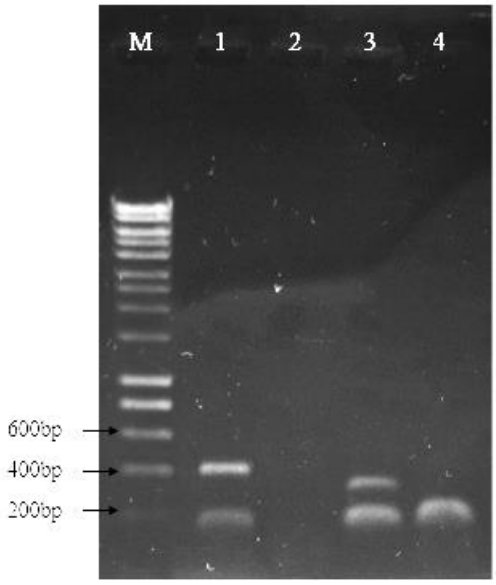
Ghi chú: M: HyperLadder 1kb; 1: Chủng P1; 2: Chủng P2; 3: Bào tử đơn S1; 4: Bào tử đơn S2.

Hình 1. Kết quả tách chiết DNA tổng số

Cross Primer Dimers:

MAT1-1-1F with MAT1-2-1F	MAT1-1-1R with MAT1-1-2F	MAT1-1-1R with MAT1-2-1F
MAT1-1-1F	MAT1-1-1R	MAT1-1-1R
5-atggaacacagatcgagcgacac->	5-atataccttcgcgatcattgcccag->	5-atataccttcgcgatcattgcccag->
<-ggtcttggtagcgctgttttgt-5	<-cgaagaaactggtcgtcctg-5	<-ggtcttggtagcgctgttttgt-5

Hình 2. Kết quả phân tích sự hình thành cross dimer giữa các mồi MAT1-1-1F với MAT1-2-1F; MAT1-1-1R với MAT1-1-2F; MAT1-1-1R với MAT1-2-1F bằng công cụ Multiple Primer Analyzer của Thermofisher với chỉ số độ nhạy là 3



Ghi chú: M: HyperLadder 1kb; 1: MAT1-1-1 + MAT 1-1-2; 2: MAT1-1-1 + MAT1-2-1; 3: MAT1-1-2 + MAT1-2-1; 4: MAT1-1-1 + MAT1-1-2 + MAT1-2-1.

Hình 3. Kết quả thử nghiệm phản ứng Multiplex PCR với 3 cặp mồi đã được công bố trước đây với chủng P2

Bảng 2. Trình tự các đoạn mồi trong Multiplex PCR của chủng *C. militaris* được thiết kế

Tên mồi	Trình tự (5'-3')	%GC	Tm (°C)	Sản phẩm PCR dự kiến (bp)
MAT1-1-1-MUL	TTCCAAGCCTCAATCGACCC	55	60,04	222
	GCCTTTTGTTGCGACTCTGG	55	60,04	
MAT1-1-2-MUL	CGATCGCCCACTGGTACATT	55	60,18	527
	TCGACTAGGATGCCAAAGCG	55	60,18	
MAT1-2-1-N1	GCGAGCCACATTTGTCGAAC	55	60,45	660
	TTGATGCGCCTGGTATCTTGTC	50	61,00	
MAT1-2-1-N2	GCGAGCCACATTTGTCGAAC	55	60,45	312
	TCGAGGAGAGCCTTCTTGATCC	54,55	61,27	
MAT1-2-1-MUL	TAAGAGCAACTGTACGCCCC	55	59,75	353
	GGAAAACCCTGGCGAGAGAA	55	59,96	

3.2. Kết quả khảo sát sự kết hợp giữa các cặp mồi đã được công bố

Việc kết hợp cả ba cặp mồi MAT trong các nghiên cứu trước đây (Bảng 1) cho thấy độ hiệu quả không cao. Dựa vào kết quả phân tích từ công cụ Multiple Primer Analyzer của Thermo Fisher, đã phát hiện được sự hình thành cross dimer trong phản ứng Multiplex PCR giữa các mồi MAT1-1-1F với MAT1-2-1F; MAT1-1-1R với MAT1-1-2F; MAT1-1-1R với MAT1-2-1F với chỉ số độ nhạy là 3 (Hình 1). Điều này có thể dẫn tới việc không hình thành sản phẩm khi kết hợp hai cặp mồi này trong cùng một phản ứng. Kết luận này đã được khẳng định thông qua kết quả thực nghiệm phản ứng multiplex PCR với sự kết hợp giữa các mồi. Phản ứng PCR khi kết hợp giữa hai cặp mồi MAT1-1-1 và MAT1-1-2; hoặc MAT1-1-2 và MAT1-2-1 vẫn cho phép xác định được sự tồn tại đồng thời của hai gen tương ứng. Tuy nhiên, trong phản ứng có sự tham gia của hai cặp mồi MAT1-1-1 và MAT1-2-1; hoặc ba cặp mồi MAT1-1-1, MAT1-1-2 và MAT1-2-1 không quan sát thấy sự xuất hiện của các sản phẩm dự kiến (Hình 2). Như vậy, các cặp mồi đã công bố không thể được sử dụng trong multiplex PCR và cần thiết kế các trình tự mồi mới.

3.3. Kết quả thiết kế mồi cho phản ứng Multiplex PCR

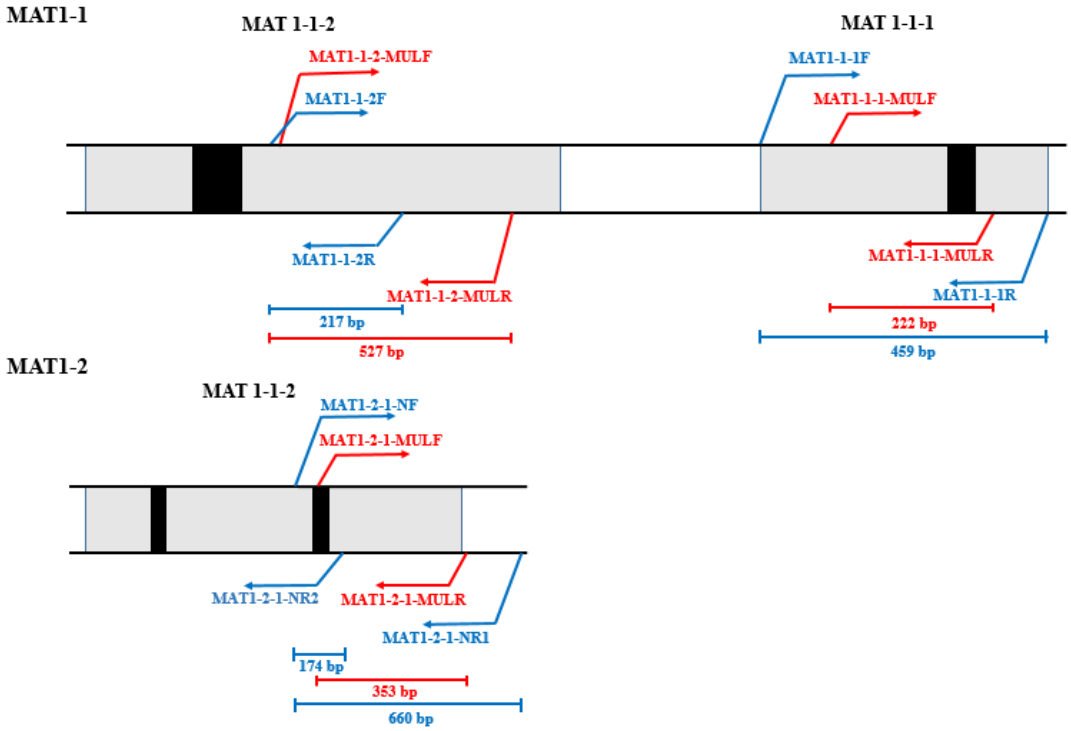
Hai vùng locus kiểu gen giao phối MAT1-1 (MAT1-1-1, MAT1-1-2) và MAT 1-2 (MAT1-2-1) là yếu tố quan trọng cho quá trình sinh sản của nấm, mỗi gen mã hóa cho yếu tố phiên mã riêng. Trong đó MAT1-1 chứa gen mã hóa alpha biểu hiện sự tương tác giữa pheromone và thụ thể pheromone (Zheng & cs., 2012). Gen MAT 1-2 chứa HMG-box là các protein liên kết DNA có vai trò quan trọng trong kiểm soát các gen liên quan đến con đường trao đổi chất cho quá trình sinh sản đặc biệt sinh sản hữu tính và phát triển cơ thể nấm (Böhm & cs., 2015). Dựa trên trình tự của ba đoạn gen MAT1-1-1, MAT1-1-2, MAT1-2-1 đã được sử dụng để tạo các cặp mồi đã công bố trước đây, trong nghiên cứu này đã thiết kế được năm cặp mồi mới dựa vào công cụ Primer BLAST (Bảng 2) (Tan & cs., 2011; Lê Văn Kiêm, 2021; Kang & cs., 2017). Độ dài các cặp mồi dao động từ 20-22bp. Từ kết quả chạy mô phỏng bằng phần mềm FastPCR cho thấy, phần trăm bắt cặp của các đoạn mồi với chủng *C. militaris* là 100%; nhiệt độ nóng chảy (59,75-61,27°C) và %GC (50-55%) nằm trong ngưỡng cho phép, kích thước sản phẩm PCR nằm khoảng 222-660bp. Độ đặc hiệu của các cặp mồi thiết kế sau khi đối sánh trên GenBank cho tỉ lệ tương đồng đạt 100% đối với chủng *C. militaris*.

Ngoài ra, việc kết hợp các cặp mồi đã được nghiên cứu trước đây với cặp mồi thiết kế đã cho ra ba bộ mồi có tiềm năng bao gồm:

Bộ M1: MAT1-1-1; MAT1-1-2 và MAT1-2-1-N1.

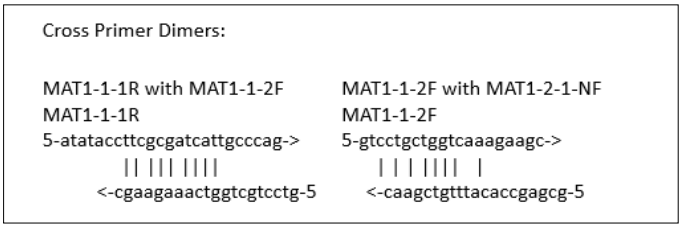
Bộ M2: MAT1-1-1; MAT1-1-2 và MAT1-2-1-N2.

Bộ M3: MAT1-1-1-MUL; MAT1-1-2-MUL và MAT1-2-1-MUL.

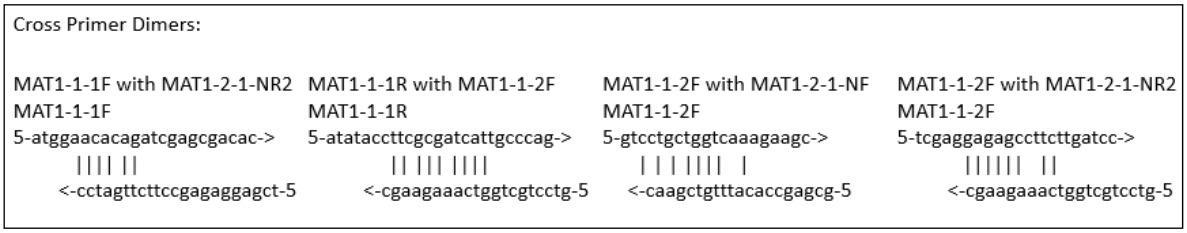


Ghi chú: Các vùng mã hóa của MAT1-1-1; MAT1-1-2 và MAT1-2-1 lần lượt bị cắt bởi một hoặc hai intron (hình chữ nhật màu đen).

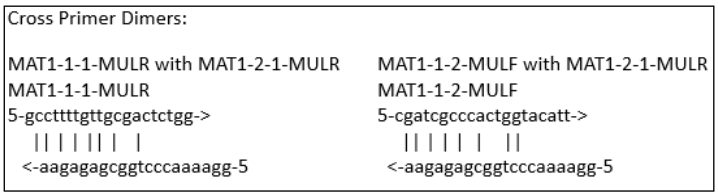
Hình 4. Sơ đồ vị trí của 5 cặp mồi MAT1-1-1-MUL; MAT1-1-2-MUL; MAT1-2-1-N1; MAT1-2-1-N2 và MAT1-2-1-MUL



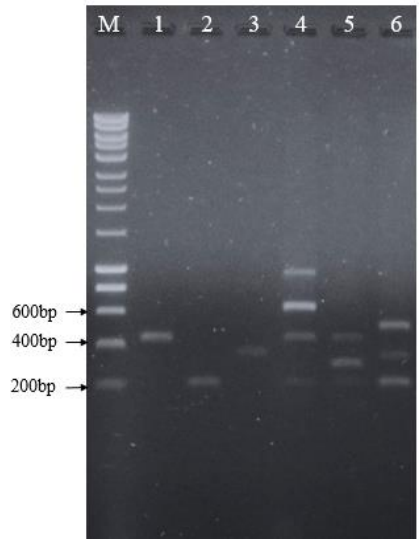
Hình 5. Kết quả phân tích sự hình thành cross dimer giữa các mồi MAT1-1-1R và MAT1-1-2F; MAT1-1-2F và MAT1-2-1-NF bằng công cụ Multiple Primer Analyzer của Thermofisher với chỉ số độ nhạy là 3



Hình 6. Kết quả phân tích sự hình thành cross dimer giữa các mồi MAT1-1-1F và MAT1-2-1-NR2; MAT1-1-1R và MAT1-1-2F; MAT1-1-2F và MAT1-2-1-NF; MAT1-1-2F và MAT1-2-1-NR2 bằng công cụ Multiple Primer Analyzer của Thermofisher với chỉ số độ nhạy là 3



Hình 7. Kết quả phân tích sự hình thành cross dimer giữa các mồi MAT1-1-1-MULR với MAT1-2-1-MULR; MAT1-1-2-MULF với MAT1-2-1-MULR bằng công cụ Multiple Primer Analyzer của Thermofisher với chỉ số độ nhạy là 1



Ghi chú: M: HyperLadder 1kb; 1: MAT1-1-1(1); 2: MAT1-1-2(2); 3: MAT1-2-1(3); 4: M1; 5: M2; 6: M3.

Hình 8. Kết quả phản ứng PCR với 3 bộ mồi M1, M2 và M3 của chủng P2

3.4. Lựa chọn bộ mồi tối ưu cho phản ứng Multiplex PCR

3.4.1. Đánh giá sự hình thành cross dimer giữa các đoạn mồi bằng công cụ Multiple Primer Analyzer

Kết quả phân tích hiện tượng dimer giữa các đoạn mồi bằng công cụ Multiple Primer Analyzer cho thấy không xuất hiện Self-dimer ở cả ba bộ mồi khi giá trị phát hiện độ nhạy là 3. Bên cạnh đó, hiện tượng cross dimer được phát hiện ở mức độ tối ưu là 3 đối với ba bộ mồi M1, M2 và ở mức độ tối đa là 1 đối với bộ mồi M3. Trong đó, sự hình thành cross dimer của bộ M1 trong phản ứng Multiplex PCR giữa các mồi MAT1-1-1R với MAT1-1-2F; MAT1-1-2F với MAT1-2-1-NF (Hình 4). Tuy nhiên lực liên kết giữa mồi MAT1-1-1R với MAT1-1-2F không bền (Hình 2). Đối với bộ mồi M2, có 4 sự hình thành cross dimer trong phản ứng Multiplex PCR giữa các mồi MAT1-1-1F và MAT1-2-1-NR2; MAT1-1-1R và MAT1-1-2F; MAT1-1-2F với MAT1-2-1-NF; MAT1-1-2F và MAT1-2-1-NR2 (Hình 5). Ngoài sự xuất hiện liên kết giữa hai cặp mồi giống M1 thì bộ M2 có thêm liên kết cross dimer giữa các đoạn mồi MAT1-1-1-NR2 với MAT1-1-1F và MAT1-1-2F, cho thấy bộ M2 có khả năng ít hiệu quả hơn so với hai bộ M1 và M3. Còn lại, đối với bộ mồi M3 có sự hình thành cross dimer trong phản ứng Multiplex PCR giữa các mồi MAT1-1-1-MULR với MAT1-2-1-MULR; MAT1-1-2-MULF với MAT1-2-1-MULR (Hình 6). Cho thấy mức độ liên kết yếu giữa các mồi, chỉ phát hiện được khi chỉ số độ nhạy đạt tối đa là 1. Từ các kết quả phân tích bằng công cụ Multiple Primer Analyzer cho thấy bộ mồi M3 có tiềm năng trong phản ứng Multiplex PCR. Tuy nhiên, trong phản ứng PCR thực tế, sự hình thành dimer có thể khác nhau tùy thuộc vào điều kiện PCR.

3.4.2. Kết quả thực nghiệm phản ứng PCR với 3 bộ mồi

Kết quả phản ứng PCR với ba bộ mồi M1; M2 và M3 đều xuất hiện các băng tương ứng với kích thước dự đoán (Hình 7). Cả ba mẫu đối chứng đều xuất hiện băng ở các kích thước tương ứng khoảng 459bp (giếng 1); 217bp (giếng 2) và 338bp (giếng 3) phù hợp với các công bố trước đây (Tan & cs., 2011; Kang & cs., 2017; Lê Văn Kiêm, 2021). Đối với ba bộ mồi thì số lượng băng ở bộ mồi M1 là 4, trong khi đó các bộ M2, M3 chỉ có 3 băng sản phẩm PCR. Điều này cho thấy bộ mồi M1 có độ đặc hiệu chưa cao, xuất hiện 1 băng phụ khoảng 1Kbp.

Còn lại, hai bộ mồi M2 và M3 đều xuất hiện 3 băng, tuy nhiên kết quả của M2 cho thấy khả năng tách băng thấp hơn so với M3, khoảng cách giữa các băng M2 nhỏ, dẫn tới khó quan sát khi chạy điện di với thời gian ngắn. Chính vì lý do đó, bộ mồi M3 được sử dụng để tiến hành chạy tối ưu nhiệt độ phản ứng Multiplex PCR.

3.5. Kết quả tối ưu phản ứng PCR với bộ mồi được lựa chọn

3.5.1. Tối ưu nhiệt độ phản ứng PCR với bộ mồi M3

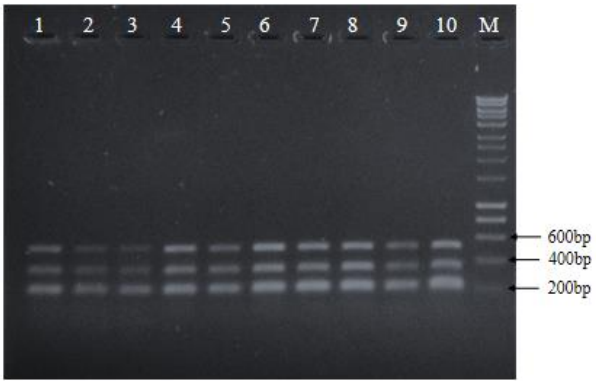
Phản ứng tối ưu nhiệt độ sản phẩm PCR với bộ mồi M3 được thể hiện trong hình 8. Hầu như tất cả các mẫu đều xuất hiện 3 băng kích thước phù hợp với kích thước dự đoán, độ sáng của băng không đồng đều ở các nhiệt độ khác nhau. Trong đó, giếng 1; 2 và 3 thì nồng độ sản phẩm thấp hơn so với các mẫu còn lại. Bên cạnh đó, giếng 6 (57,7°C) cho thấy kích thước và nồng độ sản phẩm ổn định.

3.5.2. Tối ưu nồng độ phản ứng PCR với bộ mồi M3

Phản ứng tối ưu nồng độ sản phẩm PCR với bộ mồi M3 được thể hiện qua hình 9. Với các dải nồng độ khác nhau: 0,25pmol; 0,5pmol; 1pmol; 2pmol; 3pmol và 5pmol. Kết quả cho thấy xuất hiện cả 3 băng ở tất cả các nghiệm thức. Tuy nhiên, ở giếng 5 (3pmol) và 6 (5pmol) có nồng độ sản phẩm thấp hơn so với các mẫu còn lại. Từ giếng 1 đến giếng 4 cho thấy kích thước và nồng độ sản phẩm ổn định.

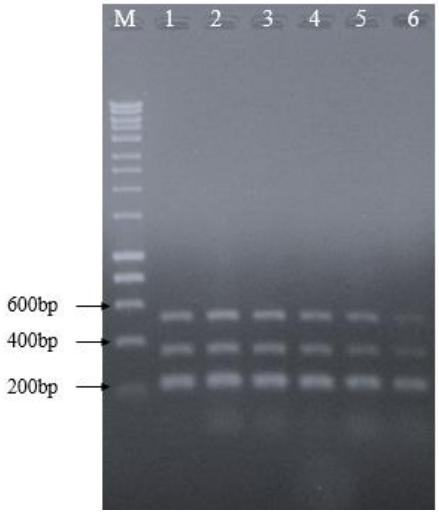
3.5.3. Đánh giá độ hiệu quả của bộ mồi M3 thông qua phản ứng PCR

Hiệu quả và độ ổn định của phản ứng PCR sau khi tối ưu hóa nhiệt độ (57,7°C) và nồng độ đoạn mồi (0,25pmol) được đánh giá với 4 mẫu P1, P2, S1 và S2 (Hình 10). Sau khi đối sánh với bảng 2 cho thấy kết quả thực nghiệm phù hợp ở cả 4 mẫu, kích thước và nồng độ băng rõ ràng. Điều này cho thấy, việc sử dụng các cặp mồi trong phản ứng PCR có hiệu quả và tính ổn định và có thể sử dụng thay thế cho việc sử dụng phản ứng phản ứng PCR với từng cặp mồi riêng lẽ. Điều này sẽ cho phép giảm chi phí và thời gian của bước đánh giá kiểu gen của locus kiểu giao phối ở *C. militaris*. Để xác định locus MAT ở một số loài nấm khác, các phản ứng Multiplex PCR cũng đã được thiết lập với độ chính xác cao (Waalwijk & cs., 2002; Almeida & cs., 2018).



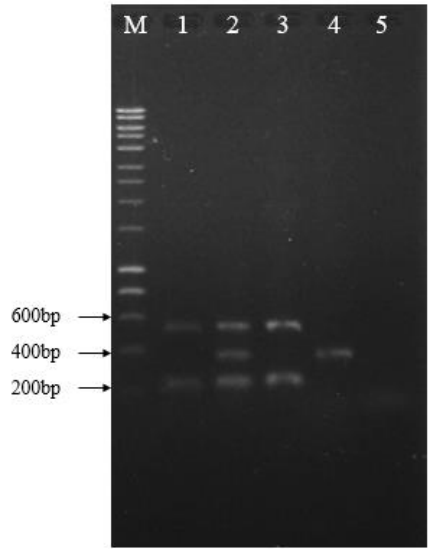
Ghi chú: M: HyperLadder 1kb; 1: 52°C; 2: 52,6°C; 3: 53,5°C; 4: 54,6°C; 5: 56°C; 6: 57,7°C; 7: 59,1°C; 8: 60,2°C; 9: 61,2°C; 10: 62°C.

Hình 9. Sản phẩm chạy Gradient PCR với bộ mồi M3 của chủng P2



Ghi chú: M: HyperLadder 1kb; 1: 0,25 pmol; 2: 0,5 pmol; 3: 1 pmol; 4: 2 pmol; 5: 3 pmol; 6: 5 pmol.

Hình 10. Kết quả phản ứng PCR tối ưu nồng độ với bộ mồi M3 của chủng P2



Ghi chú: M: HyperLadder 1kb; 1: P1; 2: P2; 3: S1; 4: S2; 5: ĐC (-).

Hình 11. Kết quả phản ứng PCR với bộ mồi M3 của 2 chủng nấm và 2 bào tử đơn

4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, việc kết hợp giữa mồi thiết kế và các cặp mồi đã được nghiên cứu trước đây đã cho ra ba bộ mồi: M1; M2 và M3. Trong đó, bộ mồi M3 là hiệu quả và cho ra sản phẩm PCR có kích thước lần lượt khoảng 527bp; 353bp và 222bp. Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR với bộ mồi M3 trong đó: nồng độ primer là 0,25 pmol/µl, nồng độ DNA từ 50-100ng. Phản ứng bắt đầu ở 95°C trong 5 phút; tiếp theo 30 chu kì với 95°C trong 30 giây; 57,7°C trong 30 giây; 72°C trong 60 giây và cuối cùng 72°C trong 7 phút. Sau đó sản phẩm được bảo quản ở 4°C. Do vậy, có thể ứng dụng bộ mồi M3 để xác định gen giới tính (MAT) ở nấm *C. militaris* bằng phản ứng Multiplex PCR, một cách nhanh chóng và tính hiệu quả cao.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu là kết quả từ đề tài Khoa học và Công nghệ cấp thành phố "Áp dụng công nghệ lai bào tử đơn để chọn tạo chủng giống nấm Đông

trùng hạ thảo (*Cordyceps militaris*) cho năng suất và chất lượng cao". Nghiên cứu này được tài trợ bởi Uỷ ban nhân dân thành phố Đà Nẵng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Ahn Y.J., Park S.J., Lee S.G., Shin S.C. & Choi D.H. (2000). Cordycepin: selective growth inhibitor derived from liquid culture of *Cordyceps militaris* against *Clostridium* spp. Journal of agricultural and food chemistry. 48(7): 2744-2748.

Almeida-Silva F., Barbedo L.S., Taylor M.L., Muniz M.D.M., Guimarães A.J. & Zancopé-Oliveira R.M. (2018). Multiplex polymerase chain reaction as an improved method for screening *Histoplasma capsulatum* mating types. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 113.

Bi S., Jing Y., Zhou Q., Hu X., Zhu J., Guo Z., Guo L. Song & Yu R. (2018). Structural elucidation and immunostimulatory activity of a new polysaccharide from *Cordyceps militaris*. Food & Function. 9(1): 279-293.

Böhm J., Dahlmann T.A., Gümüşer H. & Kück U. (2015). A MAT1-2 wild-type strain from *Penicillium chrysogenum*: functional mating-type locus characterization, genome sequencing and mating with an industrial penicillin-producing strain. Molecular microbiology. 95(5): 859-874.

Doyle J.J. & Doyle J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem Bullentin. 19(1): 11-15.

He B.L., You L.R., Ye Z.W., Guo L.Q., Lin J.F., Wei T. & Zheng Q.W. (2018). Construction of novel cold-tolerant strains of volvariella volvacea through protoplast fusion between volvariella volvacea and pleurotus eryngii. Scientia Horticulturae. 230: 161-168.

Kang N., Hyun-Hee L., Inmyoung P. & Young-Su S. (2017). Development of High cordycepin-producing *Cordyceps militaris* Strains. Mycobiology. 45(1): 31-38.

Lê Văn Kiêm (2021). Nghiên cứu tạo giống nấm *Cordyceps militaris* bằng phương pháp lai bào tử đơn. Luận văn Thạc sỹ. Đại học Sư Phạm - Đại học Đà Nẵng.

Lee J.H., Hong S.M., Yun J.Y., Myoung H. & Kim M.J. (2011). Anti-cancer effects of cordycepin on oral squamous cell carcinoma proliferation and apoptosis *in vitro*. Int. J Cancer Ther. 2(2): 224-234.

Li C.R., Nam S.H. & Geng D.G. (2006). Artificial culture of seventeen *Cordyceps* spp. Mycosystema. 25(4): 639-645.

Lin P.J., Ye Z.W., Wei T., Wu J.Y., Zheng Q.W., Chen B.X., Guo L.Q. & Lin J.F. (2021). Cross breeding of novel *Cordyceps militaris* strains with high contents of cordycepin and carotenoid by using MAT genes as selectable markers. Scientia Horticulturae. 290: 110492.

Shonkor K.D.A.S., Shinya F. & Mina M. (2010). Efficient roduction of anticancer agent Cordycepin by repeated batch culture of *Cordyceps militaris* mutant. *In* Proceedings of the World Congress on Engineering and Computer Science. 2.

Sung J. M. (1996). The insects-born fungus of Korea in color. Kyohak Publishing Co. Ltd., Seoul.

Sung J.M., Park Y.J., Lee J.O., Han S.K., Lee W.H., Choi S.K. & Shrestha B. (2006). Selection of Superior Strains of *Cordyceps militaris* with Enhanced Fruiting Body Productivity. Mycobiology. 34(3): 131-137.

Tan Q., Cai T., Wei J., Feng A., Mao W. & Bao D. (2011). Molecular identification of mating type genes in asexual spores of *Cordyceps militaris*. *In* Mushroom biology and mushroom products. Proceedings of the 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products, Arcachon, France, 4-7 October, 2011. 1(Oral presentations): 52-56. Institut National de la Recherche Agronomique (INRA).

Waalwijk C., Mendes O., Verstappen E.C., de Waard M.A. & Kema G.H. (2002). Isolation and characterization of the mating-type idiomorphs from the wheat septoria leaf blotch fungus *Mycosphaerella graminicola*. Fungal Genetics and Biology. 35(3): 277-286.

Wang G.D. (1995). Ecology, cultivation and application of Cordyceps and Cordyceps sinensis. Scientific and Technical Documents, Beijing.

Yi Z.L., Huang W.F., Ren Y., Onac E., Zhou G.F., Peng S., Wang X.J. & Li H.H. (2014). LED lights increase bioactive substances at low energy costs in culturing fruiting bodies of *Cordyceps militaris*. Scientia Horticulturae. 175: 139-143.

Zheng P., Xia Y.L., Xiao G.H., Xiong C.H., Hu X., Zhang S.W., Zheng H.J., Huang Y., Zhou Y. & Wang S.Y. (2011). Genome sequence of the insect pathogenic fungus *Cordyceps militaris*, a valued traditional Chinese medicine. Genome biology. 12: 1-22.