

МИКРОБИОЛОГИЯ, МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

Оригинальная научная статья
 УДК 582.282.31: 577.15(597)
<https://doi.org/10.26897/2949-4710-2023-3-78-84>



Морфологические и генетические характеристики штаммов *Cordyceps militaris* во Вьетнаме

Нгуен Минь Ли¹, Ле Хуин Тхи Зьем Шьонг¹, Алексей Александрович Миронов²

¹ Данангский университет науки и образования, Да Нанг, Вьетнам

² Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева; Москва, Россия

Автор, ответственный за переписку: Алексей Александрович Миронов; e-mail: a.mironov@rgau-msha.ru

Аннотация. Кордицепс (*Cordyceps militaris*) является ценной сельскохозяйственной лекарственной культурой во многих странах. В последние годы этот гриб становится все более популярным во Вьетнаме. В исследованиях представлены результаты оценки разнообразия 8 коммерческих штаммов кордицепса, собранных в разных провинциях Вьетнама. Были изучены морфологические признаки (цвет, длина, ширина) и особенности поверхности плодовых тел гриба. Для генетической оценки использованы молекулярные маркеры двух генов локуса MAT1-1 (MAT1-1-1, MAT1-1-2) и одного гена локуса MAT1-2 (MAT1-2-1). Результаты анализа показали, что все штаммы были разнообразными по морфологическим характеристикам. 7 штаммов P1, P3, P4, P5, P6, P7, P8 имели только один локус типа спаривания MAT1-1. Только один штамм P2 содержал одновременно два локуса: MAT1-1 и MAT1-2. Этот результат показывает разнообразие штаммов кордицепса во Вьетнаме и поддерживает их отбор для создания новых штаммов путем половой гибридизации.

Ключевые слова: генетическое разнообразие, кордицепс, локус типа спаривания, морфология, молекулярные маркеры.

Для цитирования: Нгуен Минь Л., Ле Хуин Тхи Зьем Ш., Миронов А.А. Морфологические и генетические характеристики штаммов *Cordyceps militaris* во Вьетнаме // Тимирязевский биологический журнал. – 2023. – № 3. – С. 78-84. <https://doi.org/10.26897/2949-4710-2023-3-78-84>

© Нгуен М.Л., Ле Хуин Тхи Зьем Ш., Миронов А.А., 2023

MICROBIOLOGY, MOLECULAR BIOLOGY

Original article
<https://doi.org/10.26897/2949-4710-2023-3-78-84>



Morphological and Genetic Characterization of *Cordyceps militaris* Strains in Vietnam

Ly Minh Nguyen¹, Suong Le Huynh Thi Ziem¹, Aleksey A. Mironov²

¹ University of Da Nang – University of Science and Education, Da Nang, Vietnam

² Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia

Corresponding author: Aleksey A. Mironov; a.mironov@rgau-msha.ru

Abstract. *Cordyceps (Cordyceps militaris)* is a valuable agricultural medicinal crop in many countries. In recent years, this mushroom has become increasingly popular in Vietnam. This study presents the results of a diversity assessment of eight commercial *Cordyceps* strains collected from different provinces in Vietnam. Morphological characteristics such as color, length, width, and surface features of the mushroom fruiting bodies were studied. Molecular markers of two genes of the MAT1-1 locus (MAT1-1-1, MAT1-1-2) and one gene of the MAT1-2 locus (MAT1-2-1) were used for genetic evaluation. The results of the analysis showed that all the strains were diverse in their morphological characteristics. Seven strains P1, P3, P4, P5, P6, P7, P8 had only one MAT1-1 mating type locus. Only one strain P2 contained two MAT1-1 and MAT1-2 loci simultaneously. This result shows the diversity of *Cordyceps* strains in Vietnam and supports their selection to create new strains through sexual hybridization.

Key words: genetic diversity, *Cordyceps*, mating type locus, morphology, molecular marker

For citation: Nguyen M.L., Le Huynh Thi Ziem S., Mironov A.A. Morphological and Genetic Characterization of *Cordyceps militaris* Strains in Vietnam. Timiryazev Biological Journal. 2023;3:78-84. (In Rus.) <https://doi.org/10.26897/2949-4710-2023-3-78-84>

© Nguyen M.L., Le Huynh Thi Ziem S., Mironov A.A., 2023

Введение

Кордицепс (*Cordyceps militaris*) – ценный лекарственный гриб, выращивание которого достаточно распространено во многих странах мира. Ввиду высокой экономической ценности этого гриба во Вьетнаме в последние годы его активно изучают, проводят оптимизацию технологий культивирования и производства продуктов его переработки [1]. Штаммы кордицепса на вьетнамском рынке сегодня весьма разнообразны по происхождению, что ведет к разнообразию фенотипов. Кроме того, морфология *C. militaris* легко меняется в зависимости от условий выращивания. Большинство штаммов кордицепса, производимых во Вьетнаме, завезено из зарубежных стран: например, из Китая, Кореи, Японии. Сбор и оценка разнообразия генетических ресурсов культуры *C. militaris* являются важными этапами его селекции. Между тем описание и оценка генетического родства штаммов кордицепса, распространенных в производстве, все еще очень ограничены.

Цель исследований. Данное исследование штаммов *C. militaris* было сосредоточено на оценке морфологических характеристик их плодовых тел, поиске локусов типа спаривания (MAT) и изучении генетического разнообразия с помощью молекулярных маркеров.

Методика исследований

Было изучено 8 штаммов *C. militaris*, отобранных в виде свежих плодовых тел в коммерческих организациях по культивированию этого гриба в разных провинциях Вьетнама в 2022 г. (табл. 1). После сбора были проведены изоляция штаммов и их культивирование на среде для развития плодовых тел, содержащей 40 г коричневого риса и 100 г/л куколки, 30 г/л сои, 5 г/л пептона, 30 г/л глюкозы, 1,0 г/л K₂HPO₄, 1,0 г/л MgSO₄. Каждый эксперимент проводился по 3 повторности.

Таблица 1

Список собранных штаммов *C. militaris*

№	Обозначение штамма	Место сбора	№	Обозначение штамма	Место сбора
1	P1	Ханой	5	P5	Ханой
2	P2	Ханой	6	P6	Контум
3	P3	Ханой	7	P7	Контум
4	P4	Хошиминь	8	P8	Ханой

Table 1

List of collected *C. militaris* strains

No.	Strain designation	Collection site	No.	Strain designation	Collection site
1	P1	Hanoi	5	P5	Hanoi
2	P2	Hanoi	6	P6	Kontum
3	P3	Hanoi	7	P7	Kontum
4	P4	Ho Chi Minh	8	P8	Hanoi

Генетические исследования проводили в Лаборатории клеточной биологии в Данангском университете науки и образования. Для определения генов типов спаривания MAT1-1-1, MAT1-1-2 и MAT1-2-1 использовали 6 пар праймеров (табл. 2). Праймеры MAT1-1-2-F, MAT1-1-2-R, MAT1-2-1-F были разработаны на основе сиквенсов AB084257.1, AB194982.1 с помощью программы Primer-BLAST¹.

¹ Режим доступа к программе: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>.

Список праймеров, используемых для амплификации генов спаривания

нп	Название праймеров	Последовательность (5'-3')	Литература
1	MAT1-1-1-F	ATGGAACACAGATCGAGCGACAC	[2]
2	MAT1-1-1-R	ATATACCTTCGCGATCATTGCCAG	[2]
3	MAT1-1-2-F	GTCCTGCTGGTCAAAGAAGC	Авторы
4	MAT1-1-2-R	GACGGGACCATGTCTCAGAT	Авторы
5	MAT1-2-1-F	GCGAGCCACATTTGTCTGAAC	Авторы
6	MAT1-2-1-R	CCTCTGGAGGTTCTGCATTCCA	[2]

Table 2

List of primers used for amplification of mating type genes

No.	Primer	Sequence (5'-3')	Reference
1	MAT1-1-1-F	ATGGAACACAGATCGAGCGACAC	[2]
2	MAT1-1-1-R	ATATACCTTCGCGATCATTGCCAG	[2]
3	MAT1-1-2-F	GTCCTGCTGGTCAAAGAAGC	Authors
4	MAT1-1-2-R	GACGGGACCATGTCTCAGAT	Authors
5	MAT1-2-1-F	GCGAGCCACATTTGTCTGAAC	Authors
6	MAT1-2-1-R	CCTCTGGAGGTTCTGCATTCCA	[2]

Оценка морфологических характеристик плодовых тел образцов произведена по цвету, длине (см), ширине (мм) и особенностям поверхности плодовых тел.

Выделение ДНК проводили по Doyle и Doyle (1987) с некоторыми модификациями [3]. ПЦР-реакцию проводили на ПЦР-машине Aeris Thermal Cycler (ESCO, Сингапур). Реакционная смесь объемом 20 мкл включала в себя: 1X Master Mix (ООО Phu Sa Biochemistry); 50-100 нг тотальной ДНК; 1 пкмоль праймера. Реакция начиналась при температуре 95°C в течение 5 мин, затем следовали 35 циклов (денатурация 30 с при 95°C, отжиг 30 с при 52-62°C, синтез 60 с при 72°C). Заканчивалась реакция при температуре 72°C в течение 10 мин. Продукты ПЦР хранили при 4°C.

Продукты ПЦР подвергали электрофорезу (MultiSUB Midi, Cleaver Scientific, Англия) в 1%-ном агарозном геле, 1X буфер TBE, 100В, 100 мА в течение 90 мин. Результат электрофореза анализировали с помощью программного обеспечения GELANALYZER версии 19.1.

Результаты анализа обработаны методами биологической статистики в программах MS-Excel-2013 и R с достоверностью 95%.

Результаты и их обсуждение

Морфологическая характеристика штаммов *C. militaris*. Оцениваемые штаммы грибов имели разные фенотипические характеристики (табл. 3, 4, рис. 1). Штамм P3 имел наибольший размер плодового тела (длину 7,16±0,41 см и диаметр 3,86±0,13 см), но плодовое тело было неравномерно развито и имело шипы на верхушке. Штамм P1 имел самую высокую биомассу в свежем виде (включая общую массу стромы и массу субстрата), а также большую длину и ширину, но морфологические характеристики его плодового тела имели множество вариаций. Штамм P5 показал наименее привлекательные для использования морфологические показатели: самую светлую окраску плодового тела, деформированное и неравномерно развитое плодовое тело. Штамм P2 оказался перспективным с высокими значениями оценочных критериев и хорошо развитым плодовым телом. Кроме того, P2 был единственным, у которого на плодовом теле обнаружены перитеции, характерные только для штаммов *C. militaris* с комбинацией обоих локусов типа спаривания MAT1-1 и MAT1-2-1.

Размеры и масса плодовых тел изученных штаммов *C. militaris*

Штамм	Длина, см	Ширина, мм	Масса плодовых тел, г	Масса субстрата, г
P1	6,14±0,56	3,9±0,22	45,21	63,39
P2	6,14±0,74	3,96±1,42	33,6	57,74
P3	7,16±0,41	3,86±0,13	39,95	56,69
P4	5,98±0,56	3,56±0,34	36,4	50,54
P5	4,56±0,35	3,02±0,11	28,44	48,92
P6	6,06±0,39	3,15±0,35	32,65	59,58
P7	6,48±0,52	3,11±0,13	39,98	52,43
P8	5,68±0,39	2,8±0,4	33,421	63,019

Table 3

Size and weight of fruiting bodies of the studied strains of *C. militaris*

Strain	Length (cm)	Width (mm)	Fruiting body weight (g)	Substrate weight (g)
P1	6.14±0.56	3.9±0.22	45.21	63.39
P2	6.14±0.74	3.96±1.42	33.6	57.74
P3	7.16±0.41	3.86±0.13	39.95	56.69
P4	5.98±0.56	3.56±0.34	36.4	50.54
P5	4.56±0.35	3.02±0.11	28.44	48.92
P6	6.06±0.39	3.15±0.35	32.65	59.58
P7	6.48±0.52	3.11±0.13	39.98	52.43
P8	5.68±0.39	2.8±0.4	33.421	63.019

Определение генотипов локусов типа спаривания собранных штаммов. Локусы MAT играют важную роль в формировании плодовых тел *C. militaris* [4, 5]. В ходе исследований было проведено определение генотипов локуса типа спаривания собранных штаммов *C. militaris* (рис. 2).

Результаты показали, что все 8 исследованных штаммов содержали локус MAT1-1 включая два гена MAT1-1-1 и MAT1-1-2. Из них только штамм P2 – лучший по морфологическим характеристикам – имел локус MAT1-2. При этом не выявлены штаммы, несущие только локус MAT1-2.

Определение и сравнение активных ингредиентов кордицепина и аденозина в плодовых телах с перитециями и без них показали, что процесс размножения гриба требует значительного количества ресурсов гриба, тем самым снижая его качество [5]. Lee и др. (2007) сообщили, что все штаммы, у которых не развились нормальные плодовые тела, содержали только один локус MAT1-1, в то время как все штаммы с нормальными плодовыми телами имели два локуса MAT1-1 и MAT1-2 [2]. Кроме того, генотипирование деградировавших штаммов *C. militaris* показало, что они содержат полностью делетированную область MAT1-2-1. Программы селекции на основе полового размножения, осуществляемые путем скрещивания мицелия спор идиоморфов MAT1-1 и MAT1-2, позволили получить штаммы с высоким содержанием и выходом кордицепина [6-8].

Морфологическая характеристика плодовых тел изученных штаммов *C. militaris*

Штамм	Цвет плодовых тел	Морфологическая характеристика стромы	Локус типа спаривания
P1	Ярко-оранжевый	Стромы длинные, различаются по размеру и форме, имеют увеличенные верхушки. Некоторые стромы имеют шипы, прикрепленные к верхушке	MAT1-1-1, MAT1-1-2
P2	Оранжевый	Стромы длинные, шероховатые, однородные по размеру и форме. Строма имеет перитеции	MAT1-1-1, MAT1-1-2, MAT1-2-1
P3	Ярко-оранжевый	Стромы длинные, различаются по размеру и форме. Верхушка стромы увеличена. Некоторые стромы имеют шипы	MAT1-1-1, MAT1-1-2
P4	Оранжево-желтый	Стромы длинные, различаются по размеру и форме. Верхушка крупнее и более круглая, чем тело	MAT1-1-1, MAT1-1-2
P5	Светло-оранжевый	Стромы тонкие и короткие, различаются по размеру, форме и плотности распределения на поверхности субстрата. Многие стромы разветвлены и деформированы	MAT1-1-1, MAT1-1-2
P6	Ярко-оранжевый	Стромы длинные, различаются по размеру и форме. Верхушка стромы увеличена. Некоторые стромы имеют шипы. Тела имеют трещины	MAT1-1-1, MAT1-1-2
P7	Ярко-оранжевый	Стромы длинные, различаются по размеру и форме. Верхушка стромы увеличена. Некоторые стромы имеют шипы. Тела имеют трещины	MAT1-1-1, MAT1-1-2

Table 4

Morphological characterisation of the fruiting bodies of the studied strains of *C. militaris*

Штамм	Цвет плодовых тел	Морфологическая характеристика стромы	Локус типа спаривания
P1	Bright orange	Stromata are long, vary in size and shape, and have enlarged apices. Some stromata have spines attached to the apex	MAT1-1-1, MAT1-1-2
P2	Orange	Stromata are long, rough, homogeneous in size and shape. The stroma has perithecia	MAT1-1-1, MAT1-1-2, MAT1-2-1
P3	Bright orange	Stromata are long, vary in size and shape. The apex of the stroma is enlarged. Some stromata have spines	MAT1-1-1, MAT1-1-2
P4	Orange-yellow	Stromata are long, vary in size and shape. The apex is larger and rounder than the body	MAT1-1-1, MAT1-1-2
P5	Light orange	Stromata are thin and short, vary in size, shape and density of distribution on the surface of substrates. Many stromata are branched and deformed	MAT1-1-1, MAT1-1-2
P6	Bright orange	Stromata are long, vary in size and shape. The apex of the stroma is enlarged. Some stromata have spines. The bodies are fissured	MAT1-1-1, MAT1-1-2
P7	Bright orange	Stromata are long, vary in size and shape. The apex of the stroma is enlarged. Some stromata have spines. The bodies are fissured	MAT1-1-1, MAT1-1-2
P8	Bright orange	Stromata are thin, long and uniform in size and shape. The apex is larger and rounder than the body	MAT1-1-1, MAT1-1-2

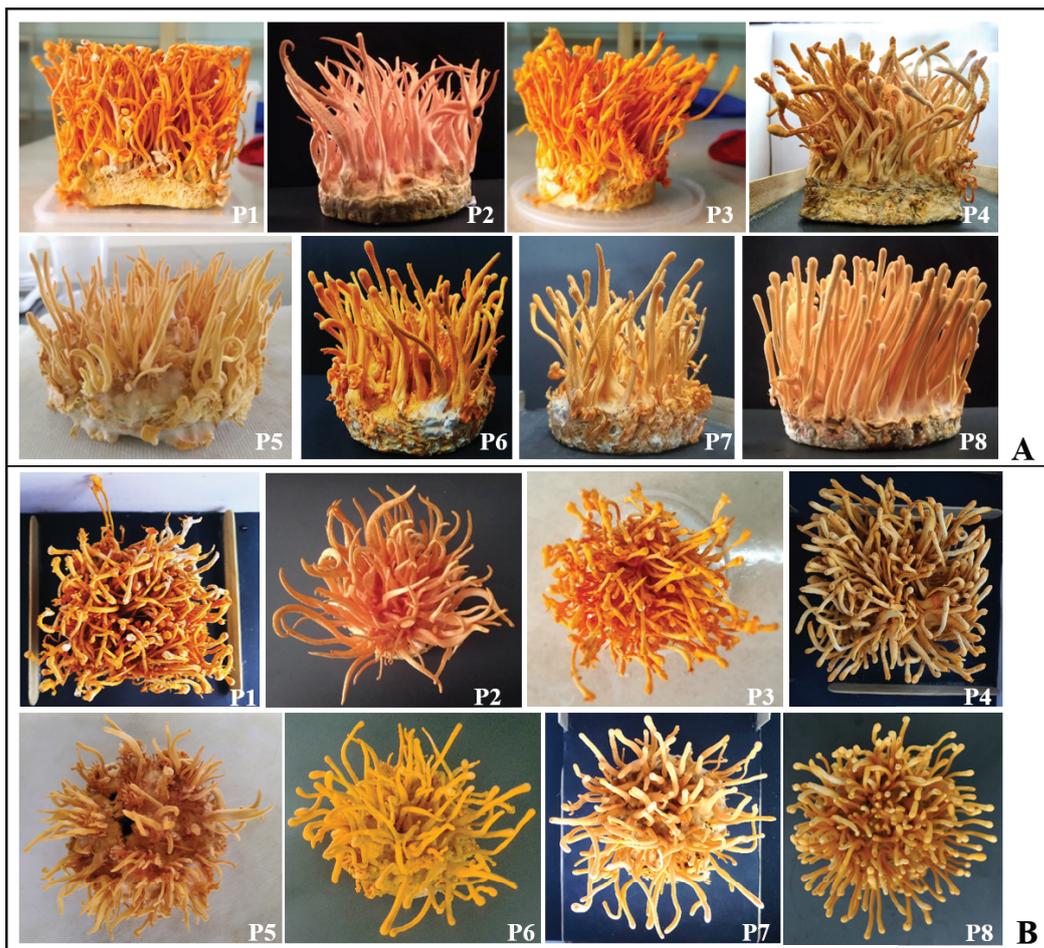


Рис. 1. Морфология собранных штаммов *C. militaris* P1-P8:
 А – вид сбоку; В – вид сверху

Fig. 1. Morphology of collected strains of *C. militaris* P1-P8.
 A – lateral view, B – top view

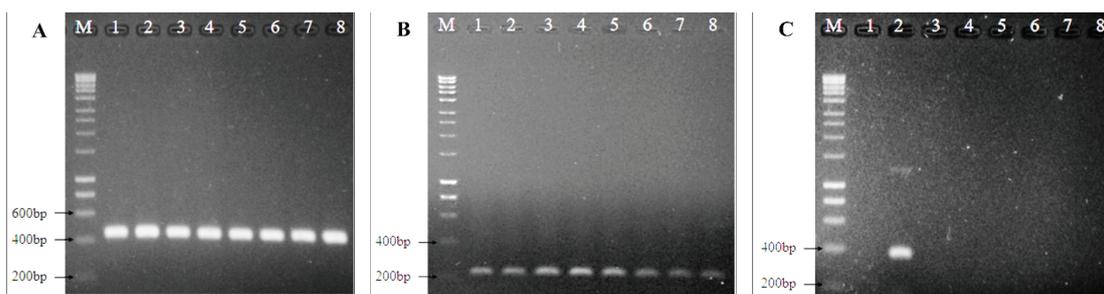


Рис. 2. Результат анализа наличия локусов MAT у собранных штаммов *C. militaris* P1-P8:
 А – праймеры MAT1-1-1-F, MAT1-1-1-R; В – праймеры MAT1-1-2-F, MAT1-1-2-R;
 С – праймеры MAT1-2-1-F, MAT1-2-1-R. 1- P1, 2- P2, 3- P3, 4- P4, 5- P5, 6- P6, 7- P7, 8- P8; M – Ladder

Fig. 2. Results of analysis of MAT loci presence in the collected *C. militaris* P1-P8 strains.
 А – primers MAT1-1-1-F, MAT1-1-1-R, В – primers MAT1-1-2-F, MAT1-1-2-R,
 С – primers MAT1-2-1-F, MAT1-2-1-R. 1- P1, 2- P2, 3- P3, 4- P4, 5- P5, 6- P6, 7- P7, 8- P8, M – Ladder

Выводы

На основании морфологических критериев оценки выявлено, что большинство полученных штаммов показало сходную морфологию с оранжевой стромой, удлиненным телом и увеличенной головкой, кроме штамма P5 с короткой стромой и штамма P2 с заостренным кончиком стромы и перитециями. Результаты типов спаривания штаммов показали, что только штамм P2 имел присутствие локусов – как MAT1-1, так и MAT1-2, в то время как остальные штаммы имели только MAT1-1. Результаты исследований способствуют лучшему пониманию морфологического и генетического разнообразия штаммов кордицепса во Вьетнаме.

Список источников

1. Tran T.T., Le V.V. Study of suitable media for the fruiting body of medicinal mushroom *Cordyceps militaris* on host. Can Tho University Journal of Science. 2020;56(5):125-134. <https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2020.121>
2. Lee H.H., Kang N., Park I., et al. Characterization of Newly Bred *Cordyceps militaris* Strains for Higher Production of Cordycepin through HPLC and URP-PCR Analysis. J Microbiol Biotechnol. 2017;27(7):1223-1232. <https://doi.org/10.4014/jmb.1701.01043>
3. Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem. Bull. 1987;19(1):11-15.
4. Zheng P. et al. Genome sequence of the insect pathogenic fungus *Cordyceps militaris*, a valued traditional Chinese medicine. Genome biology. 2012;12:1-22. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-11-r116>
5. Lu Y., Xia Y., Luo F., et al. Functional convergence and divergence of mating-type genes fulfilling in *Cordyceps militaris*. Fungal Genetics and Biology. 2016;88:35-43. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2016.01.013>
6. Zhang G., Liang Y. Improvement of fruiting body production in *Cordyceps militaris* by molecular assessment. Archives of microbiology. 2013;195:579-585. <https://doi.org/10.1007/s00203-013-0904-8>
7. Kang N., Lee H.H., Park I., Seo Y.S. Development of high cordycepin-producing *Cordyceps militaris* strains. Mycobiology. 2017;45(1):31-38.
8. Lin P.J. et al. Cross breeding of novel *Cordyceps militaris* strains with high contents of cordycepin and carotenoid by using MAT genes as selectable markers. Scientia Horticulturae. 2021;290:110492. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110492>

Сведения об авторах

Ли Минь Нгуен, преподаватель, декан факультета биологии и науки об окружающей среде, Ph.D., канд. с.-х. наук, Данангский университет педагогики и науки; 459, Ton Duc Thang st., Дананг, Вьетнам; e-mail: nmly@ued.udn.vn, orcid: 0000-0002-0652-891X

Ле Хуин Тхи Зьем Шыонг, студент факультета биологии и науки об окружающей среде, Данангский университет педагогики и науки; 459, Ton Duc Thang st., Дананг, Вьетнам; e-mail: lehuynhsuong1999@gmail.com

Алексей Александрович Миронов, канд. с.-х. наук, доцент, доцент кафедры ботаники, селекции и семеноводства садовых растений, Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева; 127434, Россия, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; e-mail: a.mironov@rgau-msha.ru; 0000-0002-0297-500X

Статья поступила в редакцию 24.05.2023
Одобрена после рецензирования 09.10.2023
Принята к публикации 17.10.2023

References

1. Tran T.T., Le V.V. Study of suitable media for the fruiting body of medicinal mushroom *Cordyceps militaris* on host. Can Tho University Journal of Science. 2020;56(5):125-134. <https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2020.121>
2. Lee H.H., Kang N., Park I., et al. Characterization of Newly Bred *Cordyceps militaris* Strains for Higher Production of Cordycepin through HPLC and URP-PCR Analysis. J Microbiol Biotechnol. 2017;27(7):1223-1232. <https://doi.org/10.4014/jmb.1701.01043>
3. Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem. Bull. 1987;19(1):11-15.
4. Zheng P. et al. Genome sequence of the insect pathogenic fungus *Cordyceps militaris*, a valued traditional Chinese medicine. Genome biology. 2012;12:1-22. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-11-r116>
5. Lu Y., Xia Y., Luo F., et al. Functional convergence and divergence of mating-type genes fulfilling in *Cordyceps militaris*. Fungal Genetics and Biology. 2016;88:35-43. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2016.01.013>
6. Zhang G., Liang Y. Improvement of fruiting body production in *Cordyceps militaris* by molecular assessment. Archives of microbiology. 2013;195:579-585. <https://doi.org/10.1007/s00203-013-0904-8>
7. Kang N., Lee H.H., Park I., Seo Y.S. Development of high cordycepin-producing *Cordyceps militaris* strains. Mycobiology. 2017;45(1):31-38.
8. Lin P.J. et al. Cross breeding of novel *Cordyceps militaris* strains with high contents of cordycepin and carotenoid by using MAT genes as selectable markers. Scientia Horticulturae. 2021;290:110492. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110492>

Information about the authors

Ly Minh Nguyen, преподаватель, декан of Department of Biotechnology, Faculty of Biology & Environmental Science, Ph.D., кандидат с.-х. наук, The University of Da Nang – University of Science and Education (459, Ton Duc Thang Str., Da Nang, Vietnam); E-mail: nmly@ued.udn.vn, orcid: 0000-0002-0652-891X

Suong Le Huynh Thi Ziem, студент факультета биологии и науки об окружающей среде, Данангский университет педагогики и науки; 459, Ton Duc Thang st., Дананг, Вьетнам; e-mail: lehuynhsuong1999@gmail.com

Aleksey A. Mironov, кандидат с.-х. наук, доцент, доцент кафедры ботаники, селекции и семеноводства садовых растений, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (49, Timiryazevskaya Str., Moscow, 127434, Russian Federation); E-mail: a.mironov@rgau-msha.ru, 0000-0002-0297-500X

The article was submitted to the editorial office 24 May 2023
Approved after reviewing 09 Oct 2023
Accepted for publication 17 Oct 2023