

PHÂN BỐ NẤM ĐÔNG TRÙNG HẠ THẢO *ISARIA TENUIPES* (PECK.) SAMSON Ở VIỆT NAM

Phạm Quang Thu¹, Nguyễn Mạnh Hà¹, Lê Thị Xuân¹

TÓM TẮT

Nấm Đông trùng hạ thảo *Isaria tenuipes* (Peck.) Samson lần đầu tiên được phát hiện và mô tả ở Việt Nam. Loài nấm này phân bố ở rừng nhiệt đới và á nhiệt đới lá rộng thường xanh ở độ cao từ 400 - 1800 m so với mực nước biển. Tần suất xuất hiện rất khác biệt giữa các địa điểm điều tra, phân bố rất phổ biến ở Vườn Quốc gia Hoàng Liên và Vườn Quốc gia Ba Vì, khá phổ biến ở Vườn Quốc gia Tam Đảo và Khu Bảo tồn Thiên nhiên Cópia, rất ít gặp và không gặp ở Vườn Quốc gia Bidoup-Núi Bà và Vườn Quốc gia Bạch Mã. Thể quả nấm có màu vàng chanh. Bào tử vô tính vách dày, không màu, không vách ngăn, hình hạt đậu, kích thước 0,5-1,0 x 2,5-3,0 µm (Micromét). Bào tử vô tính thường được dính trên các tế bào sinh bào tử, phân nhiều nhánh ở phía đầu của sợi nấm và bào tử vô tính gần như phủ toàn bộ phía đầu sợi nấm. Loài nấm *Isaria tenuipes* được nuôi trồng nhân tạo trên qui mô lớn với giá thể là nhộng tằm hoặc hạt ngũ cốc. Nấm được chế biến thành thực phẩm chức năng có hiệu quả trong việc phòng chống và điều trị bệnh ung thư và sản xuất thuốc điều trị ung thư mới.

Từ khóa: Chống ung thư, *Isaria tenuipes* (Peck.) Samson, rừng lá rộng thường xanh, tần suất xuất hiện.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Chi nấm *Cordyceps* thuộc họ Clavicipitaceae gồm các loài nấm ký sinh côn trùng, loài đại diện là *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. ký sinh trên sâu non loài *Hepialus armoricanus*. Thể quả nấm và cả phần côn trùng bị ký sinh được dùng làm dược liệu cổ truyền ở Trung Quốc và được gọi là Đông trùng hạ thảo (Fumihide Takano *et al.*, 2005). Nhộng trùng thảo *Cordyceps militaris* (L.: Fr.) Berk, nấm ký sinh trên nhộng của bộ Cánh vẩy Lepidoptera cũng có giá trị dược liệu tương tự và cũng là loại dược liệu cổ truyền của Trung Quốc (John Holliday và Matt Cleaver, 2008). Loài nấm nhộng trùng thảo này đang được sử dụng rộng rãi hơn vì nó có khả năng nuôi trồng qui mô công nghiệp. Một loài nấm khác có tên là *Isaria tenuipes* (Peck.) Samson với 2 tên đồng nghĩa là *Isaria japonica* Yasuda và *Paecilomyces tenuipes* (Peck) Samson là một loài nấm ký sinh côn trùng cũng được coi là dược liệu truyền thống của các nước Trung Quốc, Nhật Bản và Hàn Quốc (Paea, H. O. *et al.*, 2003). Loài nấm này đã và đang gây trồng phổ biến ở nhiều nước trên thế giới mang lại thu nhập lớn cho các trang trại trồng nấm. *Isaria tenuipes* (Peck.) Samson được xác định là giai đoạn vô tính của nấm *Cordyceps takaomontana* Yakushiji & Kumazawa (Eiji Yokoyama, 2003). Trong chương trình điều tra, nghiên cứu các loài nấm ký sinh côn trùng ở một số vườn quốc gia và khu bảo tồn thiên nhiên ở Việt Nam của Viện Khoa học Lâm nghiệp

Việt Nam, đã phát hiện được loài nấm *Isaria tenuipes*. Đây là một loài nấm có giá trị dược liệu quý, tác dụng chủ yếu trong điều trị và hỗ trợ điều trị bệnh ung thư. Nấm *Isaria tenuipes* lần đầu tiên được phát hiện và mô tả ở Việt Nam. Dưới đây là kết quả mô tả đặc điểm hình thái, giải phẫu, đặc điểm phân bố, tính đa dạng sinh học và kết quả phân lập hệ sợi phục vụ cho nghiên cứu nuôi trồng thể quả của các chủng nấm *Isaria tenuipes* có ở Việt Nam.

II. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nội dung

Đặc điểm hình thái, giải phẫu và giám định đến loài mẫu nấm thu được; đặc điểm phân bố, ký chủ và tính đa dạng sinh học của loài nấm trong khu vực điều tra; phân lập, đặc điểm của hệ sợi trong nuôi cấy thuần khiết và nuôi trồng thu thể quả nấm; tổng quan tài liệu về giá trị dược liệu của nấm *Isaria tenuipes*.

2. Phương pháp

Nghiên cứu đặc điểm hình thái, giải phẫu và giám định đến loài mẫu nấm: Điều tra phân bố và thu mẫu nấm được tiến hành theo tuyến điều tra ở rừng tự nhiên thuộc một số vùng sinh thái của Việt Nam. Tuyến điều tra được thiết kế đi men theo suối và dọc theo suối cạn từ dưới thấp lên đến vùng thượng nguồn. Trên tuyến điều tra cứ 20 m tiến hành 1 điểm điều tra có các đặc trưng về tiểu khí hậu khác nhau. Tại các điểm điều tra tiến hành điều tra kỹ phía dưới thân cây đổ, dưới lớp lá mục và các khoảng đất trống trong rừng. Sau khi phát hiện được mẫu nấm, tiến

¹ Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam

hành mô tả đặc điểm của điểm điều tra, đặc điểm hành thái của nấm; đào thu mẫu nấm, kể cả côn trùng ký sinh còn dính với cây nấm. Mẫu được bọc trong giấy khô và đưa về phòng thí nghiệm nghiên cứu đặc điểm giải phẫu, bào tử và phân lập thuần khiết nấm. Giám định mẫu dựa trên đặc điểm hình thái, giải phẫu, đối chiếu, so sánh với chuyên khảo về nấm ký sinh côn trùng của Samson R. A. (1974).

Tại mỗi điểm điều tra thống kê số mẫu thu được của *P. tenuipes* và tổng số mẫu thu được của tất cả các loài nấm ký sinh côn trùng trong khu vực điều tra. Tần suất xuất hiện của loài nấm *P. tenuipes* được

tính bằng công thức sau: $F = \frac{n}{N} \times 100$

Trong đó: F (%): tần suất xuất hiện loài nấm *P. tenuipes*; n: số mẫu thu được của loài *P. tenuipes*; N: tổng số mẫu thu được của tất cả các loài trong khu điều tra.

Phân lập và đặc điểm của hệ sợi trong nuôi cấy thuần khiết: Phân lập nấm được thực hiện trên môi trường PDA (khoai tây, dextroza, aga) bằng phương pháp nuôi cấy mô nấm và từ bột bào tử vô tính. Khi bào tử nảy mầm cấy chuyển sang môi trường dinh dưỡng PDA mới. Giá trị được liệu của nấm được đánh giá trên cơ sở tổng quan tài liệu của các tác giả Eiji Yokoyama *et al.* (2003), Fumihide Takano *et al.* (2005), John Holliday and Matt Cleaver (2008), Nam K. S. *et al.* (2001) và các công trình nghiên cứu khác.

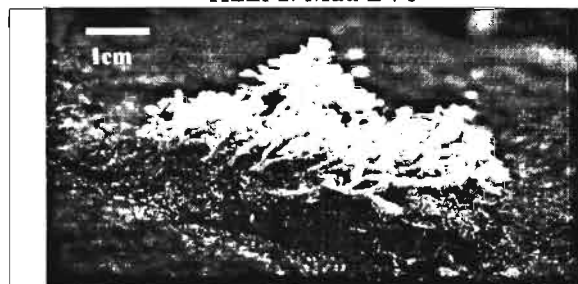
III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN



Hình 1. Mẫu BV6



Hình 2. Mẫu HL36



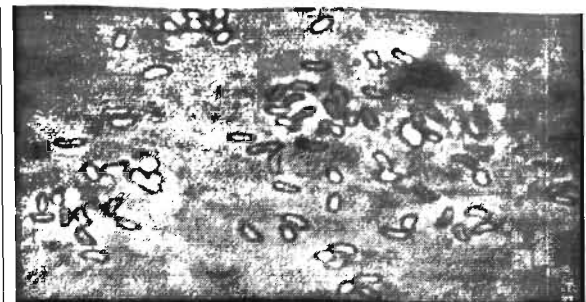
Hình 3. Mẫu BV16



Hình 4. Mẫu TD4

1. Đặc điểm hình thái, giải phẫu và giám định đến loài mẫu nấm thu được

Tại rừng tự nhiên lá rộng thường xanh của Vườn Quốc gia Hoàng Liên, tỉnh Lào Cai; Vườn Quốc gia Tam Đảo, tỉnh Vĩnh Phúc; Vườn Quốc gia Ba Vì, thành phố Hà Nội; Vườn Quốc gia Bạch Mã, tỉnh Thừa Thiên - Huế; Vườn Quốc gia Bidoup-Núi Bà, tỉnh Lâm Đồng và Khu Bảo tồn Thiên nhiên Cópia, tỉnh Sơn La đã thu được 45 mẫu nấm Đông trùng hạ thảo *Isaria tenuipes*. Hiện nay các mẫu này đang được lưu giữ tại Phòng Nghiên cứu Bảo vệ Thực vật rừng, Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam. Nấm ký sinh trên nhộng thuộc bộ Cánh vẩy Lepidoptera. Đặc điểm hình thái của nấm rất dễ nhận biết. Loài nấm này là giai đoạn vô tính của nấm *Cordyceps takaomonta* Yakushiji & Kumazawa. Hình thái của thể quả nấm (synnemata) bao gồm 2 phần chính: cuống nấm và tế bào sinh bào tử vô tính (conidiogenous structures). Cuống của nấm màu vàng chanh, kích thước rất biến động tùy thuộc vào điều kiện mọc và số lượng thể quả có trên một ký chủ, thường từ 0,5 đến 4,5 mm. Phía trên của cuống nấm là các tế bào sinh bào tử vô tính được phân thành nhiều nhánh và căng phồng chứa đầy bào tử bụi màu trắng, khô và rất dễ rời khỏi tế bào sinh bào tử (Hình 1, 2, 3 và 4). Bào tử vô tính hình hạt đậu, hơi cong ở giữa, có kích thước nhỏ 0,5-1,0 x 2,5-3,0 μm (hình 5). Căn cứ vào đặc điểm mô tả ở trên loài nấm thu được được xác định là loài *Isaria tenuipes* (Peck.) Samson, thuộc họ *Clavicipitaceae*, bộ *Hypocrales*, lớp *Sordariomycetes*, ngành phụ nấm túi *Ascomycota*.



Hình 5. Bào tử vô tính nấm *P. tenuipes*

2. Đặc điểm phân bố và tính đa dạng sinh học của loài *Isaria tenuipes*

Tính đa dạng sinh học được xác định bằng chỉ tiêu tần xuất xuất hiện của loài nấm trong khu vực

Bảng 1. Tần xuất xuất hiện loài nấm *Isaria tenuipes*

TT	Địa điểm thu mẫu	Tổng số mẫu (mẫu)	Số mẫu nấm thuộc <i>Isaria tenuipes</i> (mẫu)	Tần xuất (%)
1	Vườn Quốc gia Hoàng Liên	50	23	46,0
2	Vườn Quốc gia Tam Đảo	34	7	20,6
3	Vườn Quốc gia Ba Vì	18	8	44,4
4	Vườn quốc gia Bạch Mã	50	0	0
5	Vườn Quốc gia Bidoup-Núi Bà	10	1	10,0
6	Khu Bảo tồn thiên nhiên Copia	28	6	21,4

Kết quả ở bảng trên cho thấy sự phân bố và tần xuất xuất hiện của loài nấm *Isaria tenuipes* rất khác nhau ở các khu vực nghiên cứu, dao động từ 0 đến 46%, phân bố rất phổ biến ở Vườn Quốc gia Hoàng Liên và Vườn Quốc gia Ba Vì, khá phổ biến ở Vườn Quốc gia Tam Đảo và Khu Bảo tồn thiên nhiên Copia, rất ít gặp và không gặp ở Vườn Quốc gia Bidoup-Núi Bà và Vườn Quốc gia Bạch Mã.

Nấm *Isaria tenuipes* phân bố trong rừng tự nhiên lá rộng thường xanh á nhiệt đới đến nhiệt đới, ở độ cao trên 400 - 1800 m so với mực nước biển. Đây là một loài nấm ưa ẩm, phân bố dọc theo khe cạn và dưới lớp thảm mục rừng. Nấm hình thành thể quả trong điều kiện có ánh sáng tán xạ yếu, độ tàn che thích hợp từ 0,5 đến 0,8. Tổ thành thực vật chủ yếu là các loài thuộc họ Sồi, Dẻ Fagaceae, họ Đậu Fabaceae, họ Mộc lan Magnoliaceae. Ký chủ của loài nấm này là nhộng thuộc bộ Cánh vẩy Lepidoptera.

3. Phân lập, đặc điểm của hệ sợi trong nuôi cấy thuần khiết, kỹ thuật nuôi trồng thể quả

Phân lập nấm được tiến hành tại phòng thí nghiệm Phòng Nghiên cứu Bảo vệ Thực vật rừng, Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam với môi trường PDA. Thể quả nấm được cắt gọt vô trùng lớp vỏ ngoài. Cát thịt nấm thành từng miếng nhỏ với kích



Hình 6. Hình thành thể quả trên môi trường PDA nghiên cứu ở thời điểm điều tra. Qua trình điều tra được thực hiện từ tháng 4 đến tháng 7 năm 2009 tại 6 địa điểm nghiên cứu. Kết quả tính toán tần xuất xuất hiện loài nấm *Isaria tenuipes* được trình bày ở bảng 1.

thước 1 x 1 mm, đặt trực tiếp trên môi trường dinh dưỡng, băng kín, đặt trong tủ định ôn với nhiệt độ 25°C. Sau 4-5 ngày trên mô nấm bắt đầu xuất hiện sợi nấm màu trắng xám. Tách và cấy vô trùng trên môi trường dinh dưỡng mới.

Sợi nấm ban đầu màu trắng xám và hơi ngắn, sợi nấm mọc bám chặt trên bề mặt thạch. Sinh trưởng của hệ sợi tốt nhất trên môi trường PDA (khoai tây, đường dextroza, thạch). Trong nuôi cấy thuần khiết tất cả các chủng nấm phân lập được đều hình thành thể quả trên môi trường dinh dưỡng PDA (Hình 6). Thể quả nấm phát triển bình thường và hình thành bào tử vô tính. Nuôi trồng thể quả loài nấm này được tiến hành trên giá thể hạt ngũ cốc và nhộng tằm *Bombyx mori*. Giá thể được đựng trong lọ thủy tinh hoặc lọ nhựa miệng rộng có kích thước 10 x 15 m. Khử trùng giá thể ở 121°C trong 40 phút. Để nguội cấy giống nấm vào các bình chứa giá thể đã khử trùng. Nuôi cấy nấm ở nhiệt độ 25°C, sau thời gian 8-10 ngày sợi nấm ăn kín giá thể. Gây sốc cho nấm ở điều kiện khô, độ ẩm không khí khoảng 60%, không ánh sáng, nhiệt độ 25°C trong thời gian 10 ngày. Tăng độ ẩm không khí lên 80%, hạ nhiệt độ không khí xuống còn 20°C, chiếu sáng với cường độ 2000 lux, nấm hình thành thể quả và thu hoạch sau 30 ngày kể từ khi nấm hình thành mầm thể quả.

4. Giá trị dược liệu của nấm *Isaria tenuipes*

Một hợp chất hóa học có hoạt tính sinh học quan trọng được tách chiết bằng dung môi metanola từ thể quả của loài nấm này là 4-acetyl-12,13-epoxy-1-9-trichothecene-3,15-diol (Oh, G. S. Et al., 2001). Đây là hợp chất đang được dùng để điều trị bệnh ung thư, bệnh máu trắng ở các nước trên thế giới, đặc biệt là Hàn Quốc (Eiji Yokoyama *et al.*, 2003). Tác dụng điều trị ung thư của hợp chất hóa học này không chỉ có tác dụng làm chết tế bào ung thư mà còn ức chế quá trình sinh tổng hợp protein, vì vậy quá trình điều trị đã đạt được hiệu quả cao (Paea, H. O *et al.*, 2003). Nam K. S. và cộng sự (2001) đã phân lập được 2 hợp chất ergosterol peroxyl (5 α , 8 α -epidioxy-24(R)-methylcolesta-6,22-dien-3 β -ol) và acetoxyscirpenediol (4 β -acetoxyscirpene-3 α ,15-diol) khác từ *P. tenuipes* có tác dụng tiêu diệt tế bào ung thư dạ dày, ung thư gan và hiệu quả được xác định gấp 4 đến 6,6 lần hoạt chất cisplatin hiện đang được sử dụng trong điều trị ung thư. Một số chất có hoạt tính sinh học thuộc các nhóm cordycerpin, xterol, xiclopeptit... từ thể quả của nấm cũng có tác dụng trong điều trị giảm đau (Yin Yan Yan *et al.*, 2007).

IV. KẾT LUẬN

1. Trong quá trình điều tra thu mẫu nấm Đông trùng hạ thảo ở Việt Nam đã thu được 200 mẫu nấm ký sinh côn trùng, trong đó có 45 mẫu nấm được xác định là loài *Isaria tenuipes* (Peck.) Samson. Đây là loài nấm lần đầu tiên được mô tả và ghi nhận có phân bố ở Việt Nam. Loài nấm này là dược liệu quan trọng, có tác dụng trong điều trị bệnh ung thư và đang được nuôi trồng quy mô công nghiệp ở nhiều nước trên thế giới như: Trung Quốc, Nhật Bản, Hàn Quốc và Mỹ.

2. Nấm phân bố ở rừng tự nhiên lá rộng thường xanh, vùng nhiệt đới và á nhiệt đới, độ cao từ 400 đến 1800 m so với mặt biển, độ tàn che 0,5-0,8 có ánh sáng tán xạ yếu. Nấm ký sinh trên nhộng của một số loài côn trùng bộ Cánh vẩy Lepidoptera. Tần suất xuất hiện của nấm *Isaria tenuipes* rất khác nhau ở các khu vực điều tra, phân bố rất phổ biến ở Vườn Quốc gia Hoàng Liên và Vườn Quốc gia Ba Vì, khá phổ biến ở Vườn Quốc gia Tam Đảo và Khu Bảo tồn thiên nhiên Cópia, rất ít gặp và không gặp ở Vườn Quốc gia Bidoup-Núi Bà và Vườn Quốc gia Bạch Mã.

3. Phân lập thuần khiết nấm trên môi trường PDA. Sợi nấm màu trắng xám và hơi ngắn, mọc bám

chặt trên bề mặt thạch. Sinh trưởng của hệ sợi tốt nhất trên môi trường PDA. Nuôi trồng thể quả trên giá thể nhân tạo là hạt ngũ cốc hoặc nhộng tằm.

Đông trùng hạ thảo *Isaria tenuipes* (Peck) Samson là loài nấm có giá trị dược liệu có tác dụng chính trong điều trị bệnh ung thư và thuốc giảm đau.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Eiji Yokoyama, Kenzo Yamagishi, and Akira Hara, 2003. Structures of the Mating-Type Loci of *Cordyceps takaomontana*. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 69, No 8, p. 5019–5022.
2. Fumihide Takano, Nobuo Yahagi, Remiko Yahagi, Satoko Takada, Masaya Yamaguchi, Satoko Shoda, Takeshi Murase, Shinji Fushiya, Tomihisa Ohta, 2005. The liquid culture filtrates of *Paecilomyces tenuipes* (Peck) Samson (= *Isaria japonica* Yasuda) and *Paecilomyces cicadae* (Miquel) Samson (= *Isaria sinclairii* (Berk.) Llod) regulate Th1 and Th2 cytokine response in murine Peyer's patch cells in vitro and ex vivo. International Immunopharmacology 5 (2005) 903–916.
3. John Holliday and Matt Cleaver, 2008. Medicinal value of the Caterpillar Fungi Species of the genus *Cordyceps* (Fr.) Link. (Ascomycetes). A Review. International Journal of Medicinal Mushrooms, 10(3):219–234 (2008).
4. Nam K. S., Jo Y. S., Kim Y. H., Hyun J. W. and Kim H. W., 2001. Cytotoxic activities of acetoxyscirpenediol and ergosterol peroxide from *Paecilomyces tenuipes*. Life Science, 2001, Jun 1, 69(2) 229-237.
5. Oh, G. S., K. H. Hong, H. Oh, H. O. Pae, I. K. Kim, N. Y. Kim, T. O. Kwon, M. K. Shin, and H. T. Chung, 2001. 4-Acetyl-12,13-epoxyl-9-trichothecene-3,15-diol isolated from the fruiting bodies of *Isaria japonica* Yasuda induces apoptosis of human leukemia cells (HL-60). Biol. Pharm. Bull. 24:785–789.
6. Paea, H. O., G. S. Oha, B. M. Choia, E. A. Seo, H. Ohb, M. K. Shinc, T. H. Kimc, T. O. Kwona and H. T. Chunga, 2003. Induction of apoptosis by 4-acetyl-12,13-epoxyl-9-trichothecene-3,15-diol from *Isaria japonica* Yasuda through intracellular reactive oxygen species formation and caspase-3 activation in

human leukemia HL-60 cells. Toxicology in Vitro 17 (2003) 49-57.

7. Samson R. A., 1981. Identification: Entomopathogenic Deuteromycetes in "Microbiol. Control of Pests and Plants Diseases, 1970-1980". (H. D. Burges Ed.), pp 93-106. Academic Press London.

8. Yin Yan - yan, Ming Liang, Zheng Li - fang, Kan Hong - wei, Li Chun - ru and Li Wei - ping, 2007. Bioactive compounds from *Paecilomyces tenuipes* regulating the function of the hypothalamo-hypophyseal system axis in chronic unpredictable stress rats. Chinese Med. J. 2007; 120 (12):1088-1092.

DISTRIBUTION OF ENTOPATHOGENIC FUNGUS *ISARIA TENUIPES* (PECK.) SAMSON IN VIETNAM

Pham Quang Thu, Nguyen Manh Ha, Le Thi Xuan

Summary

Isaria tenuipes (Peck.) Samson is described and recorded for the first time in Vietnam. The fungal species is distributed in evergreen tropical broadleaf rain forest at an elevation from 400 m to 1800 m above sea level. The occurrence frequency of the *Isaria tenuipes* varies from place to place; high dominant in the Hoang Lien national park and Ba Vi national park; widespread in Tam Dao national park and Cobia natural reservation; rare in Bidoup-Nui Ba park and Bach Ma national park. The main characters of the fungus consists of lemon yellow synnema. Conidia are thick wall, hyaline one celled with pea shape, and its dimension of 0.5-1.0 x 2.5-3.0 μm . The conidiophores are usually irregularly arranged in loose clusters and the oidia and cover most of the surface of the synnema. *Isaria tenuipes* species is artificially cultivated on a large scale using either the silkworm pupa or cereal grains, and is consumed as a functional food believed to be effective in cancer prevention and therapy, and employed as a target to search for a new anticancer drug.

Key words: *Anticancer, evergreen broadleaf forest, occurrence frequency, Isaria tenuipes.*

Người phản biện: GS. TS. Trần Văn Mão