

Nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng và điều kiện nuôi cấy nhân tạo đến sinh trưởng phát triển của nấm *Cordyceps militaris*

Nguyễn Minh Đức^{1*}, Nguyễn Thị Phương Đoài¹, Trần Thị Thu Hà², Trần Đăng Khánh¹, Khuất Hữu Trung¹

¹Viện Di truyền nông nghiệp

²Viện Nghiên cứu và phát triển lâm nghiệp, Trường Đại học Nông lâm Thái Nguyên

Ngày nhận bài 10/5/2017; ngày chuyển phản biện 12/5/2017; ngày nhận phản biện 16/6/2017; ngày chấp nhận đăng 22/6/2017

Tóm tắt:

Cordyceps militaris là một loại nấm dược liệu chứa nhiều hoạt chất sinh học quý giá để sử dụng làm thuốc. Trong điều kiện nuôi cấy nhân tạo, sử dụng gạo lức làm cơ chất nền thu được sinh khối quả thể cao hơn sử dụng gạo trắng 17,4-31,1% tùy từng chủng nấm *C. militaris*. Hàm lượng đường glucose trong môi trường ảnh hưởng đến số lượng mầm, chiều dài và khối lượng quả thể; hàm lượng đường glucose bổ sung vào môi trường nuôi cấy thích hợp nhất là 30 g. Lượng bột nhộng tằm bổ sung vào môi trường nuôi cấy là 2 g/bình. Nấm *C. militaris* có thể sinh trưởng phát triển được trong dải pH từ 4 đến 8, pH thích hợp cho môi trường nuôi cấy là 6-7. Ở nhiệt độ cao trên 30°C, quả thể nấm không thể hình thành, nhiệt độ môi trường nuôi cấy thích hợp nhất là 20-25°C. Cường độ ánh sáng môi trường nuôi cấy thích hợp nhất là 500-700 lux. Cường độ ánh sáng thấp làm giảm khả năng sinh trưởng và phát triển của các chủng nấm *C. militaris*. Thời gian thu hoạch thích hợp nhất là 65 ngày sau cấy giống. Thời gian thu hoạch kéo dài sẽ khiến hàm lượng cordycepin và adenosin trong quả thể nấm *C. militaris* giảm xuống.

Từ khóa: *Cordyceps militaris*, môi trường nuôi cấy, quả thể.

Chỉ số phân loại: 1.6

Đặt vấn đề

Cordyceps là một chi nấm ký sinh trên sâu non, sâu trưởng thành hoặc nhộng của một số loài côn trùng. Sâu non, nhộng, sâu trưởng thành của một số loài côn trùng nằm dưới đất hoặc ở trên mặt đất bị nấm ký sinh. Các loài nấm này sử dụng các chất hữu cơ trong cơ thể côn trùng làm thức ăn, làm cho côn trùng bị chết. Mùa đông, nhiệt độ và ẩm độ không khí thấp, nấm ký sinh ở dạng hệ sợi. Đến mùa hè, nhiệt độ và ẩm độ không khí cao, nấm chuyển sang giai đoạn sinh sản hữu tính, hình thành quả thể. Loài nấm *C. militaris* phân bố ở độ cao 2.000-3.000 m so với mực nước biển. Nấm *C. militaris* ký sinh trên sâu, nhộng của nhiều loài thuộc bộ Cánh vẩy (*Lepidoptera*). Loài này được tìm thấy tại nhiều quốc gia trên thế giới như Trung Quốc, Nhật Bản, Hàn Quốc, Thái Lan, Việt Nam.

Trên thế giới, các nghiên cứu về tác dụng của *Cordyceps* được các nhà khoa học đặc biệt quan tâm. Nhiều nghiên cứu đã được công bố chứng minh *Cordyceps* có hoạt tính kháng oxy rất cao, kháng ung thư, một số virus, vi khuẩn và nấm. Yu và cs (2006) đã so sánh về hiệu quả chống lại quá trình oxy hóa giữa *C. militaris* nuôi cấy và *C. sinensis* tự nhiên. Kết quả nghiên cứu cho thấy, ở *C. militaris*, khả năng ức chế sự oxy hóa ở liposom cao hơn nhưng ở

protein thì thấp hơn *C. sinensis*, hàm lượng polyphenolic và các hoạt chất sinh học như cordycepin và adenosin thì cao hơn *C. sinensis* [1]. Jiang và cs (2011) đã chứng minh rằng adenosin và 6,7,2',4',5'-pentamethoxyflavonyl trích từ *C. militaris* có khả năng ức chế HIV-1 protease [2]. Nghiên cứu của Wu và cs (2011) đã chỉ ra tỷ lệ monosaccharid trong phân đoạn polysaccharid tinh sạch từ *C. militaris* nuôi cấy gồm mannose:glucose:galactose với tỷ lệ là 1,35:8,34:1,00. Phân đoạn này cũng cho hoạt tính kháng oxy hóa cao, điều đó có thể liên quan đến khả năng chuyển electron hoặc nhường hydrogen [3]. So với thế giới, các nghiên cứu về tác dụng của nấm đông trùng hạ thảo *C. militaris* ở Việt Nam chưa được công bố nhiều. Phần lớn những gì mà các nhà nghiên cứu Việt Nam có được về nguồn dược liệu quý hiếm này đều chỉ dừng lại ở việc phát hiện các chủng của nấm đông trùng hạ thảo sẵn có trong tự nhiên. Theo nghiên cứu của Đái Duy Ban và cs (2009) thì nấm đông trùng hạ thảo là một loại dược liệu quý hiếm, có tác dụng hỗ trợ điều trị các bệnh virus, ung thư, HIV/AIDS, đái tháo đường và suy giảm tinh dịch [4]. Đoàn Minh Quân và cs (2014) đã tiến hành nghiên cứu tách chiết ergosterol và thử nghiệm hoạt tính kháng phân bào của cao ether dầu hòa từ sinh khối nấm *Cordyceps*

*Tác giả liên hệ: Email: nmduc1986@gmail.com

Effect of the nutritional medium and environment on artificial fruiting body formation of *Cordyceps militaris*

Minh Duc Nguyen^{1*}, Thi Phuong Doai Nguyen¹,
Thi Thu Ha Tran², Dang Khanh Tran¹,
Huu Trung Khuat¹

¹Agricultural Genetics Institute (AGI)

²Institute of Forestry Research and Development (IFRAD),
Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry (TUAF)

Received 10 May 2017; accepted 22 June 2017

Abstract:

Stromatal fruiting bodies of *Cordyceps militaris* were successfully produced in rice. Brown rice increases fresh fruit weight by 17.4-31.1% and was thus used for the rest of the experiments. Glucose influenced the number of shoots, length, and body weight; 30 g glucose/bottle was the optimum content. Supplementation of pupa at 2 g/bottle to the medium resulted in a slightly enhanced production of fruiting bodies. *C. militaris* can grow in the pH range from 4 to 8, and the suitable pH for the culture medium was 6 to 7. At high temperatures above 30°C, fruiting bodies can not form; the optimum temperature was 20-25°C. The most suitable light intensity was 500-700 lux. Low light intensity reduces the growth of *C. militaris*. The best harvest time was 65 days after transplanting. Long harvest time will reduce cordycepin and adenosine levels.

Keywords: *Cordyceps militaris*, culture medium, fruiting body.

Classification number: 1.6

spp. tại Việt Nam, kết quả cho thấy ergosterol dạng tinh thể và dạng cao PE có khả năng ức chế sự phân bào trên dòng tế bào ung thư vú MCF-7 [5].

Vài năm gần đây, nhờ những tiến bộ trong công nghệ sinh học, nước ta đã có thể nhân giống và nuôi trồng thành công nấm *C. militaris*. Thành tựu này đã giúp nước ta góp mặt cùng với Mỹ, Nhật Bản, Hàn Quốc, Trung Quốc và Thái Lan trở thành số ít nước có thể nuôi trồng thành công vị thuốc quý này trong công cuộc tìm kiếm giải pháp thay thế cho nấm đông trùng hạ thảo tự nhiên đang trở nên cạn kiệt cũng như để đáp ứng nhu cầu tiêu thụ loại nấm này ngày một tăng trên thế giới. Với mục đích chuyển giao công nghệ cho cá nhân, tổ chức có nhu cầu nhằm đưa loại nấm quý có chất lượng đảm bảo tới tay người tiêu dùng với giá thành phải chăng, đồng thời tăng thu nhập cho người sản xuất, chúng tôi tiến hành nghiên cứu để chọn ra môi trường nuôi cấy và điều kiện nuôi cấy tối ưu cho nấm *C. militaris*.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

Ba chủng nấm *C. militaris* HQ, Ho, Q1 thuộc bộ chủng giống của Bộ môn Kỹ thuật di truyền, Viện Di truyền nông nghiệp.

Phương pháp nghiên cứu

Giống gốc nấm *C. militaris* được lưu giữ và bảo quản ở 4°C trên môi trường PDA tại phòng thí nghiệm của Bộ môn Kỹ thuật di truyền, Viện Di truyền nông nghiệp. Môi trường nhân giống dịch thể gồm 5 g pepton, 5 g cao nấm men, 0,1 g B₁, 1 g MgSO₄, 0,5 g KH₂PO₄, pH = 6,5. Dịch lỏng này được nuôi trong máy lắc với tốc độ 120 vòng/phút, ở 25±1°C trong vòng 5 ngày.

Môi trường tạo quả thể cho thí nghiệm đầu tiên bao gồm: 25 g gạo và 50 ml dung dịch dinh dưỡng (1 g/l KH₂PO₄, 1 g/l MgSO₄, 0,2 g/l B₁, 1 g/l pepton, 50 g/l khoai tây, 10% nước dừa, pH = 7). Kết quả thu được từ thí nghiệm trước sẽ được sử dụng cho các thí nghiệm kế tiếp. Tất cả được cho vào bình trụ 500 ml, bịt nắp nilon và được khử trùng ở 121°C trong thời gian 25 phút.

Mỗi bình môi trường được cấy 2 ml giống dịch thể. Giai đoạn ươm sợi nấm được nuôi trong điều kiện tối hoàn toàn ở 20-22°C trong khoảng 9-10 ngày, sau đó được chuyển sang điều kiện phòng nuôi trồng ở 24±1°C, cường độ chiếu sáng 500-1.000 lux, quang chu kỳ 12L/12D, độ ẩm 80-90% trong khoảng 55-60 ngày.

Các chỉ tiêu theo dõi bao gồm: Thời gian hình thành mầm quả thể (ngày), đặc điểm phát triển của mầm quả thể

sau 20 ngày cấy giống, TW: Tổng khối lượng (g/bình), LS: Chiều dài quả thể, FW: Khối lượng quả thể (g/bình), hàm lượng cordycepin (mg/g chất khô), hàm lượng adenosin (mg/g chất khô). Cordycepin và adenosin được phân tích bằng phương pháp HPLC-PDA.

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel 2007.

Kết quả và thảo luận

Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến sinh trưởng, phát triển, năng suất nấm *C. militaris*

Ảnh hưởng của cơ chất nền đến sinh trưởng, phát triển, năng suất nấm *C. militaris*: Trong tự nhiên, nấm *C. militaris* thường ký sinh trên các loại côn trùng. Để giảm giá thành và chủ động nguồn nguyên liệu trong sản xuất, rất nhiều thí nghiệm nuôi trồng nấm *C. militaris* trên môi trường hữu cơ được tiến hành và may mắn là ngũ cốc và một vài nguồn cơ chất hữu cơ khác đã được chứng minh là thích hợp để nuôi trồng *C. militaris* trong môi trường nhân tạo. Từ năm 1941, Kobayasi đã tiến hành thử nghiệm trồng *C. militaris* trên cơ chất gạo [6]. Từ đó trở đi, gạo trở thành nguồn cơ chất chủ yếu để nuôi trồng *C. militaris* trên môi trường nhân tạo. Tuy nhiên không phải loại gạo nào cũng phù hợp làm môi trường nuôi trồng *C. militaris*. Để tìm ra loại gạo phù hợp, chúng tôi tiến hành nuôi trồng *C. militaris* trên loại gạo phổ biến tại Việt Nam, đó là gạo Bắc thơm trắng và gạo Bắc thơm lức. Sau thời gian 65 ngày tính từ khi cấy giống, các bình nấm được thu hoạch và đo đếm các chỉ tiêu. Kết quả được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của cơ chất nền đến quả thể nấm *C. militaris* 60 ngày sau cấy giống.

Chủng nấm	Công thức	TW (g/bình)	LS (mm)	FW (g/bình)
HQ	CT1 (Gạo Bắc thơm trắng)	100,7	55,8	13,5
	CT2 (Gạo Bắc thơm lức)	104,5	65,2	17,7
	LSD _{0,05}	4,17	3,06	2,33
Ho	CT1 (Gạo Bắc thơm trắng)	83,7	48,1	13,2
	CT2 (Gạo Bắc thơm lức)	88,3	53,9	15,5
	LSD _{0,05}	3,96	3,43	2,12
Q1	CT1 (Gạo Bắc thơm trắng)	93,6	45,4	13,6
	CT2 (Gạo Bắc thơm lức)	102,8	52,3	16,2
	LSD _{0,05}	4,32	3,04	2,07

Kết quả bảng 1 cho thấy, ở cả 3 chủng nấm, tất cả các chỉ tiêu theo dõi của công thức sử dụng gạo Bắc thơm lức đều cao hơn so với gạo Bắc thơm trắng. Theo kết quả nghiên cứu của Shrestha và cs (2012), 2 chỉ tiêu LS và năng suất sinh học khi nuôi trồng nấm *C. militaris* phụ thuộc vào từng chủng [7]. Ở công thức sử dụng Bắc thơm trắng làm cơ chất nền, chiều dài quả thể của chủng HQ là cao nhất (55,8 mm), chủng Q1 là thấp nhất (45,4 mm). Ở công thức sử dụng gạo Bắc thơm lức, chiều dài quả thể của

chủng HQ cao nhất (65,2 mm), chủng Q1 đạt thấp nhất (52,3 mm).

Sử dụng gạo Bắc thơm trắng làm cơ chất, khối lượng quả thể tươi thu được của giống Q1 cao nhất (13,6 g), của chủng Ho là thấp nhất (13,2 g). Trong khi đó ở công thức sử dụng gạo Bắc thơm lức, khối lượng quả thể tươi của chủng HQ là cao nhất (17,7 g), thấp nhất vẫn là chủng Ho (15,5 g).

Như vậy, có thể nhận thấy, sử dụng gạo Bắc thơm lức làm cơ chất nền thu được khối lượng quả thể tươi cao hơn sử dụng gạo Bắc thơm trắng 17,4-31,1% tùy từng chủng nấm.

Ảnh hưởng của hàm lượng đường glucose đến sinh trưởng, phát triển, năng suất nấm *C. militaris*: Ngoài nguồn carbon được cung cấp từ gạo, chúng tôi tiến hành bổ sung thêm đường glucose vào môi trường nuôi cấy với hàm lượng tăng dần từ 0 đến 50 g/l. Kết quả thí nghiệm cho thấy, hàm lượng đường trong môi trường nuôi cấy không ảnh hưởng đến thời gian hình thành cũng như đặc điểm hình thái và phát triển của mầm quả thể nhưng lại ảnh hưởng đến số lượng mầm quả thể nấm *C. militaris* (bảng 2).

Bảng 2. Ảnh hưởng của hàm lượng glucose đến sự hình thành và phát triển của mầm quả thể.

Chủng nấm	Công thức	Thời gian hình thành mầm quả thể (ngày)	Số lượng mầm quả thể/bình	Đặc điểm hình thái và phát triển mầm quả thể sau 25 ngày cấy giống
HQ	CT3 (0 g, ĐC)	18,4	13,9	Đỉnh nhọn, màu vàng cam, phát triển nhanh
	CT4 (10 g)	18,8	18,3	Đỉnh nhọn, màu vàng cam, phát triển nhanh
	CT5 (20 g)	17,2	40,7	Đỉnh nhọn, màu vàng cam, phát triển nhanh
	CT6 (30 g)	17,0	53,6	Đỉnh nhọn, màu vàng cam, phát triển nhanh
	CT7 (40 g)	17,4	52,7	Đỉnh nhọn, màu vàng cam, phát triển nhanh
	CT8 (50 g)	18,4	50,8	Đỉnh nhọn, màu vàng cam, phát triển nhanh
	LSD _{0,05}	1,73	9,78	
	CT3 (0 g, ĐC)	16,2	17,3	Đỉnh nhọn, màu vàng cam, phát triển nhanh
Ho	CT4 (10 g)	16,0	18,7	Đỉnh nhọn, màu vàng cam, phát triển nhanh
	CT5 (20 g)	16,7	40,2	Đỉnh nhọn, màu vàng cam, phát triển nhanh
	CT6 (30 g)	16,3	52,5	Đỉnh nhọn, màu vàng cam, phát triển nhanh
	CT7 (40 g)	16,5	53,8	Đỉnh nhọn, màu vàng cam, phát triển nhanh
	CT8 (50 g)	16,1	54,7	Đỉnh nhọn, màu vàng cam, phát triển nhanh
	LSD _{0,05}	1,63	9,06	
	CT3 (0 g, ĐC)	16,4	15,6	Đỉnh nhọn, màu vàng cam, phát triển nhanh
	CT4 (10 g)	16,1	16,7	Đỉnh nhọn, màu vàng cam, phát triển nhanh
Q1	CT5 (20 g)	16,5	25,2	Đỉnh nhọn, màu vàng cam, phát triển nhanh
	CT6 (30 g)	16,6	50,5	Đỉnh nhọn, màu vàng cam, phát triển nhanh
	CT7 (40 g)	16,4	49,8	Đỉnh nhọn, màu vàng cam, phát triển nhanh
	CT8 (50 g)	16,4	46,7	Đỉnh nhọn, màu vàng cam, phát triển nhanh
	LSD _{0,05}	1,35	9,24	

Kết quả bảng 2 cho thấy, số lượng mầm quả thể ở 2 công thức không bổ sung đường và bổ sung 10 g đường không có sự khác biệt đáng kể. Bổ sung 20 g đường, số

lượng mầm quả thể tăng lên rõ rệt. Khi lượng đường bổ sung tăng lên đến 30 g, số lượng mầm quả thể tăng lên gấp hơn 2 lần so với công thức đối chứng. Tuy nhiên khi tiếp tục tăng lượng đường, số mầm quả thể không tiếp tục tăng.

Ảnh hưởng của hàm lượng đường glucose đến quả thể nấm *C. militaris* được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của hàm lượng glucose đến quả thể nấm *C. militaris* sau 60 ngày cấy giống.

Chủng nấm	Công thức	TW (g/bình)	LS (mm)	FW (g/bình)	
HQ	CT3 (0 g ĐC)	116,2	65,1	17,2	
	CT4 (10 g)	116,7	65,7	17,8	
	CT5 (20 g)	117,3	70,4	18,5	
	CT6 (30 g)	117,1	74,3	22,6	
	CT7 (40 g)	117,8	75,6	22,8	
	CT8 (50 g)	118,0	75,8	22,8	
	<i>LSD</i> _{0,05}	3,07	3,12	3,16	
	Ho	CT3 (0 g ĐC)	105,1	47,6	15,8
		CT4 (10 g)	105,3	48,0	16,3
CT5 (20 g)		107,7	50,8	18,6	
CT6 (30 g)		108,2	55,4	21,8	
CT7 (40 g)		108,1	55,6	22,5	
CT8 (50 g)		108,4	55,0	22,7	
<i>LSD</i> _{0,05}		3,12	3,01	3,12	
Q1		CT3 (0 g ĐC)	111,7	52,1	16,0
		CT4 (10 g)	113,6	52,7	16,4
	CT5 (20 g)	114,2	56,3	20,1	
	CT6 (30 g)	115,8	63,9	23,9	
	CT7 (40 g)	115,8	64,1	23,9	
	CT8 (50 g)	116,1	64,4	24,5	
	<i>LSD</i> _{0,05}	3,16	3,33	3,04	

Kết quả bảng 3 cho thấy, ở cả 3 chủng nấm, hàm lượng đường glucose không ảnh hưởng đến TW thu được nhưng lại ảnh hưởng đến chiều dài và khối lượng của quả thể. Đối với cả 3 chủng HQ, Ho và Q1, khi tăng lượng đường bổ sung, chiều dài quả thể sẽ tăng lên. Ở mức ý nghĩa 5%, chiều dài quả thể ở 3 công thức 6, 7 và 8 (bổ sung 30, 40 và 50 g đường) không sai khác. Tương tự, khối lượng quả thể nấm cũng tăng cùng với lượng đường bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Khối lượng quả thể ở 3 công thức 6, 7 và 8 cũng không có sự khác biệt.

Như vậy, có thể nhận thấy hàm lượng đường glucose trong môi trường ảnh hưởng đến số lượng mầm, chiều dài và khối lượng quả thể nấm *C. militaris*. Hàm lượng đường glucose bổ sung vào môi trường nuôi cấy thích hợp nhất là 30 g.

Ảnh hưởng của hàm lượng bột nhộng đến sinh trưởng, phát triển, năng suất nấm C. militaris: Trong tự nhiên, nấm *C. militaris* ký sinh trên côn trùng, do vậy nhu cầu về đạm tự nhiên của chúng cũng khá cao. Chính vì vậy, chúng tôi tiến hành bổ sung thêm bột nhộng tằm để tối ưu hóa môi trường nuôi cấy. Bột nhộng tằm được bổ sung vào môi trường theo các mức 1, 2 và 3 g/bình. Kết quả thí nghiệm được thể hiện ở bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của hàm lượng bột nhộng tằm đến quả thể nấm *C. militaris* sau 60 ngày cấy giống.

Chủng nấm	Công thức	TW (g/bình)	LS (mm)	FW (g/bình)
HQ	CT9 (0 g)	117,3	74,6	22,6
	CT10 (1 g)	117,9	75,7	22,9
	CT11 (2 g)	118,2	78,9	26,7
	CT12 (3 g)	118,2	79,0	26,5
	<i>LSD</i> _{0,05}	2,98	3,26	2,15
	Ho	CT9 (0 g)	97,5	55,8
CT10 (1 g)		97,9	56,0	21,4
CT11 (2 g)		100,7	59,9	23,9
CT12 (3 g)		101,2	60,1	24,0
<i>LSD</i> _{0,05}		2,98	3,42	2,07
Q1		CT9 (0 g)	114,3	63,3
	CT10 (1 g)	116,9	63,9	23,0
	CT11 (2 g)	117,8	72,5	25,6
	CT12 (3 g)	117,5	72,7	25,8
	<i>LSD</i> _{0,05}	2,98	3,45	2,22

Kết quả bảng 4 cho thấy, khi bổ sung vào môi trường 1 g bột nhộng tằm/bình, kết quả quan sát sau 60 ngày cấy giống cho thấy các chỉ tiêu theo dõi không có sự khác biệt so với đối chứng. Khi lượng bột nhộng tằm tăng lên 2 g/bình quan sát thấy chiều dài và khối lượng quả thể có sự thay đổi rõ rệt ở cả 3 chủng nấm. Tuy nhiên, khi tiếp tục tăng lượng bột nhộng tằm lên 3 g thì các chỉ tiêu theo dõi thay đổi không đáng kể. Như vậy, có thể nhận thấy mức bổ sung 2 g bột nhộng tằm/bình là hiệu quả nhất.

Ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy đến sinh trưởng, phát triển, năng suất nấm C. militaris: pH là một yếu tố quan trọng liên quan đến sinh trưởng, phát triển của nấm vì nó ảnh hưởng đến khả năng hấp thu dinh dưỡng cũng như hoạt tính của các enzym trong nấm. Để tìm ra pH môi trường thích hợp nhất cho 3 chủng nấm *C. militaris*, chúng tôi tiến hành làm thí nghiệm với các công thức môi trường có pH từ 4 đến 8. Kết quả thí nghiệm được thể hiện ở bảng 5.

Bảng 5. Ảnh hưởng của pH đến quả thể nấm *C. militaris* sau 60 ngày cấy giống.

Chủng nấm	Công thức	TW (g/bình)	LS (mm)	FW (g/bình)
HQ	CT13 (pH = 4)	100,3	34,2	10,3
	CT14 (pH = 5)	102,6	60,8	18,5
	CT15 (pH = 6)	115,8	78,5	26,6
	CT16 (pH = 7)	116,6	79,0	27,1
	CT17 (pH = 8)	98,7	42,1	13,4
	<i>LSD</i> _{0,05}	2,87	5,15	2,48
Ho	CT13 (pH = 4)	97,2	26,8	11,7
	CT14 (pH = 5)	100,3	46,7	18,4
	CT15 (pH = 6)	102,4	54,3	22,4
	CT16 (pH = 7)	101,8	59,6	23,6
	CT17 (pH = 8)	95,3	32,3	10,8
	<i>LSD</i> _{0,05}	3,41	5,62	3,78
Q1	CT13 (pH = 4)	100,1	32,6	12,1
	CT14 (pH = 5)	102,3	46,1	18,6
	CT15 (pH = 6)	116,5	69,3	24,9
	CT16 (pH = 7)	117,2	70,5	25,3
	CT17 (pH = 8)	102,4	32,7	11,0
	<i>LSD</i> _{0,05}	3,13	6,32	4,88

Kết quả bảng 5 cho thấy, cả 3 chủng nấm *C. militaris* được nghiên cứu đều có thể sinh trưởng, phát triển trên pH môi trường từ 4 đến 8. Tuy nhiên, chiều dài và khối lượng quả thể đạt cao nhất ở pH = 6-7. Đối với 2 chủng nấm HQ và Q1, chiều dài quả thể ở 2 công thức có pH = 6-7 chỉ khác nhau rất ít, lần lượt là 78,5-79,0 và 69,3-70,5 mm. Đối với chủng Ho, chiều dài quả thể lớn nhất đạt được ở công thức có pH = 7 là 59,6 mm. Chiều dài quả thể thấp nhất ở công thức có pH = 4 (HQ: 34,2 mm; Ho: 26,8 mm; Q1: 32,6 mm). Như vậy, có thể kết luận pH môi trường nuôi cấy thích hợp tạo quả thể nấm là 6-7.

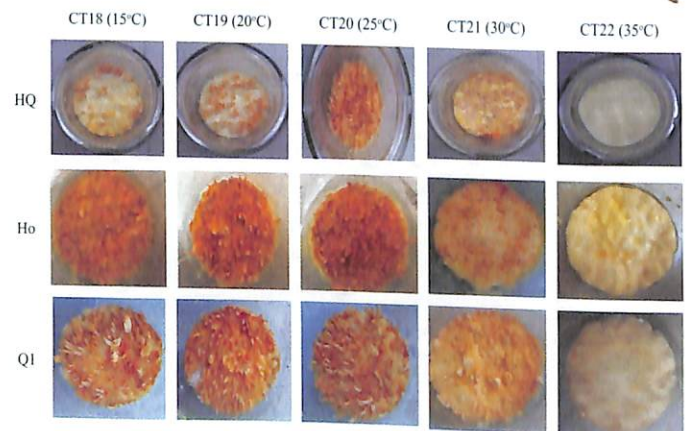
Ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy đến sinh trưởng, phát triển, năng suất nấm *C. militaris*

Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh trưởng, phát triển, năng suất nấm *C. militaris*: Nhiệt độ được xác định là một yếu tố quan trọng trong việc kích thích hình thành quả thể cũng như hình dạng, chiều dài và năng suất quả thể. Để xác định sự ảnh hưởng của nhiệt độ phòng nuôi tới sự hình thành và phát triển quả thể, chúng tôi thiết lập 5 công thức nhiệt độ nuôi nấm khác nhau từ 15 đến 35°C. Nấm trải qua giai đoạn ươm sợi sẽ được đưa vào các điều kiện nhiệt độ nuôi khác nhau, độ ẩm 80%, cường độ chiếu sáng 500-1.000 lux, quang chu kỳ 12L/12D.

Bảng 6. Ảnh hưởng của nhiệt độ môi trường đến sự hình thành và phát triển của mầm quả thể nấm *C. militaris*.

Chủng nấm	Công thức	Thời gian hình thành mầm quả thể (ngày)	Số lượng mầm quả thể/ bình	Đặc điểm hình thái và phát triển mầm quả thể sau 25 ngày cấy giống
HQ	CT18 (15°C)	19,1	38,7	Đỉnh nhọn, màu vàng cam, phát triển nhanh
	CT19 (20°C)	18,9	46,6	Đỉnh nhọn, màu vàng cam, phát triển nhanh
	CT20 (25°C)	19,0	50,4	Đỉnh nhọn, màu vàng cam, phát triển nhanh
	CT21 (30°C)	19,8	20,3	Đỉnh nhọn, màu trắng, không phát triển thành quả thể
	CT22 (35°C)			Không hình thành mầm quả thể
	<i>LSD</i> _{0,05}	1,12	5,34	
Ho	CT18 (15°C)	17,4	28,9	Đỉnh nhọn, màu vàng cam, phát triển nhanh
	CT19 (20°C)	17,6	40,7	Đỉnh nhọn, màu vàng cam, phát triển nhanh
	CT20 (25°C)	17,5	44,2	Đỉnh nhọn, màu vàng cam, phát triển nhanh
	CT21 (30°C)	18,3	16,6	Đỉnh tù, màu vàng cam, không phát triển thành quả thể
	CT22 (35°C)			Không hình thành mầm quả thể
	<i>LSD</i> _{0,05}	1,09	5,23	
Q1	CT18 (15°C)	17,5	22,7	Đỉnh nhọn, màu vàng cam, phát triển nhanh
	CT19 (20°C)	17,2	43,5	Đỉnh nhọn, màu vàng nhạt, phát triển nhanh
	CT20 (25°C)	17,8	52,1	Đỉnh nhọn, màu vàng cam, phát triển nhanh
	CT21 (30°C)	18,1	26,4	Đỉnh tù, màu vàng nhạt, không phát triển thành quả thể
	CT22 (35°C)			Không hình thành mầm quả thể
	<i>LSD</i> _{0,05}	1,04	5,18	

Kết quả bảng 6 cho thấy, ở nhiệt độ 35°C, cả 3 chủng nấm đều không hình thành mầm quả thể. Ở nhiệt độ 30°C, mầm quả thể được hình thành nhưng hình dạng mầm quả thể xấu, đỉnh tù, không phát triển thành quả thể. Số lượng mầm quả thể tăng dần ở nhiệt độ 15-25°C. Số lượng mầm quả thể thấp nhất ở nhiệt độ 15°C (trung bình HQ: 38,7 mầm, Ho: 28,9 mầm, Q1: 22,7 mầm), cao nhất ở nhiệt độ 25°C (HQ: 50,4 mầm, Ho: 44,2 mầm, Q1: 52,1 mầm) (hình 1).



Hình 1. Ảnh hưởng của nhiệt độ phòng nuôi đến sự hình thành và phát triển của mầm quả thể nấm *C. militaris* sau 25 ngày cấy giống.

Ảnh hưởng của nhiệt độ phòng nuôi cấy đến quả thể nấm *C. militaris* được thể hiện ở bảng 7.

Bảng 7. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy đến quả thể nấm *C. militaris* sau 60 ngày cấy giống.

Chủng nấm	Công thức	TW (g/bình)	LS (mm)	FW (g/bình)
HQ	CT18 (15°C)	112,6	90,4	24,8
	CT19 (20°C)	114,3	80,3	30,1
	CT20 (25°C)	115,9	80,1	29,4
	CT21 (30°C)	102,1	0	0
	CT22 (35°C)	-	-	-
	LSD _{0,05}	3,16	5,08	3,27
Ho	CT18 (15°C)	99,8	70,3	20,7
	CT19 (20°C)	102,3	60,0	25,5
	CT20 (25°C)	103,1	60,1	24,4
	CT21 (30°C)	96,5	0	0
	CT22 (35°C)	-	-	-
	LSD _{0,05}	3,11	5,17	3,64
Q1	CT18 (15°C)	102,2	73,0	20,3
	CT19 (20°C)	110,4	72,4	26,5
	CT20 (25°C)	111,1	72,6	27,0
	CT21 (30°C)	103,7	0	0
	CT22 (35°C)	-	-	-
	LSD _{0,05}	3,52	4,24	3,45

Kết quả bảng 7 cho thấy, ở nhiệt độ 15°C, quả thể đạt chiều dài lớn nhất nhưng khối lượng quả thể không cao bằng nuôi ở nhiệt độ 20-25°C. Ở nhiệt độ 20-25°C, chiều dài cũng như khối lượng quả thể không có sự sai khác ở mức ý nghĩa 5%. Đối với chủng HQ, chiều dài quả thể ở 15°C là 90,4 mm; ở 20-25°C là 80,1-80,3 mm. Đối với chủng Ho, chiều dài quả thể ở 15°C là 70,3 mm; ở 20-25°C là 60,0-60,1 mm. Đối với chủng Q1, chiều dài quả thể ở các nhiệt độ khác nhau không có sự chênh lệch đáng kể.

Khối lượng quả thể của 2 chủng nấm HQ và Ho đều đạt thấp nhất ở 15°C (HQ: 24,8 g; Ho: 20,7 g) và cao nhất ở 20°C (HQ: 30,1 g; Ho: 25,5 g). Đối với chủng Q1, khối lượng quả thể thấp nhất ở 15°C (20,3 g) và cao nhất ở 25°C (27,0 g). Khối lượng quả thể ở nhiệt độ 20-25°C không có sự sai khác ở mức ý nghĩa 5%.

Như vậy, nhiệt độ nuôi cấy thích hợp nhất của nấm *C. militaris* là 20-25°C.

Ảnh hưởng của cường độ ánh sáng đến sinh trưởng, phát triển, năng suất nấm C. militaris: Ánh sáng là một yếu tố quan trọng ảnh hưởng tới sự hình thành và phát triển quả thể nấm *C. militaris*. Để xác định sự ảnh hưởng của cường độ chiếu sáng tới việc hình thành và phát triển quả thể, chúng tôi thiết lập 5 công thức chiếu sáng với cường độ khác nhau là: 300, 500, 700, 900 và 1.100 lux.

Nấm trải qua giai đoạn ươm sợi sẽ được đưa vào các điều kiện chiếu sáng khác nhau, nhiệt độ 20-25°C, độ ẩm 90%, quang chu kỳ 12L/12D. Kết quả nghiên cứu được trình bày ở bảng 8.

Bảng 8. Ảnh hưởng của cường độ ánh sáng đến quả thể nấm *C. militaris* sau 60 ngày cấy giống.

Chủng nấm	Công thức	TW (g/bình)	LS (mm)	FW (g/bình)
HQ	CT23 (300 lux)	92,8	50,4	14,8
	CT24 (500 lux)	112,3	79,3	28,1
	CT25 (700 lux)	114,2	79,7	28,4
	CT26 (900 lux)	102,1	61,1	24,5
	CT27 (1.100 lux)	98,1	55,7	21,3
	LSD _{0,05}	3,27	4,26	3,05
Ho	CT23 (300 lux)	98,9	40,3	17,7
	CT24 (500 lux)	100,3	60,3	23,5
	CT25 (700 lux)	102,1	60,6	24,1
	CT26 (900 lux)	99,5	57,2	23,9
	CT27 (1.100 lux)	95,7	49,7	22,5
	LSD _{0,05}	3,15	4,11	3,55
Q1	CT23 (300 lux)	92,2	43,0	15,3
	CT24 (500 lux)	111,3	69,4	24,5
	CT25 (700 lux)	111,1	70,6	26,1
	CT26 (900 lux)	102,9	65,7	24,7
	CT27 (1.100 lux)	100,5	58,4	20,4
	LSD _{0,05}	3,15	4,27	3,05

Kết quả bảng 8 cho thấy, ở cả 5 cường độ ánh sáng, quả thể nấm đều được hình thành. Cường độ ánh sáng ảnh hưởng đến cả TW, LS và FW của cả 3 chủng nấm nghiên cứu. Kết quả thí nghiệm cũng chỉ ra rằng, cường độ ánh sáng từ 500 đến 700 lux thích hợp cho sinh trưởng, phát triển của nấm *C. militaris*.

Đối với chủng HQ, chiều dài cũng như khối lượng quả thể ở các công thức có sự chênh lệch rõ rệt, hai công thức 500 và 700 lux vượt trội hơn hẳn các công thức còn lại: Chiều dài quả thể ở 500-700 lux đạt hơn 79 mm trong khi các công thức còn lại chỉ đạt 50-61 mm; khối lượng quả thể ở 2 công thức này cũng đạt trên 28 g. Khối lượng quả thể thấp nhất ở công thức 300 lux (14,8 g).

Đối với 2 chủng nấm còn lại, chiều dài cũng như FW của các công thức cũng có sự chênh lệch. Chiều dài cũng như khối lượng quả thể thấp nhất ở công thức 300 lux (Ho: 40,3 mm và 17,7 g; Q1: 43,0 mm và 15,3 g), cao nhất vẫn ở 2 công thức 500-700 lux.

Như vậy, cường độ ánh sáng tối ưu trong điều kiện môi trường nuôi cấy nấm *C. militaris* là 500-700 lux.

Ảnh hưởng của thời gian thu hoạch đến năng suất và chất lượng nấm *C. militaris*

Thời gian thu hoạch có ảnh hưởng đến năng suất và chất lượng quả thể. Quả thể thu hoạch đúng thời gian sẽ cho chất lượng tốt, hàm lượng hoạt chất cao. Nếu thu hoạch non, quả thể chưa phát triển hết, hàm lượng hoạt chất trong quả thể chưa tích lũy được nhiều, dẫn đến cả năng suất và chất lượng đều không cao. Nếu thu hoạch quá già, quả thể nấm sẽ mất nước, trở nên xù xì, sợi nấm thu được không đẹp, năng suất quả thể cũng giảm đi.

Ảnh hưởng của thời gian thu hoạch đến năng suất và hàm lượng hoạt chất trong quả thể được thể hiện ở bảng 9.

Bảng 9. Ảnh hưởng của thời gian thu hoạch đến khối lượng, hàm lượng hoạt chất adenosin và cordycepin trong quả thể nấm *C. militaris*.

Chủng nấm	Công thức	FW (g/bình)	Adenosin (mg/g)	Cordycepin (mg/g)
HQ	CT 28 (55 ngày)	26,8	0,80	8,1
	CT 29 (65 ngày)	29,3	0,64	11,6
	CT 30 (75 ngày)	28,7	0,36	9,5
	LSD _{0,05}	2,23		
Ho	CT 28 (55 ngày)	24,4	0,84	7,7
	CT 29 (65 ngày)	26,1	0,68	10,1
	CT 30 (75 ngày)	25,5	0,53	8,3
	LSD _{0,05}	2,75		
Q1	CT 28 (55 ngày)	26,9	0,96	8,0
	CT 29 (65 ngày)	28,6	0,77	10,6
	CT 30 (75 ngày)	28,3	0,53	8,4
	LSD _{0,05}	2,51		

Kết quả bảng 9 cho thấy, hàm lượng cordycepin trong quả thể cao nhất khi thời gian thu hoạch là 65 ngày. Hàm lượng cordycepin của chủng HQ tăng từ 8,1 (55 ngày) lên 11,6 mg/g (65 ngày), sau đó lại giảm xuống 9,5 mg/g (75 ngày). Hàm lượng cordycepin của chủng Ho tăng từ 7,7 (55 ngày) lên 10,1 mg/g (65 ngày), sau đó lại giảm xuống 8,3 mg/g (75 ngày). Ở chủng Q1, hàm lượng cordycepin tăng từ 8,0 (55 ngày) lên 10,6 mg/g (65 ngày), sau đó lại giảm xuống 8,4 mg/g (75 ngày).

Khác với cordycepin, hàm lượng adenosin trong quả thể nấm giảm dần theo thời gian thu hoạch. Thời gian thu hoạch nấm càng dài thì hàm lượng adenosin trong quả thể càng giảm.

Qua thí nghiệm có thể thấy, thời điểm thu hoạch quả thể nấm *C. militaris* tốt nhất là 65 ngày sau cấy.

Kết luận

Sử dụng gạo Bắc thơm lúc làm cơ chất nền thu được sinh khối quả thể cao hơn sử dụng gạo Bắc thơm trắng

17,4-31,1% tùy từng chủng nấm.

Hàm lượng đường glucose trong môi trường ảnh hưởng đến số lượng mầm, chiều dài và khối lượng quả thể nấm *C. militaris*. Hàm lượng đường glucose bổ sung vào môi trường nuôi cấy thích hợp nhất là 30 g.

Lượng bột nhộng tằm bổ sung vào môi trường nuôi cấy là 2 g/bình. Khi lượng nhộng tăng lên 2 g/bình quan sát thấy chiều dài và khối lượng quả thể có sự thay đổi rõ rệt ở cả 3 chủng nấm. Tuy nhiên khi tiếp tục tăng lượng nhộng lên 3 g thì các chỉ tiêu theo dõi thay đổi không đáng kể.

Nấm *C. militaris* có thể sinh trưởng, phát triển được trong dải pH từ 4 đến 8. Tuy nhiên pH thích hợp cho môi trường nuôi cấy là 6-7, cho chiều dài và khối lượng quả thể nấm cao nhất ở cả 3 chủng nấm.

Nhiệt độ môi trường nuôi cấy thích hợp nhất là 20-25°C. Ở nhiệt độ cao trên 30°C, quả thể nấm không thể hình thành. Chiều dài của quả thể nấm đạt cao nhất ở 15°C, còn khối lượng quả thể đạt cao nhất ở nhiệt độ 20-25°C.

Cường độ ánh sáng ảnh hưởng đến cả tổng trọng lượng, chiều dài quả thể và khối lượng quả thể của cả ba chủng nấm nghiên cứu. Cường độ ánh sáng môi trường nuôi cấy thích hợp nhất là 500-700 lux. Cường độ ánh sáng thấp làm giảm khả năng sinh trưởng và phát triển của các chủng nấm *C. militaris*.

Thời gian thu hoạch thích hợp nhất là 65 ngày sau cấy giống. Thời gian thu hoạch kéo dài sẽ khiến hàm lượng cordycepin và adenosin trong quả thể nấm *C. militaris* giảm xuống.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] H.M. Yu, B.S. Wang, S.C. Huang, P.D. Duh (2006), "Comparison of protective effects between cultured *Cordyceps militaris* and natural *Cordyceps sinensis* against oxidative damage", *J. Agric. Food Chem.*, **54**(8), pp.3122-3138.
- [2] Y. Jiang, J.H. Wong, M. Fu, T.B. Ng, Z.K. Liu, C.R. Wang, N. Li, W.T. Qiao, T.Y. Wen, F. Liu (2011), "Isolation of adenosin, iso-sinensetin and dimethylguanosine with antioxidant and HIV-1 protease inhibiting activities from fruiting bodies of *C. militaris*", *Phytomedicine*, **18**(2&3), pp.189-282.
- [3] F. Wu, H. Yan, X. Ma, J. Jia, G. Zhang, X. Guo, Z. Gui (2011), "Structural characterization and antioxidant activity of purified polysaccharid from cultured *C. militaris*", *African Journal of Microbiology Research*, **5**(18), pp.2743-2751.
- [4] Đái Duy Ban, Lưu Tham Muu (2009), *Đông trùng hạ thảo*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
- [5] Đoàn Minh Quân, Đinh Minh Hiệp (2014), "Nghiên cứu tách chiết ergosterol và thử nghiệm hoạt tính kháng phân bào của cao ether dầu hòa từ sinh khối nấm *Cordyceps* spp. tại Việt Nam", *Kỷ yếu Hội nghị năm học nghiên cứu và ứng dụng tại khu vực phía Nam năm 2014*, tr.89.
- [6] Y. Kobayasi (1941), "The genus *Cordyceps* and its allies", *Science reports of the Tokyo Bunrika Daigaku*, **5**, pp.53-260.
- [7] B. Shrestha, W. Zhang, Y. Zhang, X.Z. Liu (2012), "The medicinal fungus *C. militaris*: Research and development", *Mycological Progress*, **11**(3), pp.599-614.