



ISO 9001 : 2008

TRƯỜNG ĐẠI HỌC TRÀ VINH
HỘI ĐỒNG KHOA HỌC

BÁO CÁO TỔNG KẾT ĐỀ TÀI NCKH CẤP TRƯỜNG

**BƯỚC ĐẦU NGHIÊN CỨU QUY TRÌNH NUÔI
NẤM ĐÔNG TRÙNG HẠ THẢO (*Cordyceps
militaris*) CÓ NGUỒN GỐC TỪ NHẬT BẢN
TẠI TRÀ VINH**

**Chủ nhiệm đề tài:
Chức danh:
Đơn vị:**

**Nguyễn Ngọc Trai
Giảng viên
Bộ môn Trồng trọt & PTNT
Khoa Nông nghiệp - Thủy sản**

Trà Vinh, ngày.....tháng.....năm 2017



ISO 9001 : 2008

TRƯỜNG ĐẠI HỌC TRÀ VINH
HỘI ĐỒNG KHOA HỌC

**BÁO CÁO TỔNG KẾT
ĐỀ TÀI NGHIÊN CỨU KHOA HỌC CẤP TRƯỜNG**

**BƯỚC ĐẦU NGHIÊN CỨU QUY TRÌNH NUÔI
NẤM ĐÔNG TRÙNG HẠ THẢO (*Cordyceps
militaris*) CÓ NGUỒN GỐC TỪ NHẬT BẢN
TẠI TRÀ VINH**

Xác nhận của cơ quan chủ quản
(Ký, đóng dấu, ghi rõ họ tên)

Chủ nhiệm đề tài
(Ký, ghi rõ họ tên)

Nguyễn Ngọc Trai

Trà Vinh, ngày.....tháng.....năm 2017

TÓM TẮT

Mục tiêu của đề tài nhằm xác định một số yếu tố ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển quả thể nấm Đông trùng hạ thảo (*Cordyceps militaris*) được nuôi trên môi trường nhân tạo (gạo lức bổ sung dinh dưỡng hoặc nhộng tằm xay) và trên ký chủ nhộng tằm. Kết quả nghiên cứu đạt được như sau : (1) Nhiệt độ 25°C và cường độ chiếu sáng 500 lux là phù hợp cho sự hình thành và phát triển quả thể nấm *C. militaris* ; (2) Đối với môi trường nuôi là gạo lức huyết rồng bổ sung dinh dưỡng, 20 g gạo lức được bổ sung 30 ml dung dịch dinh dưỡng gồm 18,56 g/l glucose; 14,55 g/l peptone; 1,42 g/l KH₂PO₄; 1,5 g/l MgSO₄ và 1,0 mg/l NAA, pH = 5,6 100% keo nuôi có nấm *C. militaris* hình thành quả thể với trọng lượng quả thể đạt 8,01 g/keo; (3) Trên môi trường gạo lức (50 g/hộp nuôi) bổ sung 50 ml nước cất và nhộng tằm 5 g/hộp nuôi, sau 60 ngày chủng giống số lượng quả thể/hộp nuôi là 20,11 quả thể và trọng lượng quả thể đạt 10,14 g, hàm lượng Cordycepin và Adenosine phân tích được trong quả thể lần lượt là 10,08 mg/g và 0,57 mg/l và trong với cơ chất nuôi (gạo lức có chứa tơ nấm) đạt lần lượt 3,44 mg/g và 0,09 mg/g ; (4) Nấm *C. militaris* được nuôi tạo quả thể thành công trên nhộng tằm 9 ngày tuổi với số quả thể đạt trung bình 1,69 quả thể/nhộng.

MỤC LỤC

	Trang
THÔNG TIN CHUNG VỀ ĐỀ TÀI	i
TÓM TẮT	ii
MỤC LỤC	iii
DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT	vi
DANH SÁCH BẢNG	vii
DANH SÁCH HÌNH	viii
LỜI CẢM ƠN	ix
MỞ ĐẦU	- 1 -
1 Tính cấp thiết của đề tài	- 1 -
2 Tổng quan nghiên cứu	- 2 -
2.1 Giới thiệu chung về nấm <i>Cordyceps militaris</i>	- 2 -
2.2 Tình hình nghiên cứu nấm Đông trùng hạ thảo (<i>C. militaris</i>) trong nước-	5
-	-
2.3 Tình hình nghiên cứu nấm Đông trùng hạ thảo (<i>C. militaris</i>) ngoài nước-	5
-	-
3 Mục tiêu của đề tài	- 7 -
4 Đối tượng, phạm vi và phương pháp nghiên cứu	- 7 -
4.1. Đối tượng, địa điểm và thời gian nghiên cứu	- 7 -
4.2 Qui mô nghiên cứu	- 8 -
4.3 Phương pháp nghiên cứu	- 8 -
NỘI DUNG NGHIÊN CỨU	- 9 -
Chương 1. Nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ và cường độ ánh sáng đến khả năng hình thành quả thể thể nấm đông trùng hạ thảo (<i>C. militaris</i>) nuôi trên môi trường gạo lức bổ sung dinh dưỡng	- 9 -
1.1 Mục đích nghiên cứu	- 9 -
1.2 Bố trí thí nghiệm	- 9 -
1.3 Phương pháp thực hiện	- 9 -
1.4 Kết quả nghiên cứu	- 10 -

Chương 2. Nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng glucose, peptone, MgSO₄, K₂HPO₄ và NAA bổ sung vào môi trường gạo lức lên sự phát triển quả thể nấm đông trùng hạ thảo (<i>C. militaris</i>).....	- 15 -
2.1 Mục đích nghiên cứu	- 15 -
2.2 Bố trí thí nghiệm.....	- 15 -
2.3 Phương pháp thực hiện.....	- 15 -
2.4 Kết quả nghiên cứu.....	- 17 -
Chương 3. Tối ưu hóa môi trường nuôi cấy nấm đông trùng hạ thảo (<i>C. militaris</i>) trên môi trường gạo lức bổ sung dinh dưỡng.	- 25 -
3.1 Mục đích nghiên cứu	- 25 -
3.2 Phương pháp thực hiện.....	- 25 -
3.4 Kết quả nghiên cứu.....	- 27 -
Sau 60 ngày chủng giống tiến hành thu hoạch quả thể.....	- 32 -
Chương 4. Nuôi tạo quả thể nấm đông trùng hạ thảo (<i>C. militaris</i>) trên môi trường gạo lức được bổ sung nhộng tằm xay	- 33 -
4.1 Mục đích nghiên cứu	- 33 -
4.2 Bố trí thí nghiệm.....	- 33 -
4.3 Phương pháp thực hiện.....	- 33 -
4.4 Kết quả nghiên cứu.....	- 34 -
Sau 60 ngày chủng giống tiến hành thu hoạch quả thể.Chương 5. Nuôi tạo quả thể nấm đông trùng hạ thảo (<i>C. militaris</i>) trên ký chủ nhộng tằm.	- 38 -
5.1 Mục đích nghiên cứu	- 39 -
5.2 Bố trí thí nghiệm.....	- 39 -
5.3 Phương pháp thực hiện.....	- 39 -
5.4 Kết quả nghiên cứu.....	- 40 -
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	- 47 -
KẾT LUẬN.....	- 47 -
KIẾN NGHỊ.....	- 47 -
TÀI LIỆU THAM KHẢO	- 48 -
Tiếng Việt.....	- 48 -
Tiếng Anh	- 48 -
PHỤ LỤC.....	- 52 -

1. Các thành viên tham gia thực hiện đề tài	- 52 -
2. Phân tích phương sai	- 52 -

DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT

CV	Coefficient of variation
<i>C. militaris</i>	<i>Cordyceps militaris</i>
ĐTHT	Đồng trùng hạ thảo
et al	et alia
g/l	Gram/lit
LSD	Least significant difference
mm	milimet
mg	miligam
μg	microgam
Ns	Non Significan
NAA	Naphthalene acetic acid
NBRC	Biological resourse center, Nite
P	Probability

DANH SÁCH BẢNG

Trang

Bảng 1. Ảnh hưởng của nhiệt độ và cường độ chiếu sáng lên tỷ lệ hình thành quả thể.....	- 11 -
Bảng 2. Ảnh hưởng của nhiệt độ và cường độ chiếu sáng lên số lượng quả thể nấm ĐTHT	- 12 -
Bảng 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ và cường độ chiếu sáng lên chiều cao quả thể nấm ĐTHT/keo nuôi.....	- 12 -
Bảng 4. Ảnh hưởng của nhiệt độ và cường độ chiếu sáng lên đường kính quả thể....	- 13 -
Bảng 5. Ảnh hưởng của nhiệt độ và cường độ chiếu sáng lên trọng lượng quả thể nấm ĐTHT/keo nuôi	- 14 -
Bảng 6. Giá trị mã hóa, giá trị thực nghiệm, khoảng giá trị biến thiên của 3 yếu tố được sử dụng để thiết kế tối ưu theo mô hình Box-Behnken Design (BBD)-	25
-	
Bảng 7. Ma trận thực nghiệm với 3 yếu tố glucose, peptone và KH_2PO_4	- 26 -
Bảng 8. Ma trận thực nghiệm với 3 yếu tố glucose, peptone và KH_2PO_4 và kết quả thí nghiệm	- 27 -
Bảng 9. Bảng phân tích phương sai tối ưu hóa mô hình các yếu tố.....	- 28 -
Bảng 10. Kết quả phân tích sự phù hợp của mô hình với thực nghiệm.....	- 29 -
Bảng 11. Ảnh hưởng của lượng nhộng tằm xay bổ sung đến sự hình thành và phát triển của quả thể nấm ĐTHT	- 34 -
Bảng 12. Ảnh hưởng của vị trí tiêm và tuổi nhộng tằm lên tỷ lệ nhộng tằm nhiễm nấm <i>C. militaris</i>	- 40 -
Bảng 13. Ảnh hưởng của vị trí tiêm và tuổi nhộng tằm lên số lượng quả thể nấm <i>C. militaris</i> hình thành trên nhộng tằm.	- 41 -
Bảng 14. Ảnh hưởng của vị trí tiêm và tuổi nhộng tằm lên chiều cao quả thể nấm <i>C. militaris</i> hình thành trên nhộng tằm.	- 42 -
Bảng 15. Ảnh hưởng của vị trí tiêm và tuổi nhộng tằm lên đường kính quả thể nấm <i>C. militaris</i> hình thành trên nhộng tằm.	- 43 -

DANH SÁCH HÌNH

Trang

Hình 1. Quả thể nấm <i>C. militaris</i> trên ký chủ nhộng.....	- 2 -
Hình 2. Hình thái nấm ĐTHT (<i>C. militaris</i>) trên môi trường nuôi tạo quả thể ...	- 10 -
Hình 3. Biểu đồ thể hiện sự ảnh hưởng của hàm lượng Glucose trong dung dịch dinh dưỡng bổ sung lên sự sinh trưởng nấm <i>C. militaris</i>	- 17 -
Hình 4. Quả thể nấm <i>C. militaris</i> ở nghiệm thức 3 (trái) và nghiệm thức 6 (phải) sau 60 ngày chủng giống	- 18 -
Hình 5. Biểu đồ thể hiện sự ảnh hưởng của hàm lượng Peptone trong dung dịch dinh dưỡng bổ sung lên sự sinh trưởng nấm <i>C. militaris</i>	- 19 -
Hình 6. Biểu đồ thể hiện sự ảnh hưởng của hàm lượng $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ trong dung dịch dinh dưỡng bổ sung lên sự sinh trưởng nấm <i>C. militaris</i>	- 21 -
Hình 7. Biểu đồ thể hiện sự ảnh hưởng của hàm lượng K_2HPO_4 trong dung dịch dinh dưỡng bổ sung lên sự sinh trưởng nấm <i>C. militaris</i>	- 22 -
Hình 8. Biểu đồ thể hiện sự ảnh hưởng của hàm lượng NAA trong dung dịch dinh dưỡng bổ sung lên sự sinh trưởng nấm <i>C. militaris</i>	- 23 -
Hình 9. Quả thể nấm ĐTHT (<i>C. militaris</i>) trên môi trường gạo lức bổ sung dinh dưỡng ở nghiệm thức tối ưu (trái) và quả thể được gửi đi phân tích Cordycepin và Adenosine (phải)	- 30 -
Hình 10. Sơ đồ tóm tắt qui trình nuôi nấm ĐTHT (<i>C. militaris</i>) trên môi trường gạo lức bổ sung dinh dưỡng.....	- 31 -
Hình 11. Quả thể nấm ĐTHT (<i>C. militaris</i>) Trên môi trường gạo lức bổ sung nhộng tằm xay sau 60 ngày chủng giống.....	- 35 -
Hình 12. Sơ đồ tóm tắt qui trình nuôi nấm ĐTHT (<i>C. militaris</i>) trên môi trường gạo lức bổ sung nhộng tằm xay.	- 37 -
Hình 13. Tằm (<i>Bombyx mori</i>) được nuôi tại trường Đại học Trà Vinh. Giai đoạn tằm (trái) và giai đoạn nhộng (phải)	- 40 -
Hình 14 Nhộng tằm nhiễm nấm sau 5 ngày tiêm <i>C. militaris</i> (trái) và Quả thể nấm <i>C. militaris</i> hình hành trên nhộng tằm sau 60 ngày chủng giống (phải)	- 41 -
Hình 15. Sơ đồ tóm tắt qui trình nuôi nấm ĐTHT (<i>C. militaris</i>) trên ký chủ nhộng tằm.....	- 45 -

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành đề tài này, tôi xin chân thành gửi lời cảm ơn đến:

Ban Giám Hiệu, Khoa Nông nghiệp - Thủy sản, Phòng Khoa học Công nghệ, Phòng Kế hoạch - Tài vụ Trường Đại học Trà Vinh đã tạo điều kiện thuận lợi nhất để tôi có điều kiện làm việc và nghiên cứu đề tài.

Các đồng nghiệp tại Bộ môn Trồng trọt & PTNT, Khoa Nông nghiệp Thủy sản Trường Đại học Trà Vinh đã hỗ trợ tôi hoàn thành đề tài này.

Quý Thầy cô Trường Đại học Cần Thơ đã giảng dạy và truyền đạt những kiến thức quý báu làm nền tảng để tôi có thể thực hiện đề tài.

Các em sinh viên lớp Đại học Khoa học canh tác cây trồng khóa 2013, Khoa Nông nghiệp - Thủy sản, Trường Đại học Trà Vinh đã hỗ trợ tôi thực hiện đề tài.

Chân thành cảm ơn với tấm lòng trân trọng nhất!

Nguyễn Ngọc Trai

MỞ ĐẦU

1 Tính cấp thiết của đề tài

Ngày nay, nhu cầu sử dụng các thảo dược có nguồn gốc từ thiên nhiên như: Đông trùng hạ thảo, nấm Linh chi, Nhân sâm, Sâm Ngọc Linh,... để phòng và trị bệnh đã trở nên phổ biến. Trong đó, đông trùng hạ thảo được xem là loại thảo dược thượng hạng trong các loại thảo dược. Đông trùng hạ thảo là tên gọi chung cho một nhóm nấm ký sinh và gây bệnh trên côn trùng. Cuối mùa thu đầu mùa đông, chúng ký sinh gây bệnh trên côn trùng. Đến mùa hạ, khi nhiệt độ tăng lên, nấm phát sinh thành quả thể mọc giống như cây cỏ. Nấm *Cordyceps* được gọi là “Đông trùng hạ thảo” đã được sử dụng như là loại dược liệu dân gian truyền thống và là thành phần thực phẩm có tác dụng tăng cường hệ thống miễn nhiễm, phục hồi năng lượng tương tự nhân sâm của các quốc gia Châu Á như Hàn Quốc, Nhật Bản và Trung Quốc.

Phần dược tích của đông trùng hạ thảo được chứng minh là do chất chiết xuất từ nấm *Cordyceps*. Giống *Cordyceps* với hơn 300 loài có khả năng hình thành quả thể (Kobayashi, 1941; Petch, 1936) trong đó khoảng 78 loài đã được chọn lọc và định danh theo loại ký chủ và hình dạng quả thể (Sung, 1996). Tuy nhiên, chỉ một vài loài được chọn lọc có khả năng sử dụng làm dược liệu bao gồm *Cordyceps sinensis*, *C. militaris*, *C. ophioglossoides*, *C. sobolifera*, *C. liangshanensis*, và *C. cicadicola* (Ying et al., 1987). Trong đó, 2 loài đã được sử dụng rộng rãi trong y học cổ truyền châu Á là *Cordyceps sinensis* và *C. militaris*. Mặc dù loài *Cordyceps sinensis* đã được sử dụng từ rất lâu nhưng chúng có giá thành rất cao do rất khó để nuôi trồng mà chỉ được thu hái ngoài tự nhiên với sản lượng rất thấp. Trong khi đó, loài *C. militaris* ngày càng được sử dụng phổ biến hơn và có thể được nuôi cấy trên môi trường nhân tạo với thành phần cơ chất chủ yếu là các loại ngũ cốc chủ yếu là gạo lức (Sung et al., 1999) và trên ký chủ nhộng tằm. Đặc biệt quan trọng là loài *C. militaris* cũng chứa các chất có hoạt tính sinh học đặc biệt là *Cordycepin*-chất có khả năng chống ung thư giống như ở loài *Cordyceps sinensis*.

Trên thế giới và Việt Nam đã có một số công trình nghiên cứu nuôi trồng thành công loài đông trùng hạ thảo (*C. militaris*) trên môi trường nhân tạo (gạo lức có bổ sung dinh dưỡng) và trên ký chủ nhộng tằm. Tuy nhiên, việc chuyển giao công nghệ nuôi trồng khá đắt đỏ nên giá sản phẩm nấm đông trùng hạ thảo (*C. militaris*) nuôi trồng được bán ra với giá tương đối cao (từ 100 - 120 triệu đồng/kg). Với mục tiêu sản xuất ra đông trùng hạ thảo (*C. militaris*) với giá thành vừa phải để nhiều tầng lớp nhân dân có thể tiếp cận với nguồn dược liệu quý này trong phòng trị bệnh và bồi bổ sức khỏe, đề tài **“Bước đầu nghiên cứu quy trình nuôi nấm đông trùng hạ thảo (*C. militaris*) có nguồn gốc từ Nhật Bản tại Trà Vinh”** được thực hiện.

2 Tổng quan nghiên cứu

2.1 Giới thiệu chung về nấm *Cordyceps militaris*

2.1.1 Phân loại và mô tả nấm *C. militaris*

Nấm *C. militaris* thuộc giới Nấm, ngành Ascomycota, lớp Sordariomycetes, bộ Hypocreales, họ Cordycipitaceae, giống *Cordyceps* và loài *C. Militaris*. Loài này được Carl Linnaeus mô tả vào năm 1753 với tên gọi *Clavaria militaris* (Kobayasi, 1982) sau đó được đổi tên thành *Cordyceps militaris* (Kobayasi *et al*, 1982). Loài nấm ký sinh trên bướm và sâu bướm, quả thể có màu cam, chiều dài 8-10 cm. Đầu quả thể nấm có các đốm màu cam sáng. Quả thể nấm nhô lên từ xác ấu trùng hoặc nhộng, mặt cắt ngang quả thể có màu nhạt, rỗng ở giữa. Các nang bào tử dài từ 300-510 μm , bề rộng 4 μm . Các bào tử nang hình sợi, không màu và phân đoạn, kích thước 3,5-6 x 1- 1,5 μm . Các bào tử nang này trong điều kiện nghèo dinh dưỡng sẽ đứt ra và nảy chồi tạo các bào tử thứ cấp. Nấm này có phân bố rộng, ở Bắc Mỹ, châu Âu và châu Á (Paul *et al*, 2008).



Hình 1. Quả thể nấm *C. militaris* trên ký chủ nhộng

(Nguồn : <https://commons.wikimedia.org/wiki/>)

Tuy nhiên, hiện nay nấm *C. militaris* rất khan hiếm trong tự nhiên. Chính vì vậy nấm *C. militaris* có giá trị kinh tế rất cao nên việc sản xuất ở quy mô lớn các chiết xuất từ nấm phục vụ nghiên cứu và điều trị bệnh từ *C. militaris* hiện đang là một vấn đề cấp thiết.

2.1.2 Chu trình sống của nấm *C. militaris*

Giống như hầu hết các loài *Cordyceps* khác, *C. militaris* là một loài nấm ký sinh trên côn trùng và ấu trùng của côn trùng. Loài này chủ yếu lây nhiễm ở giai đoạn nhộng của các loài bướm khác nhau, rồi nhô lên trong cơ thể ký chủ vào mùa đông. Bào tử nấm theo gió dính vào bên ngoài ký chủ, sau đó từ bào tử hình thành

các ống nảy mầm có các thể bám. Các ống này tiết ra các enzyme như lipase, chitinase, protease làm tan vỏ ngoài của ký chủ và xâm nhập vào bên trong cơ thể. Sau đó hệ sợi nấm hút dinh dưỡng và sinh trưởng mạnh chiếm toàn bộ cơ thể và gây chết ký chủ. Đến cuối hè hoặc thu quả thể nhô ra ngoài để phát tán bào tử vào không khí (Kobayasi *et al*, 1982; Kamble *et al*, 2012). Các quả thể nấm *C. militaris* thường có màu vàng nhạt hoặc màu da cam (Zheng *et al.*, 2011). Nấm *Cordyceps militaris* có các dạng bào tử khác nhau trong chu trình sống của nấm (Hình 2). Ở các điều kiện môi trường khác nhau, sự hình thành các dạng bào tử cũng cho thấy sự khác biệt, như việc tạo bào tử tròn trên môi trường nuôi cấy rắn hoặc các chồi bào tử trên môi trường nuôi cấy lỏng.

2.1.3 Ký chủ

Nấm *C. militaris* là loài được nghiên cứu kỹ nhất trong tất cả các loài của giống *Cordyceps* (Kobayasi *et al*, 1941). Sự đa dạng về hình thái và khả năng thích nghi của loài này ở nhiều sinh cảnh khác nhau có thể là nguyên nhân làm chúng có mặt ở nhiều vùng địa lý và sinh thái trên trái đất (Kobayasi *et al*, 1941; Mains, 1958; Sung và Spatafora, 2004). Ký chủ phổ biến của loài *C.militaris* trong tự nhiên bao gồm ấu trùng và nhộng của các loài bướm. Ngoài ra, còn có các ký chủ khác như các loài côn trùng thuộc bộ cánh cứng (Coleoptera), bộ cánh màng (Hymenoptera), và bộ hai cánh (Diptera).

Trong tự nhiên có nhiều loài *Cordyceps* có hình thái tương tự hoặc gần giống loài *C. militaris*, bao gồm *C. cardinalis*, *C. Kyusyuensis*, *C. pseudomilitaris*, *C. rosea*, *C. roseostromata*, *C.washingtonensis*,... (Sung và Spatafora, 2004; Sung *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008).

2.1.4 Giá trị dược liệu của nấm *C. militaris*

Các hợp chất có hoạt tính sinh học có trong nấm *C. militaris* đã được nghiên cứu ly trích, đánh giá khả năng trong trị liệu và đã được ứng dụng rộng rãi trong điều trị bệnh và nâng cao sức khỏe cho con người với kết quả rất tốt. Adenosine và cordycepin là hai hợp chất có dược tính cao của nấm *C. militaris*. Adenosine chiếm 0,18% trong quả thể và 0,06% trong sinh khối nấm. Đối với hợp chất cordycepin, trong quả thể có hàm lượng cao gấp 3 lần so với sinh khối (0,97% so với 0,36%) (Hur, 2008). Về tác dụng trị liệu của Cordycepin, một nghiên cứu mới đây tại Đại học về Cordycepin trong Đông trùng Hạ thảo cho thấy Cordycepin có hai tác dụng trên tế bào: (1) Ở liều thấp, cordycepin ức chế tăng trưởng không kiểm soát và phân hóa tế bào; (2) Ở liều cao, cordycepin chặn đứng tế bào không cho dính chặt với nhau nên sẽ ức chế tăng trưởng. Cả hai tác dụng này có lẽ cùng dưới một cơ chế là cordycepin can thiệp vào sự tổng hợp protein của tế bào. Ở liều thấp, cordycepin can thiệp vào sản xuất ribonucleic acid messenger) và ở liều cao, cordycepin tác dụng trực tiếp lên sự sản xuất protein. Chính vì vậy, các nhà khoa học Anh cho rằng

Đông trùng Hạ thảo có tác dụng mạnh trong việc chống ung thư. Các nghiên cứu của một số nhà khoa học khác cho rằng, cordycepin khi đi vào bên trong tế bào sẽ được chuyển hóa thành mono, di, hoặc tri-phosphate và có tác dụng ức chế các enzyme tổng hợp purine (Rottman và Guarino, 1964). Bên cạnh đó, nghiên cứu cũng cho thấy Cordycepin có tác dụng kích hoạt sự kết thúc quá trình tổng hợp DNA hoặc RNA bên trong tế bào (Chen et al. 2008).

Adenosine là một nucleoside nội sinh hiện diện trong các tế bào của cơ thể con người. Hoạt chất này được chứng minh với khả năng điều tiết các quá trình sinh lí trong cơ thể con người bao gồm: bảo vệ tim cùng các chức năng của tiểu cầu, giãn nở mạch máu. Cấu trúc hóa học của adenosine là 6-amino-9-beta-D-ribofuranosyl-9-H-purine.

Các công trình nghiên cứu và các ứng dụng trong thực tế đã chỉ ra adenosine có những tác dụng dưới đây:

Ổn định huyết áp, hỗ trợ điều trị và phòng tránh các bệnh tim mạch: Theo các chuyên gia, Adenosine có mặt ở mọi tế bào trong cơ thể con người đồng thời tham gia vào mọi hoạt động sống của chúng ta. Hoạt chất này tham gia vào quá trình điều hòa nhịp tim, khắc phục hiện tượng loạn và chậm nhịp tim, cải thiện hệ tuần hoàn ngoại biên và tim mạch, tăng lượng oxy trong máu. Bên cạnh đó, adenosine còn được ghi nhận với khả năng ức chế hoạt động ngưng trệ tiểu cầu quá mức, đồng thời hạn chế tình trạng tắc và phòng chống các bệnh về mạch máu như: nhồi máu cơ tim, tắc mạch máu não, máu lưu thông kém...

Duy trì quá trình tuần hoàn, tăng cường oxy trong máu: Adenosin có trong Đông trùng hạ thảo giúp gia tăng lượng oxy trong máu, hỗ trợ sự giãn nở của các mạch máu, cung cấp dưỡng khí cho sự tuần hoàn máu của cơ thể.

Cải thiện sức khỏe: Adenosine cùng các thành phần khác trong đông trùng hạ thảo có khả năng cung cấp năng lượng cùng các chất dinh dưỡng cần thiết giúp duy trì các hoạt động sống của cơ thể đồng thời hồi phục sức khỏe cũng những người mới ốm dậy, cơ thể suy nhược...

Cải thiện khả năng sinh lí: Adenosine có tác dụng tích cực trong việc cải thiện tuần hoàn vi và lưu lượng máu cục bộ của thận, bên cạnh đó, hoạt chất này có thể điều tiết hàm lượng prostaglandin trong thận cùng các nội tiết tố, các tổ chức thần kinh của chức năng sinh dục.

Ổn định thần kinh: Hoạt chất này giúp ổn định tinh thần, giải tỏa căng thẳng, mệt mỏi, giảm bớt tình trạng đau đầu, chóng mặt, hỗ trợ hoạt động của hệ thần kinh. Bên cạnh đó, Adenosine giúp điều tiết quá trình sinh hóa của giấc ngủ, giúp chúng ta có giấc ngủ sâu, ổn định thông qua tác dụng ổn định và chống thiếu dưỡng khí. Theo một số kết quả nghiên cứu trên thế giới, Adenosine được ghi nhận với tác

dụng giảm kích thích thần kinh, hoạt chất này có nồng độ thấp bất thường trong những bệnh nhân bị động kinh đồng thời làm giảm các cơn co giật của căn bệnh này khi thí nghiệm trên chuột.

Hoạt chất adenosine trong đông trùng hạ thảo được ghi nhận với hàm lượng khá cao. Bởi vậy, việc sử dụng đông trùng hạ thảo sẽ giúp cơ thể hấp thụ được các dưỡng chất đồng thời thu nhận được những giá trị tích cực của adenosine với sức khỏe con người.

Chính các tác dụng trị liệu quý báu của Cordycepin và adenosine đã góp phần nên giá trị của nấm *C. militaris*. Các nghiên cứu được thực hiện và báo cáo cho thấy dịch chiết nước nóng hoặc các dung môi hữu cơ từ quả thể nấm *C. militaris* có tác dụng ức chế sự phát triển và gây chết theo chu trình của tế bào ung thư phổi với dòng tế bào sử dụng là NCI-H460 bởi Aramwit *et al.* (2014); Bizarro *et al.* (2015); Park *et al.* (2015) hoặc ung thư trực tràng (Lee *et al.*, 2015). Bên cạnh đó dịch chiết nấm *C. militaris* còn có khả năng kháng bệnh tiểu đường viêm thận (Liu *et al.*, 2016) và có tác động tích cực đến các hệ cơ quan trong cơ thể người như tuần hoàn, miễn nhiễm, tim mạch, hô hấp (Akaki *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2013).

2.2 Tình hình nghiên cứu nấm Đông trùng hạ thảo (*C. militaris*) trong nước

Có rất ít nghiên cứu về đông trùng hạ thảo (*C. militaris*) trong nước được thực hiện thời gian qua. Và nếu có thì hầu như các qui trình đều không được công bố rộng rãi mà chỉ nhằm phục vụ sản xuất thương mại hóa sản phẩm nên giá sản phẩm rất cao.

Sau 4 năm nghiên cứu, Trung tâm Nghiên cứu thực nghiệm Nông lâm nghiệp Lâm Đồng đã hoàn thiện quy trình nghiên cứu, sản xuất loại nấm đông trùng hạ thảo *C. takaomontana* trên dâu tằm và hiện đang sản xuất thử nghiệm một số sản phẩm từ đông trùng hạ thảo như: viên nhộng và viên nén đông trùng hạ thảo (<http://danviet.vn/quan-su>). Viện Bảo vệ thực vật cho biết đã nhân nuôi thành công loài đông trùng hạ thảo (*C. militaris*) trên môi trường gạo lức và môi trường gạo lức có bổ sung nhộng dâu tằm (<http://vnexpress.net/tin-tuc/khoa-hoc>).

Đã có nhiều công ty và đơn vị nghiên cứu sản xuất thành công nấm Đông trùng hạ thảo (*C. militaris*). Trong đó Công ty Cổ phần Dược thảo Thiên phúc được xem là công ty sản xuất ĐHTH với qui mô lớn nhất với nhà xưởng đặt tại Hà Nội và Đà Lạt. Hiện nay, các sản phẩm có nguồn gốc từ đông trùng hạ thảo tại Việt Nam rất đa dạng như: dạng đông trùng hạ thảo sau thu hoạch chỉ được sấy khô, đông trùng hạ thảo dạng viên nén hoặc viên nhộng, đông trùng hạ thảo kết hợp với linh chi, đông trùng hạ thảo dạng nước,...Tuy nhiên, đặc điểm chung là các sản phẩm ĐHTH có giá thành tương đối cao.

2.3 Tình hình nghiên cứu nấm Đông trùng hạ thảo (*C. militaris*) ngoài nước

Có rất nhiều nghiên cứu về đông trùng hạ thảo (*C. militaris*) đã được nghiên cứu và đăng trên nhiều tạp chí uy tín. Tuy nhiên, điểm giống nhau là hầu hết các nhà khoa học đều cho rằng phần dược tính của nấm đông trùng hạ thảo (*C. militaris*) chủ yếu có trong quả thể nấm và có rất ít hoặc không có trong cơ thể ký chủ.

So với *C. siensis*, *C. militaris* dễ để nuôi cấy trong cả môi trường lỏng và môi trường đặc với nhiều nguồn carbon và nitơ khác nhau. Những nghiên cứu gần đây đã chứng minh rằng *C. militaris* chứa nhiều thành phần hoạt tính có tiềm năng dược liệu như cordycepin, ergosterol, mannitol và nhiều loại poly saccharide có tác động đến nhiều hệ cơ quan trong cơ thể và phòng chống nhiều bệnh nên đã được sử dụng với nhiều mục đích chữa trị khác nhau (Das *et al.*, 2010a; Gu *et al.*, 2007; Reis *et al.*, 2013).

Bên cạnh đó, những nghiên cứu về đa dạng di truyền bằng việc giải trình tự vùng ITS giữa các dòng *C. militaris* được phân lập từ các vùng địa lý khác nhau được sử dụng để nuôi trồng tạo quả thể ở quy mô công nghiệp, cho thấy sự đa dạng di truyền giữa các dòng được phân lập từ Anh, Trung Quốc, Nhật Bản, Hàn Quốc và Na Uy là rất nhỏ và không tương quan với điều kiện địa lý (Wang *et al.*, 2008). Nghiên cứu của Zheng *et al.* (2011a) cho thấy rằng bộ gen của *C. militaris* không chứa các gen mã hóa ra các chất độc tương tự các nấm gây độc cho con người.

Do tính chuyên biệt cao đối với ký chủ và bị ảnh hưởng lớn bởi môi trường tăng trưởng nên loài *C. militaris* rất khó tìm thấy trong tự nhiên. Do đó việc nuôi cấy loài này nhằm thu sinh khối và các thành phần có hoạt tính sinh học thu hút nhiều nhà khoa học. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng các thành phần có hoạt tính sinh học thu được giữa các dòng *C. militaris* ngoài tự nhiên và được nuôi trồng là tương tự nhau (Tong *et al.*, 1997; Jiang và Sun, 1999., Wang *et al.*, 2012b). Ba phương pháp phổ biến trong nuôi cấy nấm *C. militaris* hiện nay là nuôi cấy trong môi trường rắn, môi trường lỏng và nuôi cấy ngập chìm.

Kết quả nghiên cứu được thực hiện bởi Wen *et al.* (2014) cho thấy để kích thích sự hình thành quả thể nấm *C. militaris* nuôi trên môi trường rắn, sau khi nấm lan tơ kín môi trường, các hộp nuôi nấm được đưa vào điều kiện 23⁰C 500 lux vào ban ngày và 16⁰C tối hoàn toàn vào ban đêm thì nấm sẽ hình thành quả thể sau 12-15 ngày sau khi chuyển vào điều kiện này. Bên cạnh đó nghiên cứu của ông cũng chỉ ra rằng thành phần môi trường tối ưu cho sự hình thành quả thể là môi trường gạo lức được bổ sung 40 g/l glucose, 5 g/l peptone, 1,5g/l MgSO₄.7H₂O, 1,5 g/l K₂HPO₄ và 1,0 mg/l NAA và môi trường tối ưu tạo ra Cordycepin là gạo lức bổ sung 10 g/l glucose, 10 g/l peptone, 1,0 g/l MgSO₄.7H₂O, 1,0 g/l K₂HPO₄ và 1,0 mg/l NAA. Trong khi nghiên cứu của Lim *et al.*, (2012) và Dong *et al.*, (2012) cho thấy đậu nành và lúa mì được bổ sung dinh dưỡng là cơ chất tốt nhất cho sự tạo

thành adenosin, cordycepin và D-mannitol của *C. militaris* khi được nuôi trên môi trường đặc.

Nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng gạo:nước (tỷ lệ 1:1; 1:1.35 hoặc cao hơn chút ít) là tối hảo cho sự hình thành quả thể nấm *C. militaris* (Sung et al. 1999, 2002; Lin et al. 2006b; Zheng et al. 2008c; Yue 2010). Tỷ lệ này phụ thuộc vào loại lúa được sử dụng và hàm lượng amylopectin chứa trong gạo. Nghiên cứu của Kim *et al.*, (2010) chỉ ra rằng trong 8 loại ngũ cốc sử dụng nuôi tạo quả thể *C. cardinalis*, gạo lứt là loại cơ chất tốt nhất và hàm lượng gạo lứt cũng như hàm lượng nước trong môi trường nuôi cũng ảnh hưởng đến chiều cao quả thể và trọng lượng tươi nấm/chai nuôi.

Bên cạnh đó, việc bổ sung nhộng tằm vào môi trường gạo lứt nhằm tạo quả thể *C. militaris* đã được chứng minh là tốt hơn so với các loại cơ chất khác được sử dụng (Shrestha *et al.*, 2004a, b, 2005a, b; Sung *et al.*, 2006a, b; Zhao *et al.*, 2006a; Jin *et al.*, 2009). Tuy nhiên, hầu hết các dòng *C. militaris* yêu cầu hàm lượng đạm tương đối thấp, ở nồng độ đạm cao có thể ức chế sự hình thành quả thể (Gao et al. 2000) nên năng suất nấm nuôi trên côn trùng thường thấp hơn trên ngũ cốc.

Kết quả nghiên cứu của Hong *et al.* (2010) cho thấy dịch nuôi *C. militaris* được tiêm vào nhộng tằm ở phần ngực hoặc phần bụng với thể tích từ 75-100 μ l ở độ tuổi từ 9 - 11 ngày tuổi, điều kiện nuôi ở điều kiện nhiệt độ 20⁰C, ánh sáng có cường độ 500 lux thì tất cả nhộng tằm được tiêm bị nhiễm nấm và tạo quả thể.

3 Mục tiêu của đề tài

Xác định điều kiện nuôi và thành phần dinh dưỡng bổ sung vào gạo lứt nhằm tối ưu hóa môi trường nuôi tạo quả thể nấm đông trùng hạ thảo (*C. militaris*).

Xác định vị trí tiêm dịch huyền phù nấm đông trùng hạ thảo (*C. militaris*) và độ tuổi nhộng tằm thích hợp cho việc tạo thành quả thể nấm đông trùng hạ thảo (*C. militaris*).

4 Đối tượng, phạm vi và phương pháp nghiên cứu

4.1. Đối tượng, địa điểm và thời gian nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Chủng nấm đông trùng hạ thảo (*C. militaris*) được đặt mua từ Trung tâm tài nguyên sinh học (NBRC), Viện Công nghệ và Đo lường Quốc Gia (National Institute of Technology and Evaluation) Nhật Bản. Giống được hoạt hóa theo hướng dẫn.

Gạo lứt huyết rồng được mua tại chợ Trà Vinh.

Nhộng tằm bổ sung vào môi trường gạo lúc được mua tại siêu thị CoopMart Trà Vinh.

Nhộng tằm dùng làm ký chủ nuôi nấm *C. militaris* được nuôi tại Trường Đại học Trà Vinh.

Địa điểm nghiên cứu

Phòng thí nghiệm vi sinh và phòng nghiên cứu nấm Đông trùng hạ thảo, Khoa Nông nghiệp - Thủy sản, Trường Đại học Trà Vinh.

Thời gian nghiên cứu

Từ tháng 4/2015 đến tháng 1/2017

4.2 Qui mô nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện với qui mô phòng thí nghiệm.

4.3 Phương pháp nghiên cứu

Giống nấm sau khi nhận về hoạt hóa được nhân lên trên môi trường PSA (Potato sucrose agar). Sinh khối nấm trên môi trường PSA được tiếp tục nuôi trong môi trường cơ bản (20 g/l sucrose, 20 g/l peptone, 0.5 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ và 1g/l K_2HPO_4) ở điều kiện 25⁰C thời gian 4 ngày trên máy lắc để lấy dịch nuôi phục vụ cho các nội dung nghiên cứu.

Các thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên với các lần lặp lại, số liệu thí nghiệm được thu thập được xử lý bằng phần mềm Excel, phân tích thống kê bằng phần mềm Stagraphic Centurion XVI, thí nghiệm tối ưu hóa được thiết kế và phân tích bằng phần mềm Design Expert 7.0.0.

NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

Chương 1. Nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ và cường độ ánh sáng đến khả năng hình thành quả thể thể nấm đông trùng hạ thảo (*C. militaris*) nuôi trên môi trường gạo lức bổ sung dinh dưỡng

1.1 Mục đích nghiên cứu

Xác định nhiệt độ môi trường nuôi và cường độ chiếu sáng phù hợp cho sự hình thành và phát triển quả thể nấm đông trùng hạ thảo (*C. militaris*).

1.2 Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên với 2 nhân tố (nhân tố A: nhiệt độ có 2 mức 20⁰C và 25⁰C; nhân tố B: cường độ chiếu sáng có 2 mức 500 lux và 1000 lux), 4 nghiệm thức, 3 lần lặp lại với mỗi lần lặp lại 10 keo nuôi nấm ĐTHT có đường kính 8 cm, cao 12 cm.

1.3 Phương pháp thực hiện

Chuẩn bị môi trường nuôi: môi trường nuôi tạo quả thể nấm đông trùng hạ thảo (*C. militaris*) bao gồm 20g gạo lức/keo được bổ sung 30 ml dung dịch dinh dưỡng/keo bao gồm: 10 g/l glucose; 10 g/l peptone; 1,0 g/l MgSO₄.7H₂O; 1,0 g/l K₂HPO₄; 1 mg/l NAA, pH được điều chỉnh = 5,6. Môi trường được khử trùng 30 phút ở 121⁰C sau đó để nguội ở nhiệt độ phòng.

Cấy giống: 5ml giống được chủng vào môi trường nuôi cấy được chuẩn bị bên trên.

Nuôi tạo quả thể: môi trường sau khi chủng giống được nuôi ở nhiệt độ 25⁰C ở điều kiện tối hoàn toàn để tơ nấm phát triển. Khi tơ nấm lan đầy môi trường, nhiệt độ và ánh sáng được điều chỉnh nhằm kích thích sự hình thành quả thể nấm với 23⁰C, 500 lux 12 giờ vào ban ngày và 17⁰C trong 12 giờ ở điều kiện tối hoàn toàn vào ban đêm, ẩm độ điều chỉnh 90-95%, thời gian 8 ngày.

Cuối cùng các keo nuôi được đặt vào các phòng nuôi có nhiệt độ và cường độ ánh sáng ứng với 4 nghiệm thức nêu trên với 14 giờ sáng (ứng với 2 mức cường độ) và tối hoàn toàn 10 giờ vào ban đêm để quả thể phát triển.

Chỉ tiêu theo dõi

Thời gian tơ nấm ăn kín môi trường (NSC): khi tơ nấm phủ kín bề mặt môi trường.

Thời gian quả thể bắt đầu hình thành hình thành (NSC): được tính khi có keo đầu tiên ở mỗi nghiệm thức có mầm quả thể bằng ngòi bút nhú lên từ môi trường.

Tỷ lệ (%) keo có nấm hình thành quả thể ở các nghiệm thức: số keo có quả thể hình thành/tổng số keo nuôi x 100.

Số lượng quả thể/keo sau 60 ngày cấy giống (quả thể có chiều cao > 1cm).

Trọng lượng tươi trung bình quả thể/keo (g) sau 60 ngày cấy giống.

Chiều cao trung bình quả thể/keo (mm) sau 60 ngày cấy giống.

Đường kính trung bình quả thể/keo (mm) sau 60 ngày chủng giống (được đo cách đỉnh quả thể 1 cm).

1.4 Kết quả nghiên cứu



Hình 2. Hình thái nấm ĐTHT (*C. militaris*) trên môi trường nuôi tạo quả thể
Tơ nấm phủ kín bề mặt môi trường có màu trắng (trái); Mầm quả thể nhú lên
từ môi trường nuôi (phải)

Sau thời gian chủng giống 10,8 ngày tơ nấm đã phủ kín môi trường và được tiến hành thay đổi điều kiện nhiệt độ và ánh sáng để kích thích sự hình thành quả thể của nấm ĐTHT. Trong giai đoạn ươm tơ, tơ nấm có màu trắng đục (hình 2a) và chuyển sang màu vàng cam khi được chiếu sáng. Kết quả nghiên cứu cho thấy rằng sau khi tiến hành kích thích bằng điều kiện vật lý (thay đổi nhiệt độ, chu kỳ sáng tối) sau thời gian chủng giống 21-22 ngày quả thể nấm ĐTHT bắt đầu hình thành trên môi trường gạo lức bổ sung dinh dưỡng với các quả thể mọc đơn hoặc thành chùm nhô lên khỏi bề mặt môi trường có màu vàng cam, đỉnh nhọn với kích thước bằng đầu ngòi bút bi (hình 2b). So với nghiên cứu được thực hiện bởi Lê Văn Vê et al. (2015) cho thấy, thời gian tơ nấm phủ kín bề mặt môi trường là không chênh lệch nhau nhiều nhưng thời gian nhú mầm quả thể đối với giống nấm *C. militaris* được nghiên cứu tại trường Đại học Trà Vinh sớm hơn từ 3-5 ngày. Đối với mỗi nghiệm thức khác nhau thì ảnh hưởng của nhiệt độ và cường độ chiếu sáng lên các chỉ tiêu sinh trưởng và phát triển quả thể nấm ĐTHT cũng khác nhau.

Bảng 1. Ảnh hưởng của nhiệt độ và cường độ chiếu sáng lên tỷ lệ hình thành quả thể

Cường độ ánh sáng (lux) (B)	Nhiệt độ ($^{\circ}$ C) (A)		Trung bình (%)
	20	25	
500	70,00	86,67	75,33
1000	66,67	73,33	70,00
Trung bình (%)	68,33 ^b	80,00 ^a	
F(A)		*	
F(B)		ns	
F(A x B)		ns	
CV (%)		9,53	

Ghi chú: Trong cùng một hàng, số có ít nhất một chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê khi dùng phép kiểm định LSD. (ns): khác biệt không có ý nghĩa thống kê; (): Khác biệt ở mức ý nghĩa 5%. Các giá trị đã được biến đổi dưới dạng Asin để xử lý thống kê, các giá trị trong bảng là trung bình gốc.*

Kết quả thí nghiệm được trình bày ở bảng 1 cho thấy nhiệt độ nuôi có ảnh hưởng đến tỷ lệ keo nuôi có nấm hình thành quả thể. Nhiệt độ 25° C, có đến 80% keo nuôi nấm hình thành quả thể, giá trị này đạt cao nhất và có sự khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức 5% so với giá trị đạt được ở nhiệt độ 20° C (chỉ đạt 68,33%). Tuy nhiên, cường độ chiếu sáng lại không có ảnh hưởng đến tỷ lệ này và cũng không có sự tương tác giữa nhiệt độ nuôi và cường độ chiếu sáng lên tỷ lệ keo nuôi nấm *C. militaris* hình thành quả thể. Nghiệm thức với cường độ chiếu sáng 500 lux và nhiệt độ 25° C có tỷ lệ keo nuôi hình thành quả thể cao nhất (86,67%) và thấp nhất (66,67%) ở nghiệm thức với nhiệt độ 20° C, cường độ chiếu sáng 1000 lux.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nhiệt độ và cường độ chiếu sáng lên số lượng quả thể nấm ĐTHT

Cường độ ánh sáng (lux) (B)	Nhiệt độ (°C) (A)		Trung bình
	20	25	
500	12,61	22,85	17,72
1000	13,37	21,51	17,44
Trung bình	12,99^b	22,18^a	
F(A)		**	
F(B)		ns	
F(A x B)		ns	
CV (%)		21,58	

*Ghi chú: Trong cùng một hàng, số có ít nhất một chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê khi dùng phép kiểm định LSD, (ns): khác biệt không có ý nghĩa thống kê; (**): khác biệt ở mức ý nghĩa 1%. Các giá trị trong bảng là trung bình của các lần lặp lại.*

Không có sự tương tác giữa cường độ chiếu sáng và nhiệt độ môi trường nuôi đến số lượng quả thể nấm ĐTHT hình thành/keo nuôi (bảng 2). Nhiệt độ có ảnh hưởng đến số lượng quả thể hình thành trong khi cường độ chiếu sáng lại không ảnh hưởng. Ở nhiệt độ 25°C số lượng quả thể đạt cao nhất (22,18 quả thể/keo) và khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1% so với số lượng quả thể hình thành/keo khi nấm ĐTHT được nuôi trên cùng cơ chất ở điều kiện 20°C (12,99 quả thể/keo). Trong 4 nghiệm thức thí nghiệm, nghiệm thức với điều kiện nuôi ở nhiệt độ 25°C, cường độ chiếu sáng 500 lux cho số lượng quả thể nấm ĐTHT hình thành/keo nuôi là cao nhất (22,85 quả thể) và thấp nhất (12,61 quả thể) ở nghiệm thức có cường độ chiếu sáng 500 lux, nhiệt độ 20°C.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ và cường độ chiếu sáng lên chiều cao quả thể nấm ĐTHT/keo nuôi

Cường độ ánh sáng (lux) (B)	Nhiệt độ (°C) (A)		Trung bình (mm)
	20	25	
500	27,35	44,16	37,76
1000	30,62	38,89	35,25
Trung bình (mm)	28,98^b	42,03^a	
F(A)		**	
F(B)		ns	
F(A x B)		ns	
CV (%)		10,32	

*Ghi chú: Trong cùng một hàng, số có ít nhất một chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê khi dùng phép kiểm định LSD, (ns): khác biệt không có ý nghĩa thống kê; (**): khác biệt ở mức ý nghĩa 1%. Các giá trị trong bảng là trung bình của các lần lặp lại.*

Giống với chỉ tiêu về số lượng quả thể và tỷ lệ keo nuôi có quả thể hình thành, nhiệt độ môi trường nuôi có tác động lớn đến chiều cao quả thể nấm ĐTHT (bảng 3). Chiều cao quả thể đạt cao nhất (42,03 mm) ở nhiệt độ 25°C và thấp nhất ở nhiệt độ 20°C (28,98 mm). Cũng giống như những loại nấm khác, sự sinh trưởng của nấm ĐTHT cần ánh sáng nhưng ở dạng ánh sáng khếch tán, ánh sáng với cường độ quá lớn lại có ảnh hưởng không tốt đến sự phát triển của nấm ở giai đoạn phát triển quả thể. Kết quả nghiên cứu được ghi nhận, đối với chủng nấm *C. militaris* nghiên cứu nhiệt độ 25°C thích hợp cho sự sinh trưởng của tơ nấm và sự phát triển của quả thể nhưng ở nhiệt độ cao hơn (28-32°C) cả tơ nấm và quả thể không phát triển mà bị chết dần.

Bảng 4. Ảnh hưởng của nhiệt độ và cường độ chiếu sáng lên đường kính quả thể

Cường độ ánh sáng (lux) (B)	Nhiệt độ (°C) (A)		Trung bình (mm)
	20	25	
500	1,3	2,1	1,7
1000	1,3	2,0	1,65
Trung bình (mm)	1,3 ^b	2,05 ^a	
F(A)		**	
F(B)		ns	
F(A x B)		ns	
CV (%)		11,94	

*Ghi chú: Trong cùng một hàng, số có ít nhất một chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê khi dùng phép kiểm định LSD, (ns): khác biệt không có ý nghĩa thống kê; (**): khác biệt ở mức ý nghĩa 1%. Các giá trị trong bảng là trung bình của các lần lặp lại.*

Đường kính quả thể và chiều vào quả thể hai chỉ tiêu góp phần tạo nên giá trị thẩm mỹ của nấm ĐTHT. Hai chỉ tiêu này của nấm *C. militaris* chịu tác động chủ yếu bởi giống và hàm lượng dinh dưỡng trong môi trường nuôi cấy, nhiệt độ môi trường nuôi. Điều kiện môi trường nuôi 25°C quả thể nấm thu được to hơn (đạt 2,05 mm) so với quả thể nấm ĐTHT khi được nuôi ở 20°C (1,3 mm). Tuy nhiên, giữa 2 cường độ ánh sáng khác nhau, đường kính trung bình quả thể khác biệt 0,05 mm (bảng 4).

Trọng lượng trung bình quả thể thu được trên đơn vị nuôi trồng là chỉ tiêu quan trọng trong quá trình nghiên cứu nuôi sinh khối nấm *C. militaris*. Chỉ tiêu này phụ thuộc chủ yếu vào số lượng quả thể/keo, chiều cao và đường kính quả thể. Kết quả thí nghiệm (bảng 5) cho thấy trọng lượng trung bình quả thể thu được ở điều kiện nhiệt độ 25°C đạt 6,89 g/keo và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với trọng lượng quả thể nấm ĐTHT thu được khi nuôi ở điều kiện 20°C (5,32 g/keo). Trong khi hai cường độ chiếu sáng được nghiên cứu không ảnh hưởng đến trọng lượng

quả thể của dòng nấm này. Trong 4 nghiệm thức nghiên cứu, nhiệt độ nuôi 25°C và cường độ chiếu sáng 500 lux cho sinh khối nấm *C. militaris* đạt cao nhất (6,98 g/keo).

Bảng 5. Ảnh hưởng của nhiệt độ và cường độ chiếu sáng lên trọng lượng quả thể nấm ĐTHT/keo nuôi

Cường độ ánh sáng (lux) (B)	Nhiệt độ (°C) (A)		Trung bình (g)
	20	25	
500	4,75	6,98	5,87
1000	5,90	6,80	6,35
Trung bình (g)	5,32^b	6,89^a	
F(A)		*	
F(B)		ns	
F(A x B)		ns	
CV (%)		13,77	

Ghi chú: Trong cùng một hàng, số có ít nhất một chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê khi dùng phép kiểm định LSD, (ns): khác biệt không có ý nghĩa thống kê; (): khác biệt ở mức ý nghĩa 5%. Các giá trị trong bảng là trung bình của các lần lặp lại.*

Nhiệt độ và cường độ ánh sáng có ảnh hưởng rất lớn đến sự sinh trưởng và phát triển quả thể nấm ĐTHT. Mỗi chủng nấm *C. militaris* đòi hỏi nhiệt độ và cường độ chiếu sáng khác nhau. Các nghiên cứu cho thấy rằng trong điều kiện che tối hoặc nhiệt độ dưới 18°C hoặc trên 25°C sự hình thành và phát triển quả thể nấm bị ức chế. Hầu hết các dòng nấm thuộc chi *Cordyceps* có cường độ ánh sáng thích hợp cho sự phát triển quả thể từ 500-1000 lux (Sung et al., 1999; Gao et al., 2000; Sato và Shimazu, 2002). Nghiên cứu sự hình thành và phát triển quả thể nấm *C. cardinalis* được thực hiện bởi Kim et al. (2010) cũng cho thấy rằng 25°C là điều kiện nhiệt độ tối ưu cho sự phát triển quả thể của dòng nấm này với các chỉ tiêu như trọng lượng tươi, chiều cao quả thể đạt cao hơn so với các chỉ tiêu tương ứng ở các mức nhiệt độ khác khi được nghiên cứu.

Từ các kết quả thí nghiệm thu được và được phân tích bên trên nhận thấy điều kiện nhiệt độ nuôi 25°C và cường độ ánh sáng chiếu sáng 500 lux là thích hợp cho sự sinh trưởng, phát triển quả thể dòng nấm ĐTHT được nghiên cứu. Vì vậy, chúng tôi chọn điều kiện này để nuôi dòng nấm *C. militaris* trong các thí nghiệm tiếp theo.

Chương 2. Nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng glucose, peptone, MgSO₄, K₂HPO₄ và NAA bổ sung vào môi trường gạo lức lên sự phát triển quả thể nấm đông trùng hạ thảo (*C. militaris*)

2.1 Mục đích nghiên cứu

Khảo sát sự ảnh hưởng của 5 yếu tố trong dung dịch dinh dưỡng bổ sung vào gạo lức gồm: glucose, peptone, MgSO₄, K₂HPO₄ và NAA lên sự sinh trưởng và phát triển quả thể nấm *C. militaris*. Qua đó xác định hàm lượng phù hợp của từng chất để thiết kế thí nghiệm tối ưu hóa môi trường nuôi cấy nấm *C. militaris* trên môi trường dinh dưỡng gạo lức bổ sung dinh dưỡng.

2.2 Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên theo phương pháp một nhân tố tại một thời điểm bao gồm 5 thí nghiệm nhỏ, mỗi thí nghiệm nhỏ nghiên cứu ảnh hưởng của từng nhân tố (glucose, peptone, MgSO₄, K₂HPO₄ và NAA) đối với sự sinh trưởng và phát triển quả thể nấm *C. militaris*. Mỗi thí nghiệm nhỏ có 6 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức gồm 10 keo với mỗi keo được xem như 1 lần lặp lại.

2.3 Phương pháp thực hiện

Chuẩn bị môi trường nuôi: môi trường nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng glucose, peptone, MgSO₄, K₂HPO₄ và NAA bổ sung vào môi trường gạo lức lên sự sinh trưởng và phát triển quả thể nấm *C. militaris* với mỗi keo nuôi gồm 20g gạo lức/keo được bổ sung 30 ml dung dịch dinh dưỡng/keo (10 g/l glucose; 10 g/l peptone; 1,0 g/l MgSO₄.7H₂O; 1,0 g/l K₂HPO₄; 1 mg/l NAA). Tuy nhiên, (1) khi nghiên cứu ảnh hưởng của glucose thì hàm lượng các nguyên tố khác giữ nguyên (10 g/l peptone; 1,0 g/l MgSO₄.7H₂O; 1,0 g/l K₂HPO₄; 1 mg/l NAA) riêng hàm lượng glucose có 6 mức tương ứng với 6 nghiệm thức là (0,0; 10; 20; 30; 40; 50 g/l); (2) nghiên cứu ảnh hưởng của peptone thì hàm lượng các nguyên tố khác giữ nguyên (10 g/l glucose; 1,0 g/l MgSO₄.7H₂O; 1,0 g/l K₂HPO₄; 1 mg/l NAA) riêng hàm lượng peptone có 6 mức tương ứng với 6 nghiệm thức là (0,0; 5; 10; 15; 20; 25 g/l); (3) nghiên cứu ảnh hưởng của MgSO₄.7H₂O thì hàm lượng các nguyên tố khác giữ nguyên (10 g/l glucose; 10 g/l peptone; 1,0 g/l K₂HPO₄; 1 mg/l NAA) riêng hàm lượng MgSO₄.7H₂O có 6 mức tương ứng với 6 nghiệm thức là (0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 g/l), (4) nghiên cứu ảnh hưởng của K₂HPO₄ thì hàm lượng các nguyên tố khác giữ nguyên (10 g/l glucose; 10 g/l peptone; 1,0 g/l MgSO₄.7H₂O; 1 mg/l NAA) riêng hàm lượng K₂HPO₄ có 6 mức tương ứng với 6 nghiệm thức là (0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 g/l); (5) nghiên cứu ảnh hưởng của NAA thì hàm lượng các nguyên tố khác giữ nguyên (10 g/l glucose; 10 g/l peptone; 1,0 g/l MgSO₄.7H₂O; 1,0 g/l K₂HPO₄) riêng hàm lượng NAA có 6 mức tương ứng với 6 nghiệm thức là (0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 mg/l) pH môi trường ở các thí nghiệm được điều chỉnh =

5,6. Môi trường được khử trùng 30 phút ở 121⁰C sau đó được làm mát ở nhiệt độ phòng.

Cấy giống: 5ml giống được chủng vào môi trường nuôi cấy được chuẩn bị bên trên.

Nuôi tạo quả thể: môi trường sau khi chủng giống được nuôi ở nhiệt độ 25⁰C ở điều kiện tối hoàn toàn để tơ nấm phát triển. Khi tơ nấm lan đầy môi trường, nhiệt độ và ánh sáng được điều chỉnh nhằm kích thích sự hình thành quả thể nấm với 23⁰C, 500 lux 12 giờ và 16⁰C trong 12 giờ ở điều kiện tối hoàn toàn, thời gian 8 ngày. Khi quả thể nhú mầm trên môi trường, nhiệt độ phòng nuôi quả thể được điều chỉnh 25⁰C, cường độ chiếu sáng 500 lux, ẩm độ điều chỉnh 90-95%.

Chỉ tiêu theo dõi

Thời gian tơ nấm ăn kín môi trường (NSC): khi tơ nấm phủ kín bề mặt môi trường.

Tỷ lệ (%) keo có nấm hình thành quả thể ở các nghiệm thức: số keo có quả thể hình thành/tổng số keo nuôi x 100.

Số lượng quả thể/keo sau 60 ngày cấy giống (quả thể có chiều cao > 1cm).

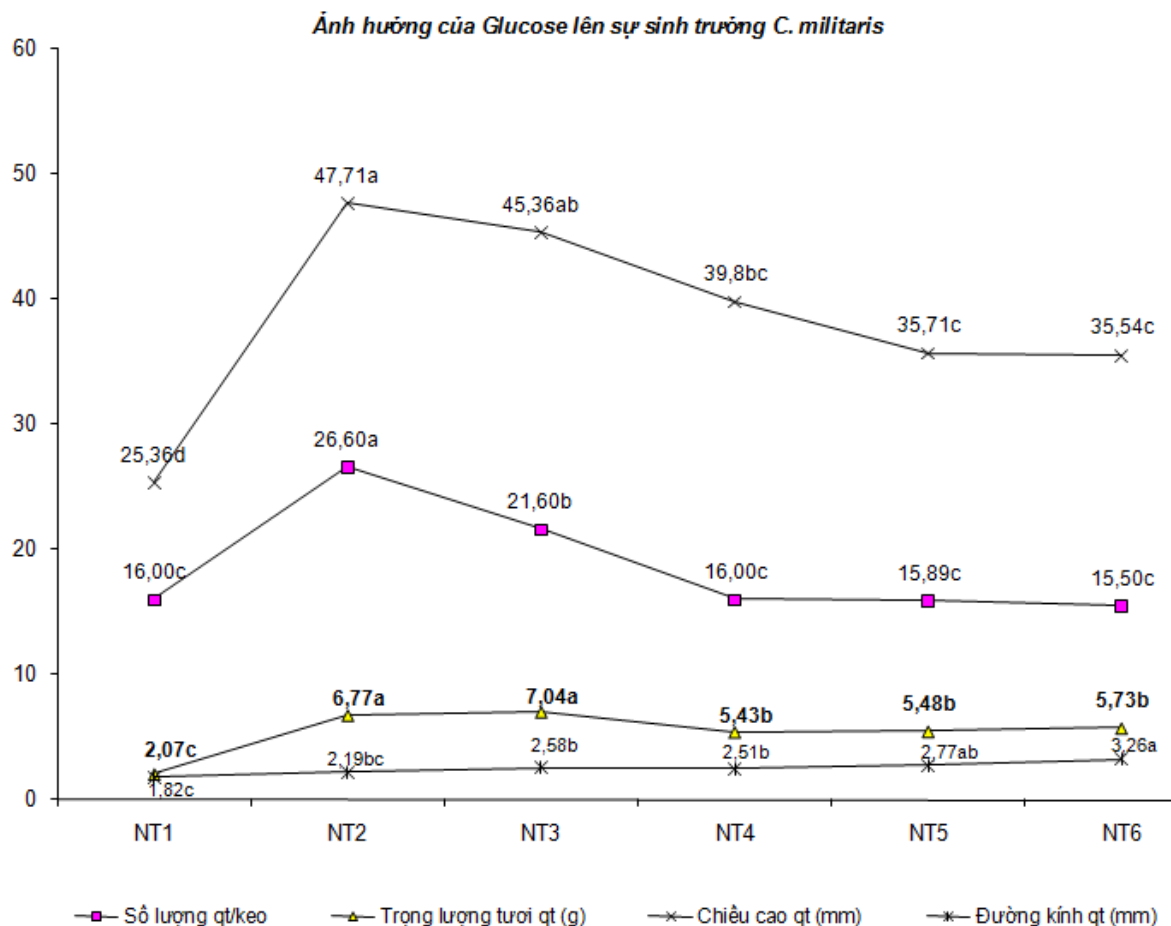
Trọng lượng tươi trung bình quả thể/keo (g) sau 60 ngày cấy giống.

Chiều cao trung bình quả thể/keo (mm) sau 60 ngày cấy giống.

Đường kính trung bình quả thể/keo (mm) sau 60 ngày chủng giống (được đo cách đỉnh quả thể 1 cm).

2.4 Kết quả nghiên cứu

Ảnh hưởng của glucose đến sự sinh trưởng và phát triển quả thể nấm *C. militaris*.



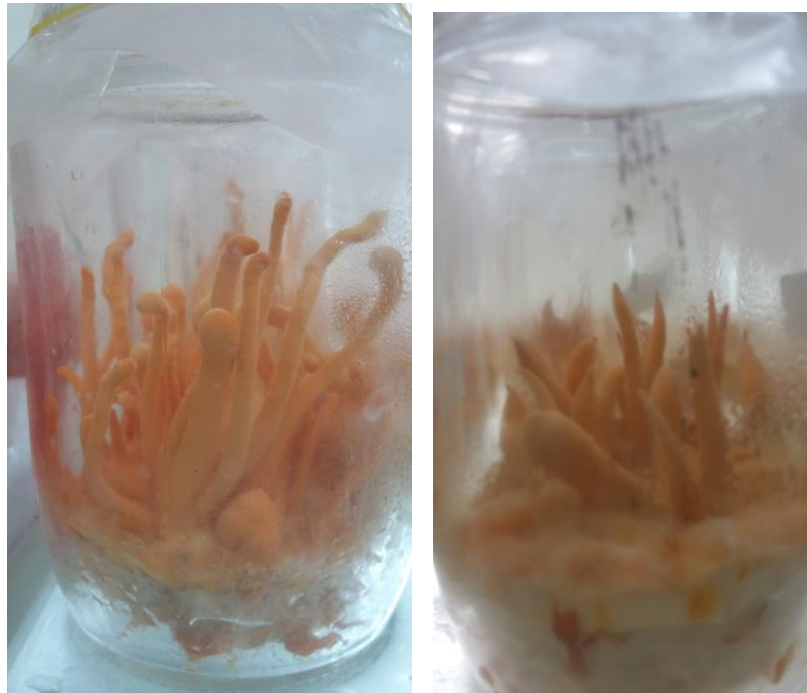
Ghi chú: Trên cùng 1 đường biểu diễn, số có ít nhất 1 chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép kiểm định Duncan ở mức ý nghĩa 1%. Giá trị trong bảng là trung bình của các lần lặp lại. NT1: 0 g/l glucose; NT2: 10 g/l glucose; NT3: 20 g/l glucose; NT4: 30 g/l glucose; NT5: 40 g/l glucose; NT6: 50 g/l glucose.

Hình 3. Biểu đồ thể hiện sự ảnh hưởng của hàm lượng Glucose trong dung dịch dinh dưỡng bổ sung lên sự sinh trưởng nấm *C. militaris*

Thời gian tơ nấm phủ kín môi trường giữa 6 nghiệm thức thí nghiệm dao động từ 10,2 ngày đến 11,1 ngày. Có sự khác biệt rất lớn giữa các nghiệm thức ở các chỉ tiêu sinh trưởng còn lại của nấm *C. militaris*.

Xét về tỷ lệ keo nuôi có nấm hình thành quả thể, ở nghiệm thức 1 (môi trường không bổ sung glucose) chỉ 50% keo nuôi có nấm hình thành quả thể. Nghiệm thức 4 và 5 có tỷ lệ 90% và nghiệm thức 2, 3 và 6 thì 100% keo nuôi có nấm hình thành quả thể. Đối với các chỉ tiêu còn lại, từ kết quả thí nghiệm được trình bày ở hình 3, nhìn chung ở nghiệm thức 1 (không bổ sung glucose) thì số quả thể/keo cũng như đường kính quả thể, chiều cao và trọng lượng quả thể đều đạt thấp nhất. Nghiệm

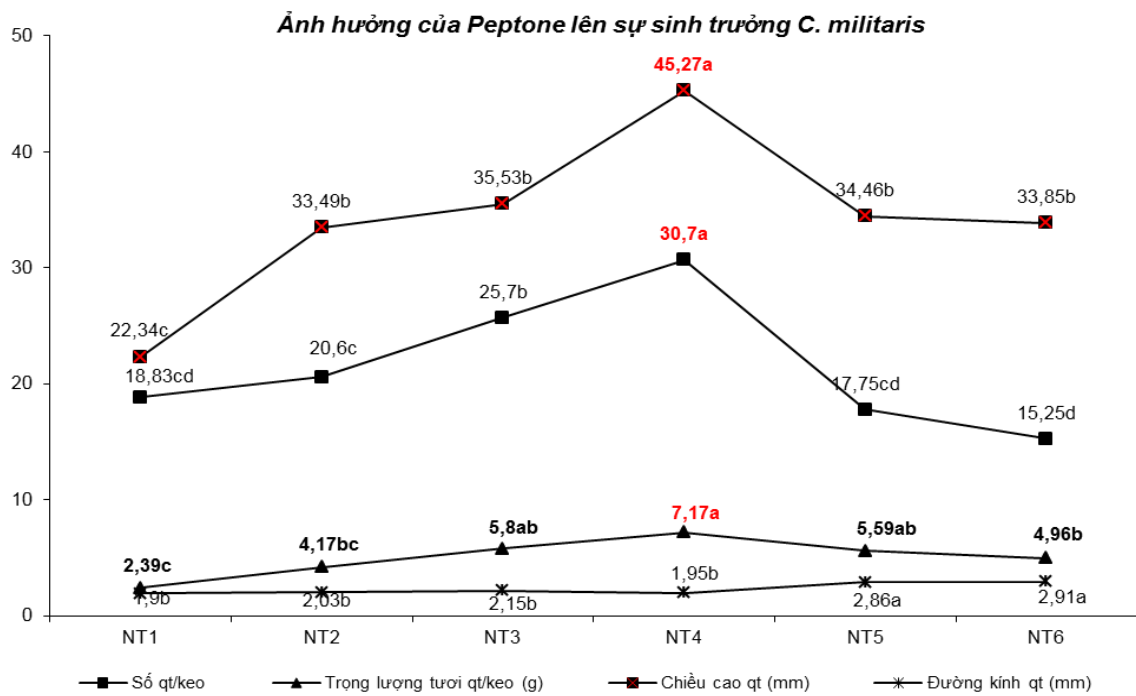
thức 2 (10 g/l glucose) số lượng quả quả thể/keo và chiều cao quả thể đạt cao nhất trong các nghiệm thức thí nghiệm lần lượt là 26,6 quả thể/keo và 47,71 mm/quả thể. Số lượng quả thể giảm khi lượng glucose bổ sung > 10 g/l nhưng đường kính quả thể tăng khi lượng glucose tăng. Nghiệm thức 3 (20 g/l glucose) trọng lượng tươi quả thể đạt được/keo nuôi là cao nhất (7,04 g/keo). Mặc dù số lượng quả thể hình thành và chiều cao quả thể đạt được không bằng ở nghiệm thức 2 (10 g/l glucose) nhưng nghiệm thức 3 (20 g/l glucose) hai chỉ tiêu quan trọng trong nuôi tạo sinh khối nấm *C. militaris* là tỷ lệ keo nuôi hình thành quả thể và trọng lượng tươi quả thể/keo đều đạt cao hơn nghiệm thức 2 nên 20 g/l glucoses được xem là lượng glucose được chọn như giá trị tại tâm để thiết kế thí nghiệm tối ưu hóa môi trường nuôi cấy tạo quả thể nấm *C. militaris*.



Hình 4. Quả thể nấm *C. militaris* ở nghiệm thức 3 (trái) và nghiệm thức 6 (phải) sau 60 ngày chủng giống

Ảnh hưởng của peptone đến sự sinh trưởng và phát triển quả thể nấm *C. militaris*

Sau 10,2 – 11,5 ngày chủng giống tơ nấm *C. militaris* đã phủ kín bề mặt môi trường keo nuôi. Tuy nhiên, sau khi kích thích hình thành quả thể, tỷ lệ keo nuôi nấm *C. militaris* hình thành quả thể ở các nghiệm thức chịu ảnh hưởng bởi lượng peptone thêm vào môi trường. Nghiệm thức 1 chỉ có 60% keo nuôi nấm *C. militaris* hình thành quả thể, nghiệm thức 2, 3 và 4 tỷ lệ này là bằng nhau bằng 100%. Tỷ lệ này giảm chỉ còn 80% khi lượng peptone bổ sung > 15 g (nghiệm thức 5 và 6).



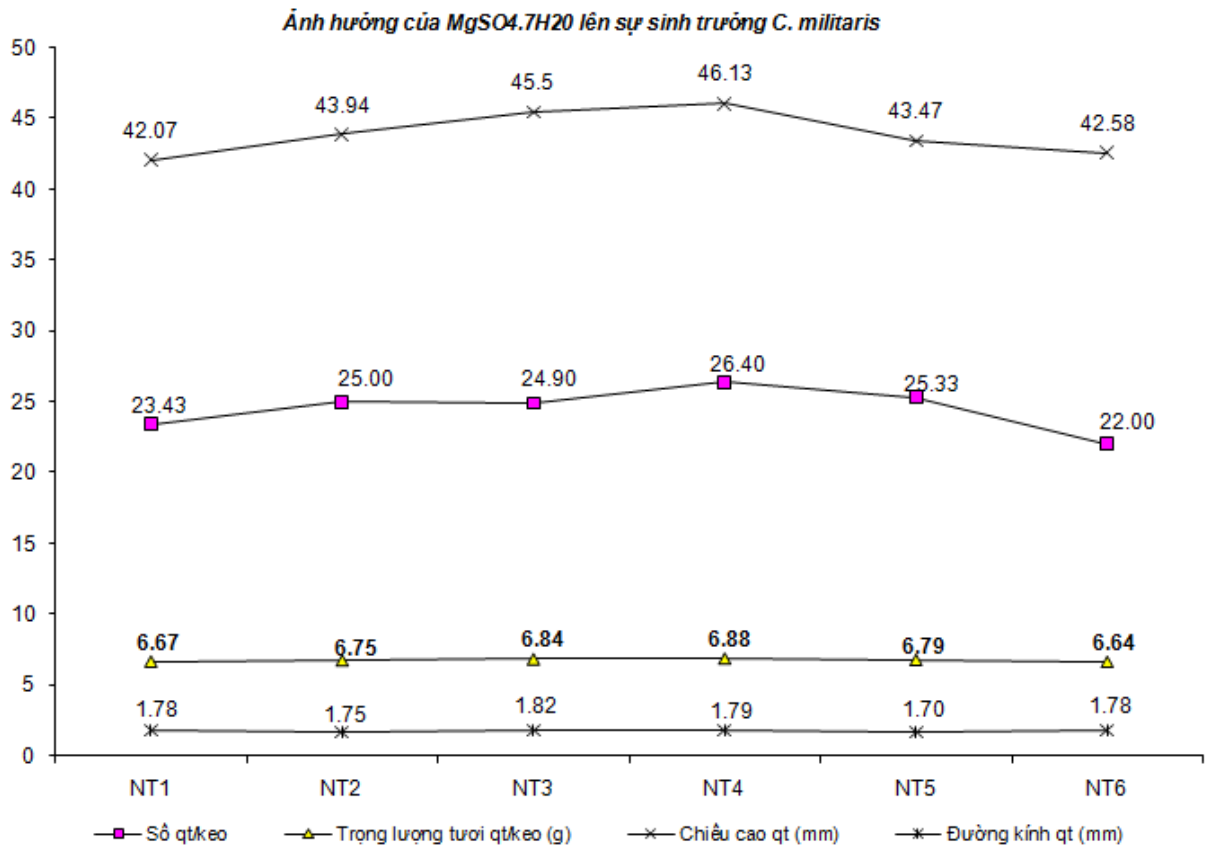
Ghi chú: Trên cùng 1 đường biểu diễn, số có ít nhất 1 chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép kiểm định Duncan ở mức ý nghĩa 1%. Giá trị trong bảng là trung bình của các lần lặp lại. NT1: 0 g/l peptone; NT2: 5 g/l peptone; NT3: 10 g/l peptone; NT4: 15 g/l peptone; NT5: 20 g/l peptone; NT6: 25 g/l peptone.

Hình 5. Biểu đồ thể hiện sự ảnh hưởng của hàm lượng Peptone trong dung dịch dinh dưỡng bổ sung lên sự sinh trưởng nấm *C. militaris*

Biểu đồ biểu diễn kết quả sự ảnh hưởng của lượng peptone trong dịch dinh dưỡng bổ sung đến sự sinh trưởng và phát triển quả thể nấm *C. militaris* (hình 5) cho thấy không bổ sung peptone (nghiệm thức 1) trong môi trường nuôi các chỉ tiêu như trọng lượng tươi quả thể, chiều cao quả thể thấp hơn so với các nghiệm thức khác. Mặc dù có đường kính quả thể nhỏ nhất (1,95 mm) nhưng các chỉ tiêu sinh trưởng của nấm *C. militaris* đạt được đều cao nhất khi nuôi trong môi trường gạo

lúc được bổ sung dung dịch dinh dưỡng có hàm lượng peptone 15 g/l (thí nghiệm thứ 4). Ở thí nghiệm này số lượng quả thể thu được trung bình là 30,7 quả thể/keo, trọng lượng tươi là 7,17 g/keo và chiều cao quả thể là 45,27 mm. Bổ sung peptone với lượng cao hơn 15 g/l mặc dù tơ nấm vẫn phát triển phủ kín bề mặt cơ chất nhưng tỷ lệ keo có quả thể hình thành và số lượng quả thể/keo giảm, quả thể có đặc điểm ngắn, đường kính to hơn so với quả thể được hình thành trên môi trường của các thí nghiệm khác. Qua kết quả cho thấy peptone có ảnh hưởng lớn đến sự sinh trưởng, hình thành và phát triển quả thể nấm *C. militaris*. Chính vì vậy, thành phần này được chọn để tối ưu hóa môi trường dinh dưỡng bổ sung vào gạo lúc để nuôi cấy nấm *C. militaris*.

Ảnh hưởng của $MgSO_4.7H_2O$ đến sự sinh trưởng và phát triển quả thể nấm *C. militaris*.

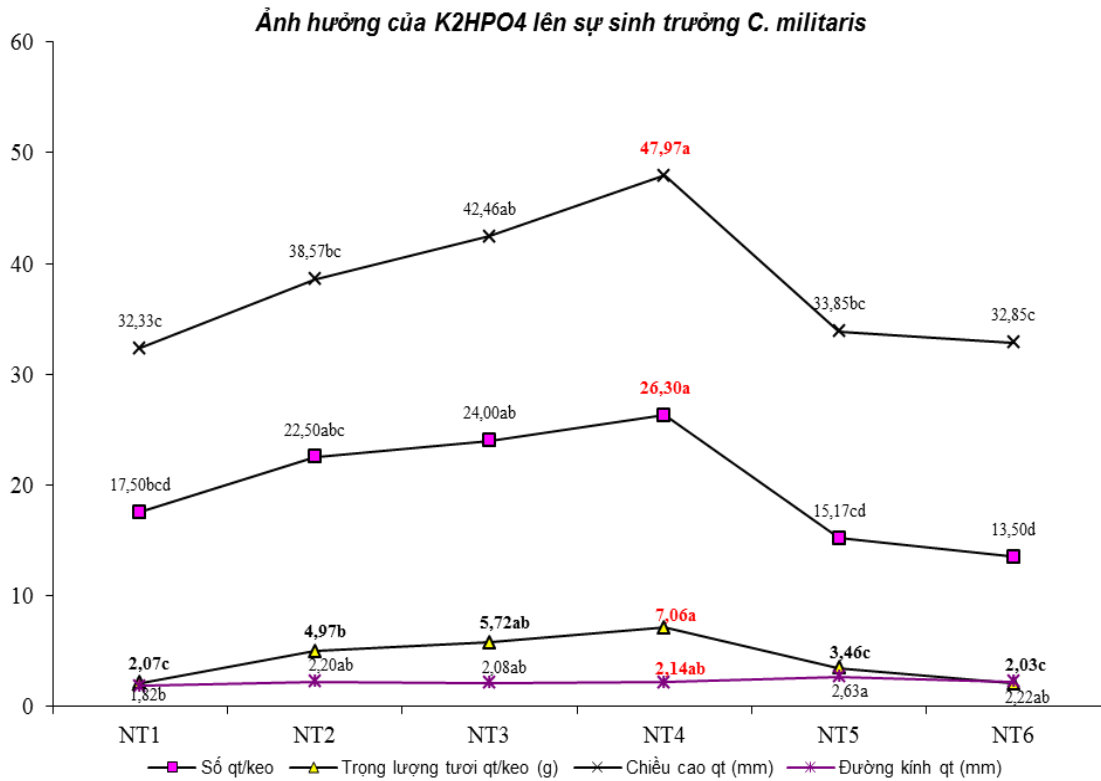


Ghi chú: Giá trị trong bảng là trung bình của các lần lặp lại. NT1: 0 g/l $MgSO_4.7H_2O$; NT2: 0,5 g/l $MgSO_4.7H_2O$; NT3: 1,0 g/l $MgSO_4.7H_2O$; NT4: 1,5 g/l $MgSO_4.7H_2O$; NT5: 2,0 g/l $MgSO_4.7H_2O$; NT6: 2,5 g/l $MgSO_4.7H_2O$.

Hình 6. Biểu đồ thể hiện sự ảnh hưởng của hàm lượng $MgSO_4.7H_2O$ trong dung dịch dinh dưỡng bổ sung lên sự sinh trưởng nấm *C. militaris*.

Hầu hết các chỉ tiêu sinh trưởng của nấm *C. militaris* khác biệt không có ý nghĩa thống kê bởi sự vắng mặt hoặc $MgSO_4.7H_2O$ được bổ sung vào môi trường nuôi cấy với hàm lượng từ 0,5 g/l đến 2,5 g/l (hình 6). Tuy nhiên, tỷ lệ keo nuôi hình thành quả thể đạt cao nhất (100%) khi $MgSO_4.7H_2O$ được bổ sung với lượng 1,0 g/l hoặc 1,5 g/l. Đối với các nghiệm thức còn lại tỷ lệ này dao động từ 70% (nghiệm thức 1) đến 90% (nghiệm thức 2, 5 và 6). Xét về tất cả các chỉ tiêu sinh trưởng cho thấy, $MgSO_4.7H_2O$ bổ sung trong môi trường 1,5 g/l là phù hợp cho sự sinh trưởng, hình thành và phát triển quả thể nấm *C. militaris*. Do không ảnh hưởng nhiều lên các chỉ tiêu sinh trưởng và phát triển của nấm ĐTHT nên khi tối ưu hóa thành phần môi trường nuôi cấy, chúng tôi không chọn $MgSO_4.7H_2O$ để tối ưu mà cố định ở mức 1,5 g/l trong môi trường và chỉ thay đổi hàm lượng các thành phần còn lại được chọn.

Ảnh hưởng của K_2HPO_4 đến sự sinh trưởng và phát triển quả thể nấm *C. militaris*.



Ghi chú: Trên cùng 1 đường biểu diễn, số có ít nhất 1 chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép kiểm định Duncan ở mức ý nghĩa 1%. Giá trị trong bảng là trung bình của các lần lặp lại. NT1: 0 g/l K_2HPO_4 ; NT2: 0,5 g/l K_2HPO_4 ; NT3: 1,0 g/l K_2HPO_4 ; NT4: 1,5 g/l K_2HPO_4 ; NT5: 2,0 g/l K_2HPO_4 ; NT6: 2,5 g/l K_2HPO_4 .

Hình 7. Biểu đồ thể hiện sự ảnh hưởng của hàm lượng K_2HPO_4 trong dung dịch dinh dưỡng bổ sung lên sự sinh trưởng nấm *C. militaris*

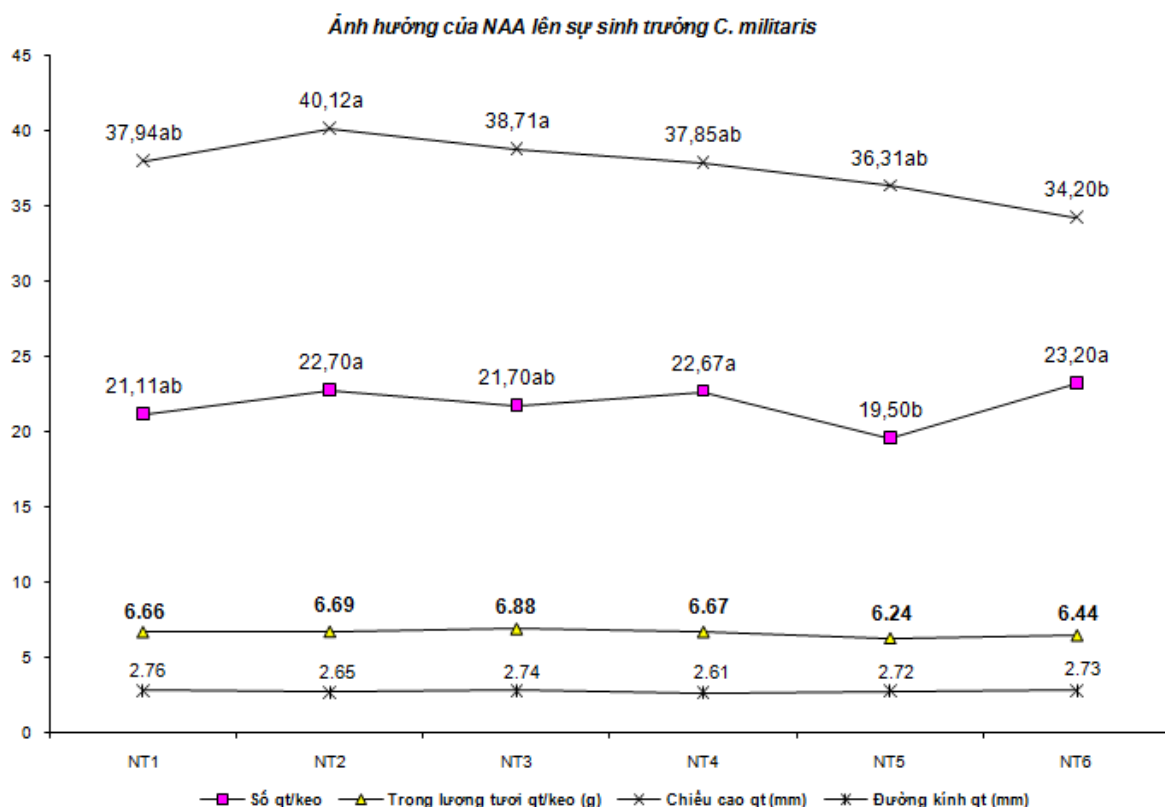
Sau thời gian chủng giống từ 10,2 đến 11,3 ngày, tơ nấm *C. militaris* phủ kín bề mặt môi trường ở các nghiệm thức bổ sung dinh dưỡng có thành hàm lượng K_2HPO_4 khác nhau. Có sự dao động rất lớn về tỷ lệ keo nuôi có nấm *C. militaris* hình thành quả thể ở các nghiệm thức. Chỉ 40% keo nuôi hình thành quả thể khi môi trường nuôi không bổ sung hoặc bổ sung 2,5 g/l K_2HPO_4 . Tỷ lệ này tăng khi lượng K_2HPO_4 tăng (80% ở nghiệm thức 2, 90% nghiệm thức 3 và 100% ở nghiệm thức 4) và giảm còn 60% ở nghiệm thức 5.

Xét các chỉ tiêu sinh trưởng khác như: trọng lượng tươi trung bình quả thể/keo, số lượng quả thể/keo, chiều cao và đường kính quả thể cũng cho thấy sự ảnh hưởng của K_2HPO_4 là rất lớn. Tuy nhiên, các chỉ tiêu sinh trưởng mà đặc biệt là tỷ lệ keo có nấm hình thành quả thể và trọng lượng tươi quả thể/keo đạt cao nhất lần lượt là 100% và 7,06 g/keo khi hàm lượng K_2HPO_4 là 1,5 g/l. Từ kết quả thí nghiệm

được phân tích ở hình 7 chúng tôi chọn K_2HPO_4 là yếu tố để tối ưu hóa môi trường dinh dưỡng với giá trị tại tâm là 1,5 g/l.

Ảnh hưởng của NAA đến sự sinh trưởng và phát triển quả thể nấm *C. militaris*.

Sau thời gian 10,0 đến 10,4 ngày sau khi chủng giống, tơ nấm lan kín bề mặt môi trường ở các nghiệm thức. 90% keo nuôi có nấm *C. militaris* hình thành quả thể ở nghiệm thức 1 và nghiệm thức 4, tỷ lệ này ở các nghiệm thức còn lại là 100%.



Ghi chú: Trên cùng 1 đường biểu diễn, số có ít nhất 1 chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép kiểm định Duncan ở mức ý nghĩa 1%. Giá trị trong bảng là trung bình của các lần lặp lại. NT1: 0 mg/l NAA; NT2: 0,5 mg/l NAA; NT3: 1,0 mg/l NAA; NT4: 1,5 mg/l NAA; NT5: 2,0 mg/l NAA; NT6: 2,5 mg/l NAA.

Hình 8. Biểu đồ thể hiện sự ảnh hưởng của hàm lượng NAA trong dung dịch dinh dưỡng bổ sung lên sự sinh trưởng nấm *C. militaris*

Xét về chiều cao quả thể và số lượng quả thể nấm *C. militaris* hình thành/keo giữa các nghiệm thức có sự khác biệt ý nghĩa thống kê (hình 8) nhưng sự khác biệt này là không lớn. Bên cạnh đó, hai chỉ tiêu còn lại là đường kính quả thể và trọng lượng tươi quả thể/keo không có sự khác biệt. Điều này cho thấy rằng yếu tố NAA ít ảnh hưởng lên sự sinh trưởng, hình thành và phát triển quả thể nấm *C. militaris*. Chính vì vậy, NAA không được chọn để tối ưu hóa mà chỉ cố định ở mức 1,0 mg/l

trong môi trường nuôi cấy vì ở mức này tỷ lệ keo nuôi có nấm hình thành quả thể và trọng lượng tươi quả thể đạt được cao nhất lần lượt là 100% và 6,88 g/keo.

Từ kết quả thu được của thí nghiệm 2, đối với 5 thành phần có trong dung dịch dinh dưỡng bổ sung vào gạo lức được khảo sát, chỉ có 3 thành phần (glucose, peptone và K_2HPO_4) có ảnh hưởng mạnh lên các chỉ tiêu sinh trưởng được ghi nhận của nấm *C. militaris* mà đặc biệt là tỷ lệ keo nuôi hình thành quả thể và trọng lượng tươi quả thể/keo. Chính vì vậy, ba thành phần này với 3 giá trị tại tâm chọn bên trên được sử dụng để thiết kế và thực hiện thí nghiệm tối ưu hóa thành phần dung dịch dinh dưỡng bổ sung vào gạo lức nuôi tạo quả thể nấm *C. militaris*. Hai thành phần còn lại là $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ và NAA được giữ ở mức cố định 1,5 g/l và 1 mg/l.

Chương 3. Tối ưu hóa môi trường nuôi cấy nấm đông trùng hạ thảo (*C. militaris*) trên môi trường gạo lức bổ sung dinh dưỡng.

3.1 Mục đích nghiên cứu

Xác định hàm lượng các thành phần của dịch dinh dưỡng bổ sung vào gạo lức để nuôi nấm *C. militaris* cho sinh khối quả thể đạt cao nhất.

3.2 Phương pháp thực hiện

Sau khi có được giá trị tại tâm (giá trị của mỗi yếu tố mà ở đó có giá trị trọng lượng tươi quả thể/keo đạt cao nhất) từ thí nghiệm 2, tiến hành tối ưu hóa hàm lượng từng thành phần trong dịch dinh dưỡng chũng vào gạo lức đối với các chỉ tiêu có ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển quả thể nấm *C. militaris*. Quá trình tối ưu được thực hiện theo phương pháp đáp ứng bề mặt (Response Surface Methodology) bằng mô hình Box-Behnken Design (BBD) (RSM-BBD) với các giá trị mã hóa, giá trị thực nghiệm và khoảng biến thiên được trình bày ở bảng 6. Phần mềm Design Expert 7.0.0 sử dụng thiết kế thí nghiệm, phân tích phân tích thống kê và chọn giá trị tối ưu để sản xuất quả thể nấm *C. militaris*.

Bảng 6. Giá trị mã hóa, giá trị thực nghiệm, khoảng giá trị biến thiên của 3 yếu tố được sử dụng để thiết kế tối ưu theo mô hình Box-Behnken Design (BBD)

Biến số	Ký hiệu	Đơn vị	Ký hiệu đơn vị mã hóa		
			-1	0	+1
Glucose (A)	X ₁	g/l	10	20	30
Peptone (B)	X ₂	g/l	10	15	20
K ₂ HPO ₄ (C)	X ₃	g/l	1,0	1,5	2,0

Hàm đáp ứng được chọn là trọng lượng tươi quả thể thu được trên keo nuôi (g). Mô hình hóa được biểu diễn bằng phương trình bậc hai:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_1b_2X_1X_2 + b_1b_3X_1X_3 + b_2b_3X_2X_3 + b_1X_1^2 + b_2X_2^2 + b_3X_3^2$$

Trong đó:

- Y là trọng lượng tươi trung bình quả thể/keo nuôi (g).
- X₁, X₂, X₃ là hàm lượng glucose, peptone và KH₂PO₄.
- b₀: là hệ số tự do

- $b_1, b_2, b_3, b_1b_2, b_1b_3, b_2b_3$ là các vectơ tham số của mô hình được xác định qua thực nghiệm.

Qui hoạch thực nghiệm theo phương pháp RSM-BBD được thiết kế bởi phần mềm Design expert 7.0.0 đưa ra ma trận thực nghiệm gồm 17 thí nghiệm trong đó có 5 thí nghiệm (13, 14, 15, 16, 17) lặp lại ở tâm được trình bày ở bảng 7.

Bảng 7. Ma trận thực nghiệm với 3 yếu tố glucose, peptone và KH_2PO_4

TT	Glucose (g/l)	Peptone (g/l)	KH_2PO_4 (g/l)
1	10	10	1,5
2	30	10	1,5
3	10	20	1,5
4	30	20	1,5
5	10	15	1
6	30	15	1
7	10	15	2
8	30	15	2
9	20	10	1
10	20	20	1
11	20	10	2
12	20	20	2
13	20	15	1,5
14	20	15	1,5
15	20	15	1,5
16	20	15	1,5
17	20	15	1,5

Mỗi thí nghiệm của ma trận được xem như 1 nghiệm thức với mỗi nghiệm thức gồm 5 keo) bao gồm 20g gạo lức/keo được bổ sung 30 ml dung dịch dinh dưỡng/keo bao gồm: 1,5 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 1 mg/l NAA; 3 thành phần còn lại gồm glucose, peptone, KH_2PO_4 với lượng bổ sung tương ứng với giá trị ở bảng 7. pH được điều chỉnh = 5,6. Môi trường được khử trùng 30 phút ở $121^{\circ}C$ sau đó để nguội ở nhiệt độ phòng.

Chủng giống: 5ml giống được chủng vào môi trường nuôi cấy được chuẩn bị bên trên.

Nuôi tạo quả thể: môi trường sau khi chủng giống được nuôi ở nhiệt độ 25°C ở điều kiện tối hoàn toàn để tơ nấm phát triển. Khi tơ nấm lan đầy môi trường, nhiệt độ và ánh sáng được điều chỉnh nhằm kích thích sự hình thành quả thể nấm với 23°C, 500 lux 12 giờ và 16°C trong 12 giờ ở điều kiện tối hoàn toàn, thời gian 8 ngày. Khi quả thể nhú mầm trên môi trường, nhiệt độ phòng nuôi quả thể được điều chỉnh 25°C, cường độ chiếu sáng 500 lux, ẩm độ điều chỉnh 90-95%.

Chỉ tiêu theo dõi: Trọng lượng tươi trung bình quả thể/keo (g) sau 60 ngày chủng giống.

3.4 Kết quả nghiên cứu

Bảng 8. Ma trận thực nghiệm với 3 yếu tố glucose, peptone và KH₂PO₄ và kết quả thí nghiệm

TT	Glucose (g/l)	Peptone (g/l)	KH ₂ PO ₄ (g/l)	Trọng lượng tươi (g)
1	10	10	1,5	6,93
2	30	10	1,5	6,72
3	10	20	1,5	6,9
4	30	20	1,5	6,13
5	10	15	1	7,02
6	30	15	1	6,87
7	10	15	2	6,35
8	30	15	2	6,12
9	20	10	1	6,77
10	20	20	1	6,25
11	20	10	2	6,09
12	20	20	2	5,95
13	20	15	1,5	8,00
14	20	15	1,5	7,94
15	20	15	1,5	8,07
16	20	15	1,5	8,12
17	20	15	1,5	8,21

Sự có ý nghĩa của hệ số hồi qui được kiểm định bởi chuẩn F, với những giá trị $P < 0,05$ cho thấy hệ số hồi qui có ý nghĩa. Từ kết quả thí nghiệm đạt được trình bày ở bảng 8 và kết quả phân tích phương sai tối ưu hóa mô hình các yếu tố được trình bày ở bảng 9 cho thấy: Mô hình toán học được thiết kế có giá trị $F = 70,20923$ và hoàn toàn có ý nghĩa về mặt thống kê với độ tin cậy 99,99% ($P < 0,0001$). Thông

qua giá trị P trong bảng ta được các biến glucose, peptone, $\text{KH}_2\text{PO}_4 < 0,01$ điều này chứng tỏ hàm mục tiêu (trọng lượng tươi quả thể) chịu ảnh hưởng lớn bởi 3 yếu tố được khảo sát, tuy nhiên sự tương tác của 3 yếu tố này trong môi trường có ảnh hưởng rất ít đến hàm mục tiêu ($P > 0,05$).

Bảng 9. Bảng phân tích phương sai tối ưu hóa mô hình các yếu tố

Yếu tố	Tổng bình phương	Bậc tự do (df)	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị P Prob > F	Tin cậy
Mô hình	10,22567	9	1,136186	70,20923	0.0001	Tin cậy
A-Glucose	0,2312	1	0,2312	14,28672	0.0069	
B-Peptide	0,2048	1	0,2048	12,65537	0.0093	
C-KH₂PO₄	0,72	1	0,72	44,49153	0.0003	
AB	0,0784	1	0,0784	4,844633	0.0636	
AC	0,0016	1	0,0016	0,09887	0.7624	
BC	0,0361	1	0,0361	2,230756	0.1789	
A²	1,211925	1	1,211925	74,88945	0.0001	
B²	3,124978	1	3,124978	193,1042	0.0001	
C²	3,732304	1	3,732304	230,6332	<0.0001	
Phần dư	0,11328	7	0,016183			
Sự không tương thích	0,0694	3	0,023133	2,108782	0.2419	Không tin cậy
Sai số thuần	0,04388	4	0,01097			
Tổng tương quan	10,33895	16				

Thêm vào đó, chuẩn F của sự không tương thích là 2,108782 ($P = 0,2419$) và kết quả phân tích sự phù hợp của mô hình với thực nghiệm được trình bày ở bảng 10 cho giá trị R^2 gần bằng 1 điều đó chứng tỏ mô hình hoàn toàn phù hợp với thực nghiệm.

Bảng 10. Kết quả phân tích sự phù hợp của mô hình với thực nghiệm

Thông số	Giá trị	Thông số	Giá trị
Độ lệch chuẩn	0,127212	R ²	0,989043
Giá trị trung bình	6,967059	R ² điều chỉnh	0,974956
Hệ số biến thiên	1,825905	R ² dự đoán	0,885969
Tổng bình phương phần dư dự đoán (PRESS)	1,178963	Độ chính xác phù hợp (Adeq Precision)	22,22062

Từ những kết quả phân tích có ý nghĩa trên, hàm mục tiêu được phần mềm đưa ra và được biểu diễn theo phương trình cụ thể sau:

$$Y = -8,69 + 0,2456X_1 + 1,0008X_2 + 10,208X_3 - 0,0028X_1X_2 - 0,004X_1X_3 + 0,038X_2X_3 - 0,005365X_1^2 - 0,03446X_2^2 - 3,766X_3^2$$

Trong đó:

Y là trọng lượng tươi quả thể/keo nuôi (g);

X₁, X₂, X₃ là giá trị hàm lượng glucose, peptone và KH₂PO₄.

Kết quả tối ưu hóa các thành phần môi trường để đạt trọng lượng tươi quả thể/keo nuôi cao nhất được thực hiện thông qua các thuật toán. Kết quả chỉ ra rằng 3 yếu tố tối ưu gồm glucose, peptone và KH₂PO₄ lần lượt đạt lần lượt là 18,56 g/l, 14,55 g/l và 1,42 g/l và giá trị trọng lượng tươi quả thể cao nhất đạt được từ mô hình là 8,11 g/keo. Cùng với hai yếu tố MgSO₄ và NAA chọn được từ thí nghiệm 2, thành phần dung dịch dinh dưỡng bổ sung vào môi trường gạo lúc để nuôi cấy nấm *C. militaris* cụ thể là: 18,56 g/l glucose; 14,55 g/l peptone; 1,42 g/l KH₂PO₄; 1,5 g/l MgSO₄ và 1,0 mg/l NAA.

Để đánh giá sự phù hợp kết quả dự đoán từ mô hình thống kê so với thực nghiệm, chúng tôi tiến hành thực nghiệm để kiểm chứng với 10 keo nuôi với mỗi keo chứa 20 chứa gạo lúc được chủng 30 ml dung dịch dinh dưỡng với thành phần: 18,56 g/l glucose; 14,55 g/l peptone; 1,42 g/l KH₂PO₄; 1,5 g/l MgSO₄ và 1,0 mg/l NAA.

Sau thời gian chủng giống, nuôi tạo quả thể ghi nhận được kết quả:

- + Trọng lượng tươi trung bình quả thể/keo nuôi sau 60 ngày chủng giống là 8,01 g.
- + Sau 10,55 ngày chủng giống, nấm lan tơ phủ kín bề mặt môi trường nuôi.
- + Tỷ lệ keo hình thành quả thể là 100% với số quả thể/keo.
- + Số lượng quả thể/keo đạt 24,29 quả thể.

+ Chiều cao trung bình quả quả thể/keo nuôi là 32,67mm/quả thể với đường kính quả thể trung bình 2,48 mm.

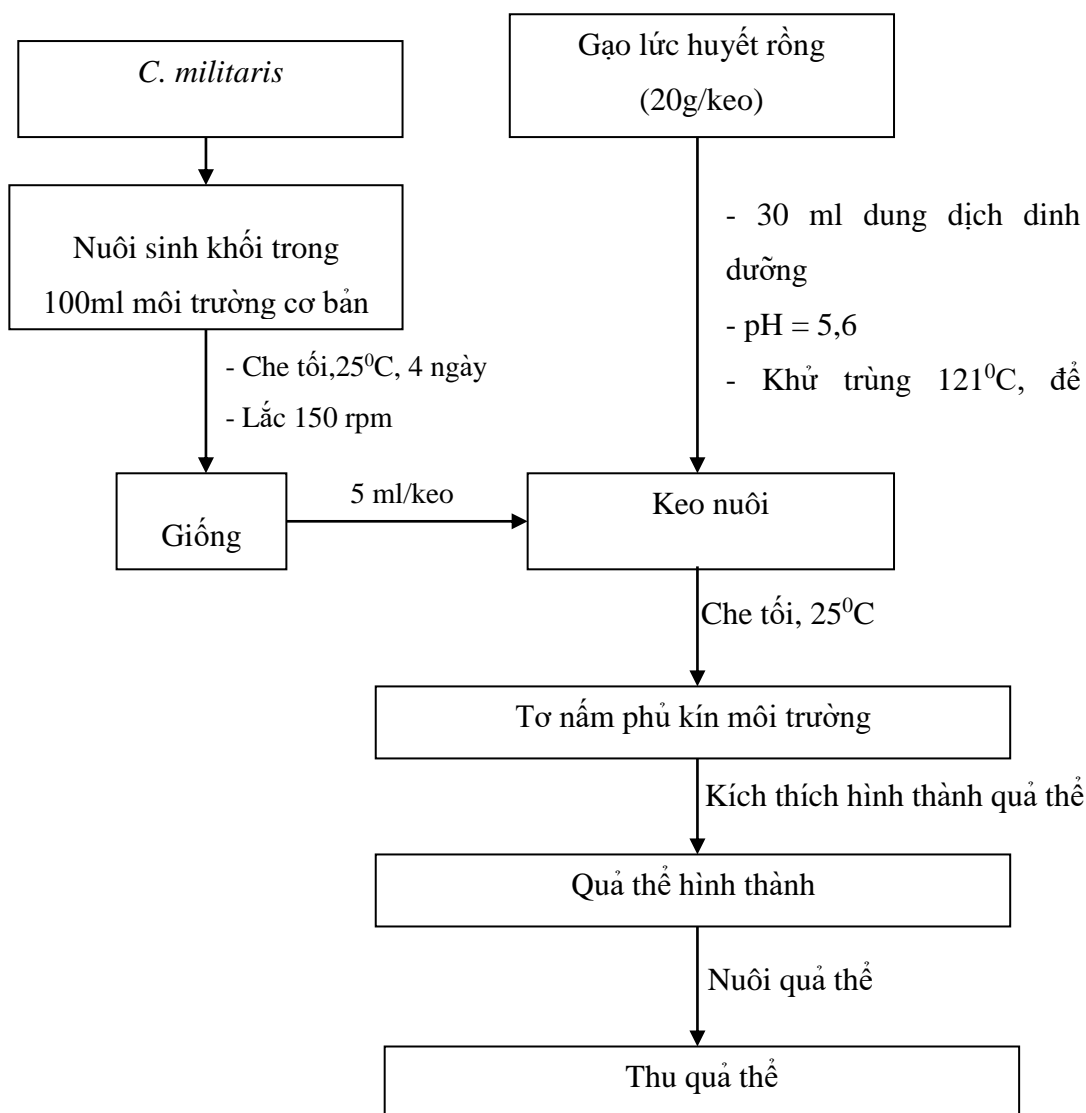
Kết quả này cho thấy kết quả thực nghiệm đạt được trọng lượng tươi trung bình quả thể (8,01 g/keo) tương đương với kết quả dự đoán từ mô hình (8,11 g/keo).



Hình 9. Quả thể nấm ĐTHT (*C. militaris*) trên môi trường gạo lức bổ sung dinh dưỡng ở nghiệm thức tối ưu (trái) và quả thể được gửi đi phân tích Cordycepin và Adenosine (phải)

Kết quả phân tích hàm lượng Cordycepin và Adenosin trong quả thể nấm ĐTHT (*C. militaris*) nuôi ở nghiệm thức được tối ưu hóa cho thấy hàm lượng Cordycepin và adenosin đạt được lần lượt là 6,02 mg/g và 0,08 mg/g.

Từ kết quả đạt được của các thí nghiệm 1, 2 và 3 qui trình nuôi nấm ĐTHT (*C.militaris*) trên môi trường gạo lức bổ sung dung dịch dinh dưỡng được tóm tắt bằng sơ đồ ở hình 10



Hình 10. Sơ đồ tóm tắt qui trình nuôi nấm ĐTHT (*C. militaris*) trên môi trường gạo lứt bổ sung dinh dưỡng

Mô tả qui trình nuôi nấm ĐTHT (*C. militaris*) trên môi trường gạo lứt bổ sung dinh dưỡng

Qui trình nuôi nấm ĐTHT (*C. militaris*) được thực hiện như sau: Giống nấm *C. militaris* trên môi trường PSA (Potato sucrose agar) được tiếp tục nuôi trong môi trường cơ bản (20 g/l sucrose, 20 g/l peptone, 0.5 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ và 1g/l K_2HPO_4) ở điều kiện 25°C thời gian 4 ngày trên máy lắc với tốc độ 150 rpm để lấy dịch nuôi.

20 g gạo lứt huyết rồng được cho vào các keo nuôi thủy tinh có đường kính 8 cm, cao 12 cm.

30 ml dung dịch dinh dưỡng với thành phần: 18,56 g/l glucose; 14,55 g/l peptone; 1,42 g/l KH_2PO_4 ; 1,5 g/l $MgSO_4$ và 1,0 mg/l NAA có pH = 5,6 được bổ

sung vào keo nuôi bên trên. Đậy nắp. Khử trùng ở nhiệt độ 121⁰C, thời gian 20 phút. Để nguội ở nhiệt độ phòng.

5 ml dịch nuôi nấm *C. militaris* được chủng vào keo nuôi có chứa gạo lức và dung dịch dinh dưỡng đã được khử trùng. Sau đó nắp đậy keo được thay bằng bịch nilon đã được khử trùng.

Keo nuôi được đưa vào phòng ủ tơ có nhiệt độ 25⁰C, điều kiện che tối hoàn toàn cho đến khi tơ nấm phủ kín bề mặt môi trường.

Đưa keo nuôi vào phòng nuôi và kích thích hình thành quả thể ở điều kiện: 23⁰C, 500 lux 12 giờ vào ban ngày và 17⁰C trong 12 giờ ở điều kiện tối hoàn toàn vào ban đêm, ẩm độ điều chỉnh 90-95%, thời gian 8 ngày.

Khi quả thể nhú mầm bằng ngòi bút bi tiến hành nuôi quả thể ở điều kiện 25⁰C, 500 lux trong 14 giờ và điều kiện tối hoàn toàn ở 25⁰C trong 10 giờ.

Sau 60 ngày chủng giống tiến hành thu hoạch quả thể.

Chương 4. Nuôi tạo quả thể nấm đông trùng hạ thảo (*C. militaris*) trên môi trường gạo lứt được bổ sung nhộng tằm xay

4.1 Mục đích nghiên cứu

Xác định lượng nhộng tằm xay bổ sung thích hợp nhất cho sự sinh trưởng, hình thành và phát triển quả thể nấm đông trùng hạ thảo (*C. militaris*).

4.2 Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, 1 nhân tố (lượng nhộng tằm xay bổ sung), 5 nghiệm thức (mỗi nghiệm thức ứng với 1 lượng nhộng tằm xay bổ sung: 0,0; 5; 10; 15; 20g), 10 lần lặp lại với mỗi lần lặp lại là một hộp polypropylene 1000 ml

4.3 Phương pháp thực hiện

Chuẩn bị môi trường nuôi: môi trường nuôi tạo quả thể nấm đông trùng hạ thảo (*C. militaris*) bao gồm 50 g gạo lứt/hộp nuôi được bổ sung 50 ml nước cất và nhộng tằm được xay nhuyễn với 5 mức độ (0,0; 5; 10; 15; 20g). Môi trường được khử trùng 30 phút ở 121⁰C sau đó được để nguội ở nhiệt độ phòng.

Chủng giống: 25 ml giống được chủng vào môi trường nuôi cấy được chuẩn bị bên trên.

Nuôi tạo quả thể: môi trường sau khi chủng giống được nuôi ở nhiệt độ 25⁰C ở điều kiện tối hoàn toàn để tơ nấm phát triển. Khi tơ nấm lan đầy môi trường, nhiệt độ và ánh sáng được điều chỉnh nhằm kích thích sự hình thành quả thể nấm với 23⁰C, 500 lux 12 giờ vào ban ngày và 16⁰C trong 12 giờ ở điều kiện tối hoàn toàn vào ban đêm, thời gian 12 ngày. Khi quả thể nhú mầm trên môi trường, nhiệt độ phòng nuôi quả thể được điều chỉnh 25⁰C, cường độ chiếu sáng 500 lux, ẩm độ điều chỉnh 90-95%.

Chỉ tiêu theo dõi

Thời gian tơ nấm ăn kín môi trường (NSC): khi tơ nấm phủ kín bề mặt môi trường.

Thời gian quả thể bắt đầu hình thành hình thành (NSC): được tính khi có keo đầu tiên ở mỗi nghiệm thức có mầm quả thể bằng ngòi bút nhú lên từ môi trường.

Tỷ lệ (%) keo có nấm hình thành quả thể ở các nghiệm thức: số keo có quả thể hình thành/tổng số keo nuôi x 100.

Số lượng quả thể/keo sau 60 ngày cấy giống (quả thể có chiều cao > 1cm).

Trọng lượng tươi trung bình quả thể/keo (g) sau 60 ngày cấy giống.

Chiều cao trung bình quả thể/keo (mm) sau 60 ngày cấy giống.

Đường kính trung bình quả thể/keo (mm) sau 60 ngày chủng giống (được đo cách đỉnh quả thể 1 cm).

4.4 Kết quả nghiên cứu

Đạm là nguyên tố cần thiết cho sự sinh trưởng và phát triển vi sinh vật trong đó có nấm *C. militaris*. Việc bổ sung nhộng tằm vào môi trường nuôi nhằm bổ sung nguồn đạm cho nấm sinh trưởng và phát triển.

Bảng 11. Ảnh hưởng của lượng nhộng tằm xay bổ sung đến sự hình thành và phát triển của quả thể nấm ĐTHT

Thí nghiệm	Chỉ tiêu sinh trưởng					
	Thời gian tơ nấm ăn kín bề mặt môi trường (NSC)	Tỷ lệ keo có quả thể (%)	Số lượng quả thể/hộp	Trọng lượng tươi quả thể/hộp (g)	Chiều cao quả thể/hộp (mm)	Đường kính quả thể/hộp (mm)
NT1 (0g)	10,9	50	30,60 ^{ab}	2,24 ^b	21,63 ^d	0,92 ^d
NT2 (5g)	10,5	100	34,40 ^a	9,91 ^a	53,82 ^a	1,47 ^c
NT3 (10g)	10,3	90	28,11 ^{abc}	10,14 ^a	42,79 ^b	2,09 ^{ab}
NT4 (15g)	10,2	80	25,13 ^{bc}	8,88 ^a	34,69 ^{bc}	2,27 ^a
NT5 (20g)	10,1	80	19,63 ^c	8,65 ^a	32,69 ^{cd}	2,06 ^b
F			**	**	**	**
CV (%)			23,21	37,43	19,09	8,38

Ghi chú: Trong cùng một hàng, số có ít nhất một chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê khi dùng phép kiểm định LSD, (**): khác biệt ở mức ý nghĩa 1%. Các giá trị trong bảng là trung bình của các lần lặp lại.

Thời gian tơ nấm ăn kín bề mặt môi trường phụ thuộc vào lượng nhộng tằm xay bổ sung vào môi trường nuôi cấy, lượng nhộng tằm bổ sung càng nhiều tơ nấm lan càng nhanh nên thời gian phủ kín bề mặt môi trường ngắn (bảng 11). Chỉ 50% số keo nuôi có nấm hình thành quả thể khi môi trường chỉ có gạo lức không có bổ sung nhộng tằm xay nhưng có đến 100% số hộp nuôi có nấm hình thành quả thể khi bổ sung nhộng tằm với lượng 5 g/hộp. Tuy nhiên, tỷ lệ này giảm khi số lượng nhộng tằm bổ sung > 5 g/keo.

Bên cạnh đó kết quả thí nghiệm còn cho thấy số lượng quả thể nấm *C. militaris* phụ thuộc vào lượng nhộng tằm xay bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Mặc dù môi trường nuôi cấy chỉ gồm gạo lức và nước nhưng số lượng quả thể đạt tương đối cao (30,6 quả thể/hộp nuôi). Số lượng quả thể đạt cao nhất (34,4 quả thể/hộp nuôi) khi bổ sung 5 g nhộng tằm xay vào mỗi hộp môi trường nuôi. Tuy nhiên, số lượng quả thể/hộp nuôi giảm khi lượng nhộng tằm xay bổ sung tăng cao và đạt thấp nhất (19,63 quả thể/hộp nuôi) khi bổ sung 20g nhộng tằm xay/hộp nuôi.

Mặc dù ở nghiệm thức 1 (môi trường chỉ có gạo lức không bổ sung nhộng tằm xay) số lượng quả thể nấm *C. militaris* hình thành nhiều hơn các nghiệm thức có bổ sung nhộng tằm nhưng xét về các chỉ tiêu sinh trưởng và phát triển khác như: kích thước quả thể, đường kính quả thể và trọng lượng quả thể/hộp nuôi đều thấp hơn so với các môi trường nuôi được bổ sung nhộng tằm. Điều này cho thấy rằng, với môi trường chỉ gồm ngũ cốc sự phát triển quả thể rất yếu.

Trọng lượng quả thể ở các môi trường bổ sung nhộng tằm xay khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 1%. Nghiệm thức 3 (bổ sung 10 g nhộng tằm xay) có trọng lượng trung bình quả thể/hộp nuôi đạt cao nhất (10,14 g/hộp nuôi) kế đến là nghiệm thức 2, nghiệm thức 4. Mặc dù trọng lượng quả thể trung bình/hộp nuôi ở nghiệm thức 3 cao hơn nghiệm thức 2 là 0,23 g nhưng chiều cao trung bình quả thể/hộp nuôi ở nghiệm thức 2 cao hơn giá trị này ở nghiệm thức 3 là 11,03 mm. Do có trọng lượng thấp hơn, chiều cao lại cao hơn nên đường kính quả thể nấm *C. militaris* được nuôi ở môi trường nghiệm thức 2 nhỏ hơn so với nghiệm thức 3.



Hình 11. Quả thể nấm ĐTHT (*C. militaris*) Trên môi trường gạo lức bổ sung nhộng tằm xay sau 60 ngày chủng giống.

Nhìn chung, với lượng nhộng tằm bổ sung cao hơn 10 g/hộp nuôi quả thể nấm *C. militaris* vẫn hình thành nhưng quả thể có đặc điểm là quả thể to, thấp, số lượng quả thể ít, trọng lượng quả thể trung bình đạt được trên hộp nuôi thấp. Nghiên cứu được báo cáo bởi Gao et al. (2000) cho thấy hầu hết các dòng *C. militaris* yêu cầu hàm lượng đạm tương đối thấp, ở nồng độ đạm cao có thể ức chế sự hình thành quả thể nên dẫn đến năng suất nấm nuôi trên côn trùng thường thấp hơn trên ngũ cốc. Nghiên cứu tương tự được thực hiện bởi Kim et al. (2010) trên chủng nấm *Cordyceps cardinalis* cũng cho thấy rằng việc bổ sung nhộng tằm vào môi trường nuôi làm tăng chiều cao và trọng lượng tươi quả thể nhưng lượng bổ sung lớn hơn 15 g/hộp nuôi làm cho quả thể ngắn hơn và giảm năng suất.

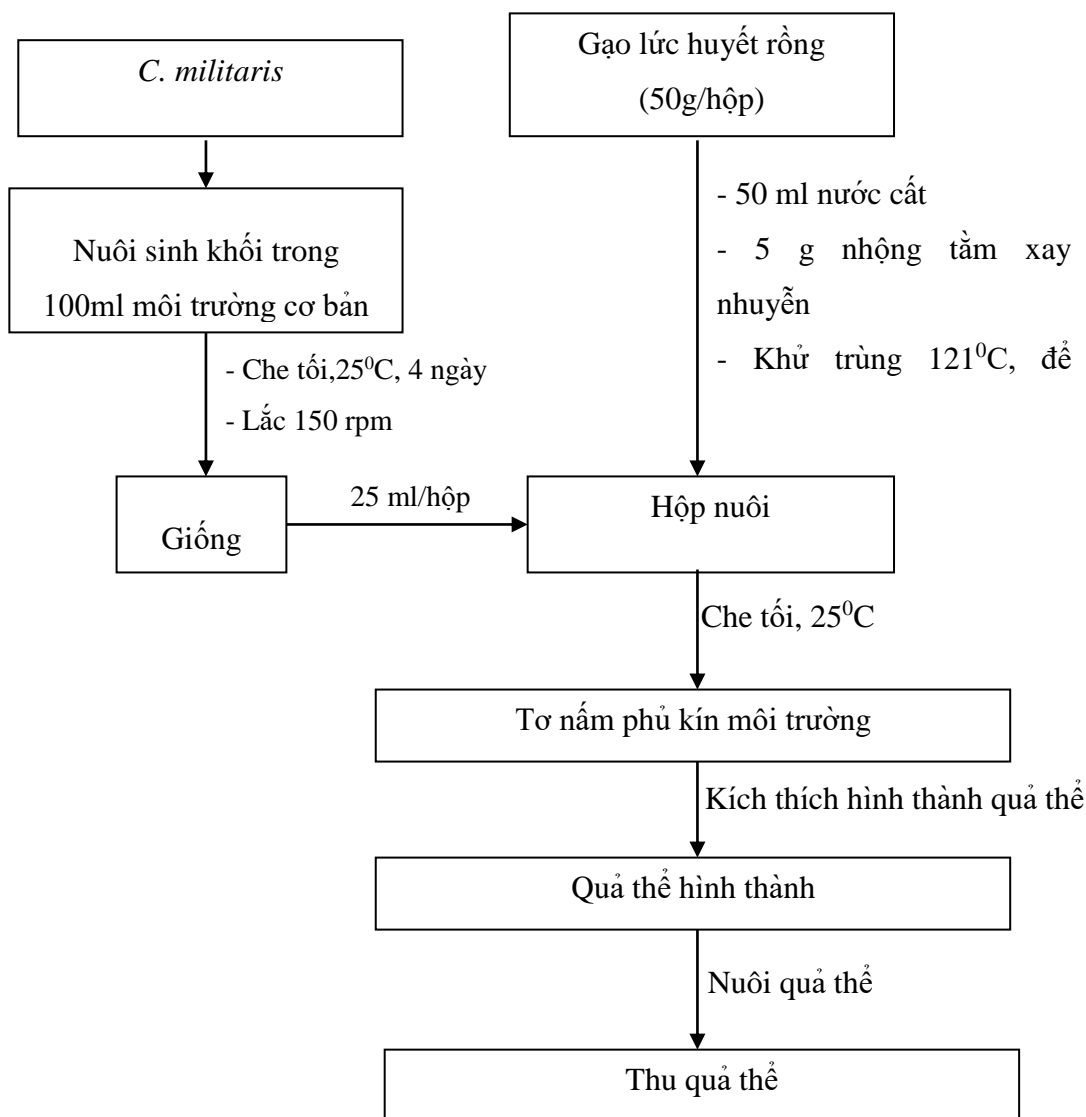
Từ kết quả trên, chúng tôi chọn nghiệm thức 2 (5 g nhộng tằm xay/hộp) vì ở nghiệm thức này tuy có trọng lượng quả thể thấp hơn nghiệm thức 2 nhưng có đến 100% keo nuôi có nấm *C. militaris* hình thành quả thể.

Quả thể nấm *C. militaris* và phần cơ chất nuôi (gạo lức có chứa tơ nấm) ở nghiệm thức 2 được phơi khô ở nhiệt độ phòng lạnh (17⁰C) trong thời gian 3 ngày và gửi phân tích Cordycepin và Adenosine, hai thành phần có hoạt tính sinh học và có giá trị dược liệu cao trong nấm ĐTHT *C. militaris*, kết quả phân tích như sau:

Quả thể có hàm lượng Cordycepin và Adenosine đạt lần lượt là 10,08 mg/g và 0,57 mg/l; cơ chất nuôi (gạo lức có chứa tơ nấm) hàm lượng Cordycepin là 3,44 mg/g và Adenosine là 0,09 mg/g. Kết quả này cho thấy rằng hàm lượng Cordycepin và Adenosine trong quả thể cao hơn trong cơ chất nuôi và trong quả thể nuôi trên môi trường gạo lức bổ sung nhộng tằm xay cao hơn so với quả thể nuôi trên gạo lức bổ sung dinh dưỡng là các khoáng chất và đạm hữu cơ ở thí nghiệm 3.

So sánh với các kết quả phân tích quả thể khô nấm *C. militaris* trước đây được công bố bởi các công ty như: Công ty cổ phần dược thảo Thiên Phúc (Cordycepin (6,19 mg/g) và adenosine (0,26) (ngày 30/1/2015) và ngày 06/2/2015 với Cordycepin (10,028 mg/g); Adenosine (10,64 mg/g); Công ty Nấm Ta phân công bố là Cordycepin: 3,34 mg/g. Từ các kết quả trên cho thấy hàm lượng Cordycepin và Adenosin trong quả thể nấm *C. militaris* mà chúng tôi trồng trên giá thể gạo lức bổ sung dinh dưỡng hoặc nhộng tằm và gửi phân tích có lúc cao hơn nhưng cũng có lúc thấp hơn so với các kết quả được công bố bởi các công ty. Tuy nhiên, hàm lượng hai chất này phụ thuộc nhiều vào chủng nấm *C. militaris*, thể hệ giống, điều kiện nuôi. Chính vì vậy, mỗi mẻ sản xuất các công ty thường kiểm tra sản phẩm trước khi bán ra thị trường. Do đó, nên cần có các nghiên cứu sâu hơn về ảnh hưởng của các yếu tố dinh dưỡng và điều kiện nuôi đến hàm lượng Cordycepin và adenosine.

Từ kết quả thí nghiệm 1 và 4, qui trình nuôi nấm *C. militaris* trên môi trường gạo lức bổ sung nhộng tằm xay được tóm tắt như hình 12.



Hình 12. Sơ đồ tóm tắt qui trình nuôi nấm ĐTHT (*C. militaris*) trên môi trường gạo lứt bổ sung nhộng tằm xay

Mô tả qui trình nuôi nấm ĐTHT (*C. militaris*) trên môi trường gạo lứt bổ sung nhộng tằm xay.

Qui trình nuôi nấm ĐTHT (*C. militaris*) trên môi trường gạo lứt bổ sung nhộng tằm xay được thực hiện như sau: Giống nấm *C. militaris* trên môi trường PSA (Potato sucrose agar) được tiếp tục nuôi trong môi trường cơ bản (20 g/l sucrose, 20 g/l peptone, 0.5 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ và 1g/l K_2HPO_4) ở điều kiện 25°C thời gian 4 ngày trên máy lắc với tốc độ 150 rpm để lấy dịch nuôi.

50 g gạo lứt huyết rồng được cho vào các hộp nhựa 1000 ml.

Bổ sung 5 g nhộng tằm đã được xay nhuyễn vào mỗi hộp nhựa

Sau đó cho 50 ml nước cất vào. Trộn đều. Đậy nắp. Khử trùng ở nhiệt độ 121⁰C, thời gian 20 phút. Để nguội ở nhiệt độ phòng.

25 ml dịch nuôi nấm *C. militaris* được chủng vào hộp nuôi có chứa gạo lức và nước cất đã được khử trùng. Sau đó nắp đậy được thay bằng bịch nilon đã được khử trùng.

Hộp nuôi được đưa vào phòng ủ tơ có nhiệt độ 25⁰C, điều kiện che tối hoàn toàn cho đến khi tơ nấm phủ kín bề mặt môi trường.

Đưa hộp nuôi vào phòng nuôi và kích thích hình thành quả thể ở điều kiện: 23⁰C, 500 lux 12 giờ vào ban ngày và 17⁰C trong 12 giờ ở điều kiện tối hoàn toàn vào ban đêm, ẩm độ điều chỉnh 90-95%, thời gian 8 ngày.

Khi quả thể nhú mầm bằng ngòi bút bi tiến hành nuôi quả thể ở điều kiện 25⁰C, 500 lux trong 14 giờ và điều kiện tối hoàn toàn ở 25⁰C trong 10 giờ.

Sau 60 ngày chủng giống tiến hành thu hoạch quả thể.

Chương 5. Nuôi tạo quả thể nấm đông trùng hạ thảo (*C. militaris*) trên ký chủ nhộng tằm.

5.1 Mục đích nghiên cứu

Xác định vị trí tiêm và độ tuổi nhộng tằm phù hợp để nuôi tạo quả thể nấm đông trùng hạ thảo (*C. militaris*) trên ký chủ nhộng tằm.

5.2 Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 2 nhân tố: nhân tố A (tuổi nhộng tằm) với 4 mức độ 9; 10; 11; 12 ngày tuổi tính từ lúc tằm bắt nhả tơ; nhân tố B (vị trí tiêm) với 2 mức độ: phần ngực hoặc phần bụng. Thí nghiệm gồm 8 nghiệm thức được lặp lại 3 lần với mỗi lần lặp lại là 1 keo thủy tinh chứa 10 nhộng tằm được chủng dịch nuôi nấm đông trùng hạ thảo (*C. militaris*).

5.3 Phương pháp thực hiện

Việc gây nhiễm và nuôi tạo quả thể nấm *C. militaris* trên ký chủ nhộng tằm được thực hiện theo phương pháp được mô tả bởi Hong et al. (2010) với một số biến đổi để phù hợp điều kiện phòng thí nghiệm.

Dịch nuôi nấm đông trùng hạ thảo (*C. militaris*) được lọc qua màng lọc.

75 μ l dịch nuôi nấm đông trùng hạ thảo (*C. militaris*) sau khi lọc được tiêm vào nhộng tằm ở các nghiệm thức khác nhau. Nhộng tằm sau khi tiêm được đặt trong keo được lót giấy ở điều kiện 20⁰C cho đến khi cơ thể nhộng tằm trở nên cứng và được bao bởi tơ nấm màu trắng bên ngoài.

Nuôi tạo quả thể: các nhộng tằm nhiễm nấm *C. militaris* được chuyển sang keo nuôi có lót giấy thấm và thêm nước tạo ẩm để tạo điều kiện cho quả thể hình thành và phát triển. Các keo nuôi này được đưa vào phòng nuôi để điều chỉnh nhiệt độ và ánh sáng (23⁰C, 500 lux 12 giờ vào ban ngày và 17⁰C trong 12 giờ ở điều kiện tối hoàn toàn vào ban đêm) cho đến khi quả thể nhú lên từ nhộng tằm. Đến lúc này, nhiệt độ phòng nuôi quả thể được điều chỉnh 25⁰C, cường độ chiếu sáng 500 lux trong 14 giờ/ngày và 25⁰C trong điều kiện che tối hoàn toàn thời gian 10 giờ/ngày, ẩm độ điều chỉnh 90-95% để quả thể phát triển.

Nhộng tằm ở nghiệm thức có tỷ lệ nhộng tằm tạo quả thể nhiều nhất được gửi phân tích hàm lượng Cordycepin và Adenosine.

Chỉ tiêu theo dõi

Tỷ lệ (%) nhộng tằm bị nhiễm nấm đông trùng hạ thảo (*C. militaris*) ở các nghiệm thức.

Số lượng quả thể/nhộng tằm sau 60 ngày nhộng tằm nhiễm nấm đông trùng hạ thảo (*C. militaris*).

Chiều cao trung bình quả thể (mm) sau 60 ngày nhộng tằm bị nhiễm nấm đông trùng hạ thảo (*C. militaris*).

Đường kính trung bình quả thể (mm) sau 60 ngày nhộng tằm bị nhiễm nấm đông trùng hạ thảo (*C. militaris*).

Hàm lượng Cordycepin và Adenosine trong quả thể và nhộng tằm ở nghiệm thức được chọn.

5.4 Kết quả nghiên cứu



Hình 13. Tằm (*Bombyx mori*) được nuôi tại trường Đại học Trà Vinh. Giai đoạn tằm (trái) và giai đoạn nhộng (phải)

Sau thời gian 3 -5 ngày tiêm dịch nuôi nấm *C. militaris* nhộng tằm đã bị nhiễm nấm với biểu hiện tơ nấm màu trắng đục hình thành ở vị trí tiêm và các lỗ khí hai bên thành bụng và nhộng trở nên cứng sau 7-10 ngày tiêm nấm (hình 14).

Bảng 12. Ảnh hưởng của vị trí tiêm và tuổi nhộng tằm lên tỷ lệ nhộng tằm nhiễm nấm *C. militaris*

Vị trí tiêm (B)	Tuổi nhộng (ngày) (A)				Trung bình (%)
	9	10	11	12	
Phần ngực	43,33	53,33	56,67	66,67	47,93
Phần bụng	43,33	56,67	63,33	63,33	48,89
Trung bình (%)	43,33^c	47,89^b	50,81^{ab}	53,88^a	
F (A)			**		
F (B)			ns		
F (A x B)			ns		
CV (%)			7,0		

Ghi chú: Trong cùng một hàng, số có ít nhất một chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê khi dùng phép kiểm định LSD, (ns): khác biệt không có ý nghĩa thống kê; (**): khác biệt ở mức ý nghĩa 1%. Các giá trị trong bảng là trung bình của các lần lặp lại.

Không có sự tương tác giữa vị trí tiêm và tuổi nhộng tăng lên tỷ lệ nhộng nhiễm nấm *C. militaris*. Ở hai vị trí tiêm dịch nuôi nấm *C. militaris* khác nhau (phần ngực hoặc phần bụng) tỷ lệ nhộng nhiễm nấm *C. militaris* khác biệt không có ý nghĩa thống kê và dao động từ 47,93% đến 48,89%. Tuy nhiên, có sự khác biệt lớn về tỷ lệ nhộng nhiễm nấm *C. militaris* ở các tuổi nhộng khác nhau (bảng 12). Nhộng tăng 12 ngày tuổi có tỷ lệ nhiễm cao nhất (53,88%) và đạt thấp nhất (43,33%) khi nhộng tăng có tuổi đời 9 ngày. Tuy nhiên, đối với nhộng 12 ngày tuổi được ghi nhận có hơn 50% nhộng đã hóa bướm.



Hình 14. Nhộng tăng nhiễm nấm sau 5 ngày tiêm *C. militaris* (trái) và Quả thể nấm *C. militaris* hình hành trên nhộng tăng sau 60 ngày chủng giống (phải)

Kết quả này tương tự nghiên cứu được báo cáo bởi Hong et al. (2010) khi nghiên cứu sự hình thành quả thể của chủng nấm *C. militaris* trên ký chủ nhộng tăng là với 3 vị trí tiêm: đầu, ngực và bụng thì tỷ lệ nhộng nhiễm nấm cao nhất là phần ngực và phần bụng.

Bảng 13. Ảnh hưởng của vị trí tiêm và tuổi nhộng tăng lên số lượng quả thể nấm *C. militaris* hình thành trên nhộng tăng.

Vị trí tiêm (B)	Tuổi nhộng (ngày) (A)				Trung bình (quả thể/nhộng)
	9	10	11	12	
Phần ngực	1,68	1,45	1,55	1,47	1,53
Phần bụng	1,70	1,47	1,57	1,38	1,53
Trung bình (quả thể/nhộng)	1,69^a	1,46^b	1,56^{ab}	1,43^b	
F (A)			*		
F (B)			ns		
F (A x B)			ns		
CV (%)			12,29		

Ghi chú: Trong cùng một hàng, số có ít nhất một chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê khi dùng phép kiểm định LSD, (ns): khác biệt không có ý nghĩa thống kê; (): khác biệt ở mức ý nghĩa 5%. Các giá trị trong bảng là trung bình của các lần lặp lại.*

Sau khi nhiễm nấm *C. militaris*, các nhộng tằm được chuyển sang các keo khác có chứa giấy thấm được bổ sung nước nhằm giữ ẩm và đặt vào phòng nuôi tạo điều kiện để quả thể hình thành và phát triển trên nhộng tằm. Sau 12 ngày kích thích hình thành quả thể có 100% nhộng tằm bị nhiễm nấm *C. militaris* ở các nghiệm thức hình thành quả thể. Tuy nhiên, số lượng quả thể hình thành trên nhộng tằm ở các nghiệm thức rất ít, quả thể chỉ mọc ra từ vị trí tiêm nấm *C. militaris* với số lượng trung bình từ 1,38 - 1,7 quả thể/nhộng tằm. Mặc dù có tỷ lệ nhiễm nấm *C. militaris* cao nhất nhưng số lượng quả thể nấm *C. militaris* hình thành/nhộng tằm thấp nhất (chỉ đạt 1,43 quả thể/nhộng) khi nhộng có tuổi đời 12 ngày tuổi. Nhộng tằm với tuổi đời 9 ngày khi nhiễm cho số lượng quả thể nấm *C. militaris*/nhộng tằm là cao nhất đạt trung bình 1,69 quả thể/nhộng tằm (bảng 13).

Bảng 14. Ảnh hưởng của vị trí tiêm và tuổi nhộng tằm lên chiều cao quả thể nấm *C. militaris* hình thành trên nhộng tằm.

Vị trí tiêm (B)	Tuổi nhộng (ngày) (A)				Trung bình (mm)
	9	10	11	12	
Phần ngực	31,67	30,04	26,72	26,43	28,72
Phần bụng	30,5	27,36	28,20	28,33	28,60
Trung bình (mm)	31,08^a	28,70^{ab}	27,46^b	27,38^b	
F (A)			**		
F (B)			ns		
F (A x B)			ns		
CV (%)			6,36		

Ghi chú: Trong cùng một hàng, số có ít nhất một chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê khi dùng phép kiểm định LSD, (ns): khác biệt không có ý nghĩa thống kê; (): khác biệt ở mức ý nghĩa 5%. Các giá trị trong bảng là trung bình của các lần lặp lại.*

Kết quả thí nghiệm trình bày ở bảng 14 cho thấy độ tuổi nhộng tằm có ảnh hưởng đến chiều cao quả thể nấm *C. militaris*. Chiều quả thể nấm tỷ lệ nghịch với tuổi nhộng tằm thí nghiệm. Chiều cao quả thể nấm *C. militaris* dao động trong khoảng 30mm. Nhộng tằm 9 ngày tuổi quả thể nấm *C. militaris* hình thành có chiều cao đạt cao nhất với trung bình ở hai vị trí tiêm là 31,08 mm và khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1% so với chiều cao quả thể ở nhộng tằm các độ tuổi còn lại. Chiều cao quả thể đạt thấp nhất (27,38) khi nhộng tằm 12 ngày tuổi. Tuy nhiên, chiều cao trung bình quả thể thu được đối với vị trí tiêm của nhộng tằm ở các độ tuổi khác

nhau không có sự khác biệt ý nghĩa thống kê và cũng không có sự tương tác giữa vị trí tiêm và tuổi nhộng tằm lên chiều cao quả thể nấm *C. militaris* thu được.

Bảng 15. Ảnh hưởng của vị trí tiêm và tuổi nhộng tằm lên đường kính quả thể nấm nấm *C. militaris* hình thành trên nhộng tằm.

Vị trí tiêm (B)	Tuổi nhộng (ngày) (A)				Trung bình (mm)
	9	10	11	12	
Phần ngực	2,07	2,11	2,05	1,82	2,01
Phần bụng	2,14	1,97	1,91	1,87	1,97
Trung bình (mm)	2,10^a	2,04^{ab}	1,98^{ab}	1,85^b	
F (A)			**		
F (B)			ns		
F (A x B)			ns		
CV (%)			5,53		

Ghi chú: Trong cùng một hàng, số có ít nhất một chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê khi dùng phép kiểm định LSD, (ns): khác biệt không có ý nghĩa thống kê; (**): khác biệt ở mức ý nghĩa 1%. Các giá trị trong bảng là trung bình của các lần lặp lại.

Đường kính quả thể ở các nghiệm thức thí nghiệm dao động từ 1,82 - 2,14 mm. kết quả cho thấy rằng đường kính quả thể *C. militaris* tỷ lệ nghịch với tuổi nhộng tằm, nhộng tằm có tuổi đời nhỏ thì đường kính quả thể lớn và ngược lại.

Từ các kết quả thí nghiệm thu thập được phân tích và trình bày ở các bảng 15 có thể thấy rằng nhộng tằm có tuổi đời nhỏ (9 ngày tuổi) thì tỷ lệ nhiễm nấm *C. militaris* thấp nhưng các chỉ tiêu về sự phát triển quả thể như: số lượng quả thể, chiều cao quả thể và đường kính quả thể lại hơn so với nhộng tằm có độ tuổi lớn hơn (10, 11 và 12 ngày tuổi). Điều này có thể giải thích là do nhộng tằm có tuổi đời lớn thì khả năng miễn dịch yếu nên dễ dàng bị nấm xâm nhập lây nhiễm và có thành phần dinh dưỡng mà đặc biệt là hàm lượng protein giảm khi nhộng tằm đã nhả hết tơ và chuẩn bị hóa bướm nên thiếu dinh dưỡng cho sự phát triển quả thể.

Từ những kết quả trình bày bên trên, nhộng tằm 9 ngày tuổi và vị trí tiêm phần bụng được chọn để nghiên cứu sản xuất nấm ĐTHT ký chủ nhộng tằm.

Kết quả phân tích thành phần Cordycepin và Adenosine, hai thành phần có tác dụng dược lý chính ở nấm ĐTHT từ quả thể và ký chủ nhộng tằm, cho thấy hàm lượng Cordycepin và Adenosine đạt được lần lượt là 4,28 g/g và 0,14 mg/g. Hàm lượng Cordycepin và Adenosin được phân tích nhỏ hơn ở quả thể nuôi trên môi trường gạo lứt bổ sung nhộng tằm và trên gạo lứt bổ sung dinh dưỡng, điều này có thể do phân tích cả quả thể và nhộng tằm nên trong nhộng tằm hàm lượng hai chất này ít hơn trong quả thể. Tuy nhiên, so với nghiên cứu được báo cáo bởi Huang *et*

al. (2009) cho thấy hàm lượng Cordycepin cao hơn gấp 4 lần và hàm lượng Adenosin thấp hơn 12 lần.

Từ kết quả thí nghiệm đạt được bên trên, có thể khái quát qui trình nuôi tạo quả thể nấm ĐTHT (*C. militaris*) trên ký chủ nhộng tằm theo sơ đồ được trình bày ở hình 15.

Mô tả qui trình nuôi nấm ĐTHT (*C. militaris*) trên ký chủ nhộng tằm

Qui trình nuôi nấm ĐTHT (*C. militaris*) trên ký chủ nhộng tằm được thực hiện như sau: Giống nấm *C. militaris* trên môi trường PSA (Potato sucrose agar) được tiếp tục nuôi trong môi trường cơ bản (20 g/l sucrose, 20 g/l peptone, 0.5 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ và 1g/l K_2HPO_4) ở điều kiện 25⁰C thời gian 4 ngày trên máy lắc với tốc độ 150 rpm, dịch nuôi được lọc qua màng lọc để thu lấy dịch tiêm vào nhộng tằm.

Nhộng tằm 9 ngày tuổi (được tính từ lúc tằm nhả tơ) được cắt khỏi kén và được vệ sinh bề mặt bằng cồn 70⁰

Tiêm 75 μ l dịch nuôi sau khi đã lọc vào mỗi nhộng tằm ở phần bụng nhộng tằm.

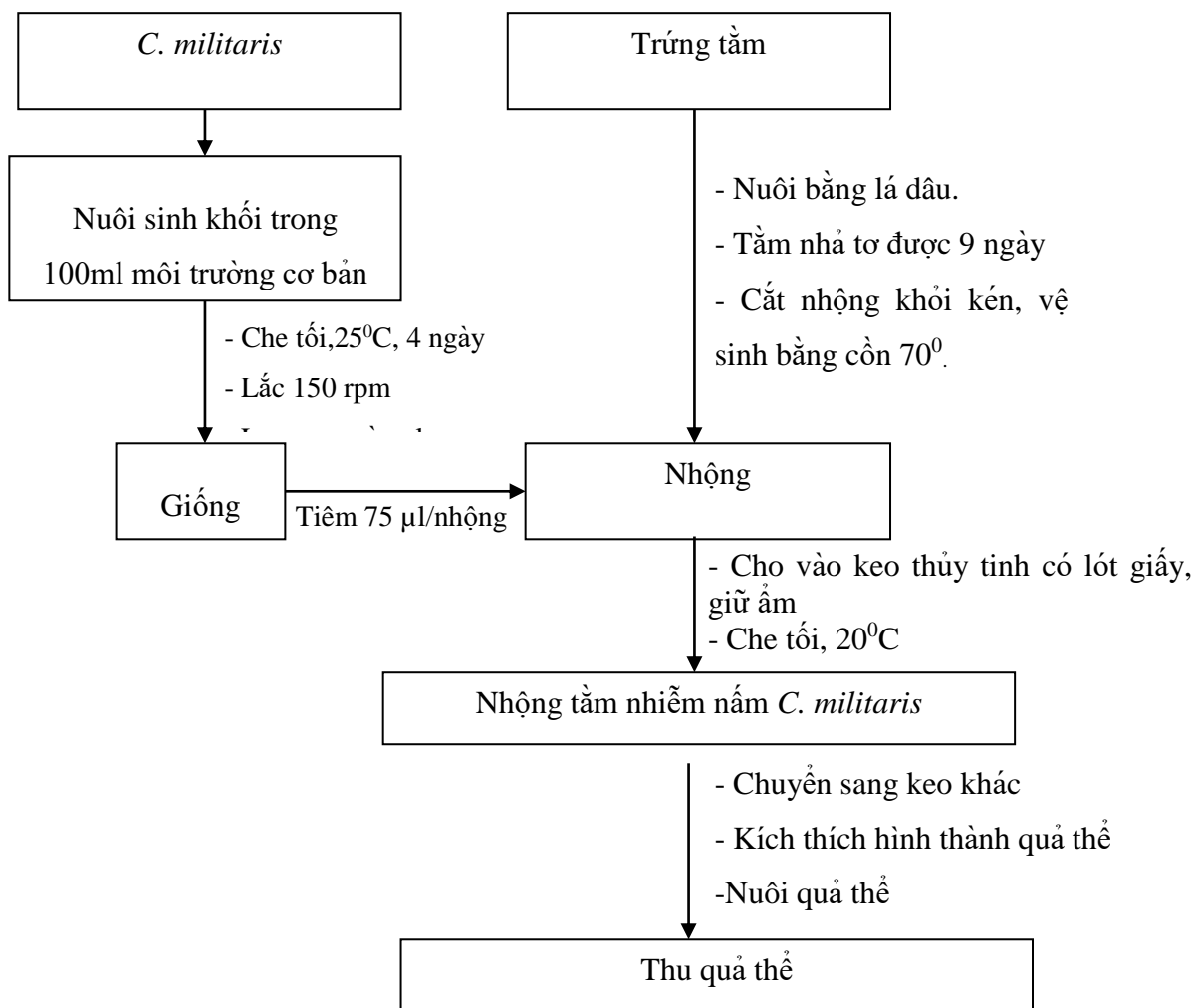
Đưa keo chứa nhộng tằm nhiễm nấm *C. militaris* vào phòng nuôi được che tối với nhiệt độ 20⁰C.

Sau 10 - 12 ngày nuôi, chọn nhộng tằm nhiễm nấm *C. militaris* vào keo nuôi mới có lót giấy thấm.

Đưa keo nuôi vào phòng nuôi và kích thích hình thành quả thể ở điều kiện: 23⁰C, 500 lux 12 giờ vào ban ngày và 17⁰C trong 12 giờ ở điều kiện tối hoàn toàn vào ban đêm, ẩm độ điều chỉnh 90-95%, thời gian 12 ngày.

Khi quả thể nhú ra từ nhộng tằm bằng ngòi bút bi tiến hành nuôi quả thể ở điều kiện 25⁰C, 500 lux trong 14 giờ và điều kiện tối hoàn toàn ở 25⁰C trong 10 giờ.

Sau 60 ngày tính từ lúc tiêm nấm *C. militaris* vào nhộng tằm tiến hành thu hoạch quả thể.



Hình 15. Sơ đồ tóm tắt quy trình nuôi nấm ĐHTH (*C. militaris*) trên ký chủ nhộng tằm.

Nhóm thực hiện đề tài đã tổ chức Hội thảo “*Đông trùng hạ thảo (C. militaris)- nguồn dược liệu quý và tiềm năng phát triển tại Trà Vinh*” tại Trường Đại học Trà Vinh ngày 17 tháng 1 năm 2017 với sự tham dự của 30 đại biểu đến từ Trung tâm Công nghệ Sinh học, Trung tâm Ứng Dụng Tiến Bộ Khoa học và Công nghệ, bộ môn Dược, Trung tâm Công nghệ Sau thu hoạch Trường Đại học Trà Vinh,... Các Đại biểu tham dự hội thảo đánh giá cao về kết quả nghiên cứu đạt được và đưa ra một số hướng nghiên cứu mới nhằm tạo ra các sản phẩm có giá trị cao từ nấm Đông trùng hạ thảo để phục vụ nhu cầu chăm sóc sức khỏe người dân trong và ngoài tỉnh.

Qua các kết quả nghiên cứu cũng như qua Hội thảo cho thấy triển vọng để phát triển việc nuôi trồng nấm Đông trùng hạ thảo tại Trà Vinh để cung cấp sản phẩm cho những nghiên cứu sâu hơn cũng như chuyên giao công nghệ cho các đơn

vị có nhu cầu là rất lớn. Đó cũng là thành công bước đầu của đề tài cũng như niềm động viên đối với cán bộ tham gia thực hiện đề tài.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

Nhiệt độ 25⁰C và cường độ chiếu sáng 500 lux là phù hợp cho sự hình thành và phát triển quả thể nấm *C. militaris*;

20 g gạo lứt được bổ sung 30 ml dung dịch dinh dưỡng gồm 18,56 g/l glucose; 14,55 g/l peptone; 1,42 g/l KH₂PO₄; 1,5 g/l MgSO₄ và 1,0 mg/l NAA phù hợp cho việc nuôi tạo quả thể.

Môi trường nuôi chứa 50 g gạo lứt huyết rồng bổ sung 50 ml nước cất và nhộng tằm 5 g/hộp có 100% keo nuôi có nấm hình thành quả thể và đạt trọng lượng tươi quả thể đạt cao trong các nghiệm thức nghiên cứu.

Nhộng tằm 9 ngày tuổi được tiêm 75 μ l dịch nuôi vào phần bụng phù hợp cho việc nuôi tạo quả thể nấm *C. militaris* trên ký chủ nhộng tằm.

KIẾN NGHỊ

Sản xuất thử nghiệm quả thể nấm *C. militaris* trên các môi trường đã được nghiên cứu để điều chỉnh các thông số phù hợp cho qui mô nuôi công nghiệp.

Ly trích, đánh giá khả năng kháng khuẩn, kháng nấm, kháng oxy hóa và điều trị ung thư của một số hợp chất từ quả thể nấm *C. militaris*.

Nghiên cứu sản xuất một số sản phẩm có giá trị gia tăng từ nấm *C. militaris*.

Nghiên cứu tối ưu hóa các thành phần môi trường lỏng để nuôi cấy chìm nấm *C. militaris* thu Cordycepin và Adenosin.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng Việt

- [1] Lê Văn Vẻ, Trần Thu Hà, Nguyễn Thị Bích Thùy và Ngô Xuân Nghiễn. 2015. Bước đầu nghiên cứu công nghệ nuôi trồng nhộng trùng thảo (*Cordyceps militaris* L.ex Fr.) ở Việt Nam. *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, tập 13, số 3: 445-454.

Tiếng Anh

- [1] Akaki, J., Matsui. Y. & Kojima H. 2009. Structural analysis of monocyte activation constituents in cultured mycelia of *Cordyceps sinensis*. *Fitoterapia*, 80, 182–7.
- [2] Aramwit, P., Bang N., Ratanavaraporn, J., Nakpheng, T. & Srichana T. 2014. An Anti-Cancer Cordycepin Produced by *Cordyceps militaris* Growing on the Dead Larva of *Bombyx mori* Silkworm. *Journal of Agricultural Science*; Vol. 6, No. 6
- [3] Bizarro, A., Ferreira, I. C. F. R., Soković, M., Griensven, L.J. L. D., Sousa D., Vasconcelos, M.H. & Lima R.T. 2015. *Cordyceps militaris* (L.) Link Fruiting Body Reduces the Growth of a Non-Small Cell Lung Cancer Cell Line by Increasing Cellular Levels of p53 and p21. *Molecules*, 20, 13927-13940
- [4] Das, S.K., Masuda, M., Sakurai, A. & Sakakibara M. 2010a. Medicinal uses of the mushroom *Cordyceps militaris*: Current state and prospects. *Fitoterapia*, 81, 961–8.
- [5] Dong, J.Z., Lei, C., Ai, X.R. & Wang Y., 2012. Selenium enrichment on *Cordyceps militaris* Link and analysis on its main active components. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 166: 1215-1224.
- [6] Gu, Y.X., Wang, Z.S., Li, S.X. & Yuan, Q.S. 2007. Effects of multiple factors on accumulation of nucleosides and bases in *Cordyceps militaris*. *Food Chem*, 102, 1304–9.
- [7] Gao, X.H., Wu, W. & Qian, G.C. 2000a. Study on influences of abiotic factors on fruitbody differentiation of *Cordyceps militaris*. *Acta Agric Shanghai* 16(Suppl):93–98.
- [8] Hur, H. 2008. Chemical Ingredients of *Cordyceps militaris*. *Mycobiology*. 36(4):233-235.
- [9] Hong, I.P, Kang ,P.D., Kim, K.Y., Nam, S.H., Lee, M.Y., Choi, Y.S., Kim, N.S, Kim, H.K., Lee, K.G. & Humber, R.A. 2010. Fruit body formation on silkworm by *Cordyceps militaris*. *Mycobiology* 38(2): 128-132.

- [10] Jiang, X.L. & Sun, Y. 1999. The determination of active components in various *Cordyceps militaris* strains. *Acta Edulis Fungi*, 6, 47–50.
- [11] Jin, L.Y., Du, S.T. & Ma, L. 2009. Optimization on mathematical model of basic medium of *Cordyceps militaris* cultivation. *J Northwest A F Univ (Nat Sci Ed)* 37(11):175–179.
- [12] Kamble, V.R., & Agre, D.G. 2012. Reinvestigation of insect parasite fungus *Cordyceps militaris* from Maharashtra. *Bionano Frontier* 5(2):224-225.
- [13] Kim, S.Y., Shrestha, B., Sung, G.H., Han, S.K & Sung J.M. 2010. Optimum conditions for artificial fruiting body formation of *Cordyceps cardinalis*. *Mycobiology* 38(2): 133-136.
- [14] Kobayashi, Y. 1941. The genus *Cordyceps* and its allies. *Sci Rep Tokyo Bunrika Daigaku Sect B*. 5:53-260.
- [15] Kobayasi, Y., 1981. Revision of the genus *Cordyceps* and its allies 1. *Bulletin of the National Science Museum Tokyo*. 7:1–13.
- [16] Kobayasi, Y., 1982. Keys to the taxa of the genera *Cordyceps* and *Torrubiella*. *Transactions of the Mycological Society of Japan* 23:329–364 Herbal, New York.
- [17] Kuo, Y.C, Tasi, W.J & Shiao, M.S. 1996. *Cordyceps sinensis* as an immunomodulatory agent. *Am J Chin Med*, 24, 111–25.
- [18] Lee, H.H., Lee, S., Lee, K., Shin, Y.S, Kang, H & Cho, H. 2009. Anti-cancer effect of *Cordyceps militaris* in human colorectal carcinoma RKO cells via cell cycle arrest and mitochondrial apoptosis. *J Acupunct Meridian Stud* 2009; 2 (4):294–300.
- [19] Li, S.P., Yang, F.Q. & Tsim, K.W.K. 2006. Quality control of *Cordyceps sinensis*, a valued traditional Chinese medicine. *J Pharmaceut Biomed*, 41, 1571–84.
- [20] Lim, L.T., Lee, C.Y. & Chang, E.T., 2012. Optimization of solid state culture conditions for the production of adenosine, cordycepin, and D-mannitol in fruiting bodies of medicinal caterpillar fungus *Cordyceps militaris* (L.: Fr.) Link (Ascomycetes), *Int. J. Med. Mushrooms*, 2: 181-187.
- [21] Liu, C., Song, J., Teng, M., Zheng, X., Li, X., Tian ,Y., Pan, M., Li, Y., Lee, R.J & Wang D. 2016. Antidiabetic and Antinephritic Activities of Aqueous Extract of *Cordyceps militaris* Fruit Body in Diet Streptozotocin-Induced Diabetic Sprague Dawley Rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity Volume 2016*

- [22] Park, S.E., Kim, J., Lee, Y-W, Yoo, H-S & Cho, C.K. 2016. Antitumor Activity of Water Extracts From *Cordyceps Militaris* in NCI-H460 Cell Xenografted Nude Mice. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity Volume 2016*
- [23] Mao, X.B., Eksriwong, T., Chauvatcharin, S & Zhong, J.J. 2005. Optimization of carbon source/nitrogen ratio for cordycepin production by submerged cultivation of medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. *Process Biochem*, 40, 1667–72.
- [24] Paul, M. K., Paul, F. C., David, W. M. and Stalpers, J. A., 2008. Dictionary of the Fungi; CABI.
- [25] Petch T. 1936. *Cordyceps militaris* and *Isaria farinosa*. *Trans Br Mycol Soc*; 20:216-224.
- [26] Reis, F.S., Barros, L., Calhelha, R.C., 2013. The methanolic extract of *Cordyceps militaris* (L.) Link fruiting body shows antioxidant, antibacterial, antifungal and antihuman tumor cell lines properties. *Food Chem Toxicol*, 62, 91–8.
- [27] Sato, H. and Shimazu, M., 2002. Stromata production for *Cordyceps militaris* (Clavicipitales: Clavicipitaceae) by injection of hyphal bodies to alternative hostinsects. *Applied Entomology and Zoology*. 37:85–92.
- [28] Shrestha, B., Kim, H.K., Sung, G.H., 2004a. Bipolar heterothallism, a principal mating system of *Cordyceps militaris* in vitro. *Biotechnol Bioprocess Eng* 9:440–446.
- [29] Shrestha, B., Park, Y.J, Han, S.K., 2004b. Instability in in vitro fruiting of *Cordyceps militaris*. *J Mushroom Sci Prod* 2:140–144
- [30] Shrestha, B., Choi, S.K, Kim, H.K., 2005a. Genetic analysis of pigmentation in *Cordyceps militaris*. *Mycobiology* 33:125–130
- [31] Shrestha, B, Han, S.K., Lee, W.H. 2005b. Distribution and in vitro fruiting of *Cordyceps militaris* in Korea. *Mycobiology* 33:178–181
- [32] Sung, J.M. 1996. The Insects-born fungus of Korea in color. *Seoul: Kyohak Publishing Co Ltd.*; p. 62-72.
- [33] Sung, J.M., Choi, Y.S, Lee, H.K, Kim, S.H., Kim, Y.O and Sung, G.H., 1999. Production of fruiting body using cultures of entomopathogenic fungal species. *Kor J Mycol* 27:15-9.
- [34] Sung, J.M, Choi, Y.S, Shrestha, B. 2002. Investigation on artificial fruiting of *Cordyceps militaris*. *Korean J Mycol* 30:6–10

- [35] Sung, J.M, Park, Y.J, Lee, J.O. 2006a. Effect of preservation periods and subcultures on fruiting body formation of *Cordyceps militaris* in vitro. *Mycobiology* 34:196–199
- [36] Sung, J.M, Park, Y.J, Lee, J.O. 2006b. Selection of superior strains of *Cordyceps militaris* with enhanced fruiting body productivity. *Mycobiology* 34:131–137
- [37] Tong, Y.K, Kuang, T., Wu, Y.X.,. 1997. Comparison of components of *Cordyceps* mycelium and natural *Cordyceps sinensis*. *Shi Pin Yan JiuYu Kai Fa*, 18, 40–42 (in Chinese).
- [38] Ying, J.Z, Mao, X.L, Ma, Q.M., Zong, Y.C., Wen, H.A., 1987. Icones of medicinal fungi from China. Beijing: *Science Press*; . p. 1-575.
- [39] Wang, L., Zhang, W.M, and Hu. B., 2008. Genetic variation of *Cordyceps militaris* and its allies based on phylogenetic analysis of rDNA ITS sequence data. *Fungal Divers*, 31, 147–55.
- [40] Wang, B.S., Lee, Ch.P., Chen, Z.T., 2012b. Comparison of the hepatoprotective activity between cultured *Cordyceps militaris* and natural *Cordyceps sinensis*. *J Funct Foods*, 4, 489–95.
- [41] Wen, T.C., Li, G.R., Kang, J.C., Kang, C., Hyde, K.D., 2014. Optimization of Solid-state Fermentation for Fruiting Body Growth and Cordycepin Production by *Cordyceps militari*. *Chiang Mai J. Sci*, 41(4): 858-872.
- [42] Zheng, P., Xia, Y.L., Xiao, Ch.H., 2011a. Genome sequence of the insect pathogenic fungus *Cordyceps militaris*, a valued traditional Chinese medicine. *Genome Biol*, 12, R116.
- [43] Zhao, C.Y., Li, H., Zhang, M. 2006. Optimization on conditions of artificial cultivation of *Cordyceps militaris*. *J Shenyang Agric Univ* 37:209–212

Trang web

<http://danviet.vn/quan-su>

<http://vnexpress.net/tin-tuc/khoa-hoc>

<http://duocthaothienphuc.vn/>

<http://dongtrunghathaokimlai.vn/>