

Nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường nhân giống cấp 1 tới khả năng hình thành quả thể của nấm Đông trùng hạ thảo *Cordyceps militaris*

Vũ Hoài Nam^{1*}, Ma Thị Trang¹, Trần Văn Phùng¹, Nguyễn Huy Thuần², Dương Văn Cường^{1,3}

¹Viện Khoa học Sự sống, Đại học Thái Nguyên

²Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ cao, Trường Đại học Duy Tân

³Trường Đại học Nông lâm Thái Nguyên

Ngày nhận bài 9/7/2019; ngày chuyển phản biện 15/7/2019; ngày nhận phản biện 19/8/2019; ngày chấp nhận đăng 27/8/2019

Tóm tắt:

Cordyceps militaris là một loại nấm dược liệu có nhiều tác dụng sinh học quý. Sự hình thành quả thể không ổn định là một rào cản đối với sản xuất ở quy mô công nghiệp. Trong nghiên cứu này, các điều kiện nuôi trồng nấm trên môi trường thạch agar được khảo sát để tìm ra môi trường nhân giống cấp 1 tốt nhất. Kết quả cho thấy, môi trường PDA có bổ sung 10 g/l pepton cho khả năng sinh trưởng tốt nhất: tốc độ tăng trưởng đạt 4,8 mm/ngày, đường kính khuẩn lạc đạt 9,74 cm sau 20 ngày nuôi cấy. Nuôi trồng thử nghiệm trên môi trường nhân tạo thể rắn cho thời gian ăn kín cơ chất 9,12 ngày, thời gian xuất hiện mầm quả thể 15,37 ngày, số lượng đạt 36,51 quả thể/bình, chiều dài trung bình quả thể là 68,24 mm, năng suất sinh học đạt 12,43%.

Từ khóa: *Cordyceps militaris*, môi trường nhân giống cấp 1, nấm Đông trùng hạ thảo, PDA.

Chỉ số phân loại: 4.1

Mở đầu

Đông trùng hạ thảo (*Cordyceps militaris*) là một loại nấm dược liệu, được sử dụng lâu đời trong y học Trung Hoa. Nhiều hợp chất sinh học đã được tách chiết từ nấm *C. militaris*, như: polysaccharit, cordycepin, adenosine, axit amin, ergosterol, superoxide effutase (SOD), selen hữu cơ và vitamin tổng hợp [1, 2]. Các nghiên cứu cho thấy *C. militaris* có nhiều chức năng dược lý như: chống viêm [3], chống xơ hóa [4], ức chế tăng trưởng của các tế bào ung thư bạch cầu U937 [5], điều hòa miễn dịch [6], cải thiện bài tiết insulin [7], tăng cường chức năng gan [8], thận [9], phổi [10].

Hiện nay, sản lượng khai thác nấm *C. militaris* trong tự nhiên không đủ đáp ứng nhu cầu thị trường. Các phương pháp nuôi trồng nhân tạo để thu sinh khối hay lên men dịch thể nhằm thu hồi hoạt chất được áp dụng mạnh mẽ [11]. Tuy nhiên, sự hình thành quả thể không ổn định đang là rào cản đối với quá trình nuôi trồng nấm *C. militaris*. Thành phần môi trường dinh dưỡng có vai trò quan trọng trong quá trình trao đổi chất, cung cấp năng lượng cho các hoạt động sống của tế bào, từ đó ảnh hưởng trực tiếp tới chất lượng của giống. Vladimir (2012) khẳng định carbon là thành phần

chủ yếu trong môi trường nhân giống *C. Militaris*, đảm bảo sự sinh trưởng và tổng hợp các hợp chất sinh học cần thiết, còn nitơ có vai trò trong quá trình sinh tổng hợp các enzyme cần thiết cho quá trình chuyển hóa sơ cấp và thứ cấp của nấm [12]. Tuy nhiên, các nghiên cứu sâu rộng về mối quan hệ giữa điều kiện dinh dưỡng nuôi trồng giống cấp 1 tới năng suất tạo quả thể nấm *C. militaris* còn khiêm tốn. Với mục tiêu phục vụ công tác nghiên cứu, phát triển công nghệ nuôi trồng nấm *C. militaris*, chúng tôi đã nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường nhân giống cấp 1 tới khả năng hình thành quả thể của nấm *C. militaris*.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Giống gốc *C. militaris* nhập khẩu từ Trung tâm Tài nguyên sinh vật NITE, Nhật Bản, được hoạt hóa trên môi trường thạch PDA và nuôi ở điều kiện 23°C, trong 14 ngày, sau đó bảo quản ở 4°C.

Phương pháp nuôi cấy

Môi trường nhân giống cấp 1: 5 loại môi trường nhân giống cấp 1 được chia ra thành 3 nhóm môi trường: môi

* Tác giả liên hệ: Email: vuhoainam.tuaf@gmail.com

Effect of agar plate method on the formation of *Cordyceps militaris* fruiting body

Hoai Nam Vu^{1*}, Thi Trang Ma¹, Van Phung Tran¹,
Huy Thuan Nguyen², Van Cuong Duong^{1,3}

¹Institute of Life Sciences, Thai Nguyen University

²Institute of Research and Development, Duy Tan University

³Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry

Received 9 July 2019; accepted 27 August 2019

Abstract:

Cordyceps militaris is a type of medicinal mushroom with many precious biological effects. However, unstable formation of fruiting bodies is considered a barrier for industrial production. In this study, the mushroom cultivating conditions on agar have been investigated in order to find out the best level 1 propagation medium. The results showed that, the PDA culture medium with supplement of 10 g/l peptone provided the best growth: growth rate achieved 4.8 mm/day, and colony diameter got 9.74 cm after 20 days of cultivation. The trials on solid medium exhibited that the time of mechanical covering substrates was 9.12 days, the duration of appearance of fruiting body germs was 15.37 days, the number reached 36.51 fruiting bodies/bottle, the average length of fruiting bodies was 68.24 mm, and the biological efficiency was 12.43%.

Keywords: *Cordyceps militaris*, level 1 propagation medium, mushroom, PDA.

Classification number: 4.1

trường nghèo dinh dưỡng, môi trường dinh dưỡng trung bình, môi trường giàu dinh dưỡng. Cân chính xác thành phần dinh dưỡng của các môi trường (bảng 1) pha với 1 lít nước và được hấp khử trùng ở 121°C trong 30 phút, dịch dinh dưỡng được chia đều vào các đĩa petri đường kính 10 cm (15 ml/đĩa), làm nguội và bảo quản ở nhiệt độ phòng. Chủng giống gốc sau khi hoạt hóa, được cấy thành các ô vuông cạnh 0,5 cm chứa hệ sợi nấm và đặt vào đĩa petri. Sau đó, các đĩa môi trường nhân giống cấp 1 được nuôi ở 23°C, trong điều kiện không chiếu sáng.

Bảng 1. Các loại môi trường nhân giống cấp 1.

Phân loại	Môi trường	Thành phần dinh dưỡng	Tác giả
Nghèo dinh dưỡng	Water agar (WA)	Agar 20 g/l	[13]
Dinh dưỡng trung bình	Malt extract - Yeast extract - Peptone Dextrose agar (MYPS)	Dextrose 10 g/l, glucose 4 g/l, pepton 6 g/l, cao nấm men 4 g/l, agar 20 g/l	[13]
	Sabouraud Dextrose agar plus Yeast Extract (SDAY)	Dextrose 10 g/l, peptone 2,5 g/l, cao nấm men 5 g/l, agar 20 g/l	[14]
Giàu dinh dưỡng	Potato - Dextrose agar (PDA)	Dịch chiết khoai tây 200 g/l, dextrose 20 g/l, agar 20 g/l	[15]
	Sabouraud Maltose agar plus Yeast Extract (SMAY)	Maltose 40 g/l, peptone 10 g/l, cao nấm men 10 g/l, agar 20 g/l	[14]

Chuẩn bị giống dịch thể và cấy giống: để khảo sát ảnh hưởng của các môi trường nhân giống cấp 1 tới sự hình thành quả thể nấm trên môi trường nhân tạo, các đĩa giống cấp 1 sau 15 ngày nuôi được bổ sung 50 ml nước cất đã khử trùng. Dịch huyền phù chứa bào tử nấm được lọc qua băng gạc tiệt trùng trước khi cho vào bình tam giác chứa 200 ml môi trường dinh dưỡng (20 g/l sucrose, 20 g/l peptone, 0,5 g/l $MgSO_4$, 1 g/l K_2HPO_4), và được nuôi ở điều kiện nhiệt độ 20°C, tốc độ lắc 200 vòng/phút trong 7 ngày.

Môi trường giá thể 20 g gạo lức pha với 32 ml dung dịch dinh dưỡng (20 g/l sucrose, 10 g/l peptone, 0,1 g/l $MgSO_4$, 0,1 g/l KH_2PO_4) đựng trong bình thủy tinh 500 ml, hấp khử trùng ở 121°C trong 30 phút, làm lạnh ở nhiệt độ phòng trước khi được cấy 5 ml dung dịch giống. Nấm sau khi cấy trên các loại môi trường, chuyển vào nuôi trong điều kiện không chiếu sáng để phát sinh sợi nấm. Sau khi các bình nấm có hệ sợi phát triển kín bề mặt, chuyển sang môi trường 12h chiếu sáng - 12h tối ở nhiệt độ 20°C, độ ẩm >80% để tạo quả thể.

Phương pháp thống kê và xử lý số liệu

Thí nghiệm được thiết kế theo kiểu khối ngẫu nhiên hoàn toàn với 3 lần nhắc lại.

+ Giai đoạn nhân giống cấp 1: mỗi công thức thí nghiệm được thực hiện với 10 đĩa/lần nhắc lại. Các yếu tố theo dõi bao gồm: tốc độ phát triển hệ sợi (mm/ngày), hình thái hệ sợi và mật độ hệ sợi.

+ Giai đoạn ươm tạo quả thể: mỗi công thức thí nghiệm bố trí 30 lọ cơ chất cho 1 lần nhắc lại. Các chỉ tiêu theo dõi bao gồm: thời gian phát triển hệ sợi/ngày, thời gian xuất hiện mầm quả thể/ngày, số lượng quả thể (quả thể/bình), chiều dài quả thể (cm), năng suất sinh học (%).

Chỉ tiêu năng suất sinh học (BE) được tính bằng công thức:

$$BE(\%) = \frac{\text{khối lượng quả thể khô} \times 100}{\text{Khối lượng cơ chất}}$$

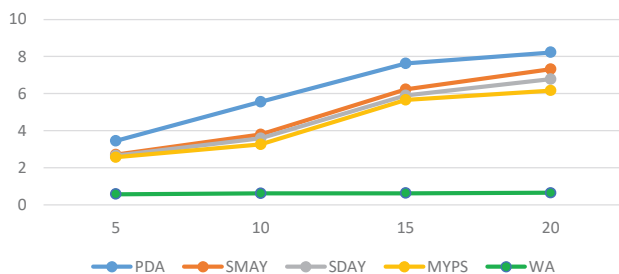
Các thí nghiệm được thống kê, loại bỏ các giá trị bất

thường bằng phương pháp Duncan. Phân tích giá trị ANOVA bằng chương trình IRISTART 4.0 và phần mềm Excel 2013.

Kết quả và thảo luận

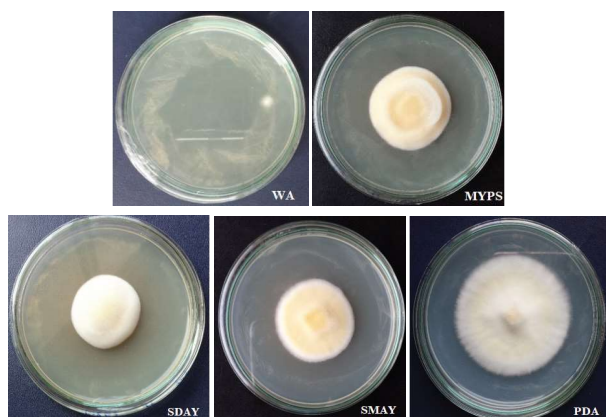
Kết quả khảo sát các môi trường nhân giống cấp 1

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của 5 loại môi trường cấp 1 được thể hiện ở hình 1.



Hình 1. Tốc độ sinh trưởng của hệ sợi nấm *C. militaris* trên môi trường nhân giống cấp 1.

Kết quả hình 1 cho thấy, trong giai đoạn nhân giống cấp 1, các loại môi trường dinh dưỡng khác nhau ảnh hưởng khác nhau đến sự sinh trưởng hệ sợi nấm *C. militaris*. Nhìn chung trên các loại môi trường đều có sự thích nghi của hệ sợi nấm. Trên môi trường nghèo dinh dưỡng, hệ sợi phát triển kém và gần như không có sự gia tăng về kích thước khuẩn lạc. Trên 2 nhóm môi trường dinh dưỡng trung bình và giàu, hệ sợi phát triển mạnh, mọc dài, thẳng, tròn đều về các phía và bông xốp (hình 2). Tốc độ sinh trưởng tốt nhất ở môi trường PDA, đường kính khuẩn lạc đạt 8,22 cm sau 20 ngày nuôi cấy (tốc độ tăng trưởng đường kính trung bình 4,11 mm/ngày).



Hình 2. Hệ sợi nấm *C. militaris* trên các môi trường nhân giống cấp 1 sau 10 ngày nuôi cấy.

Về mật độ hệ sợi, mặc dù có thể nhận thấy ở các nhóm môi trường giàu dinh dưỡng nấm đều có sự phát triển tốt, nhưng cũng có sự khác biệt giữa các loại môi trường. Mật độ hệ sợi

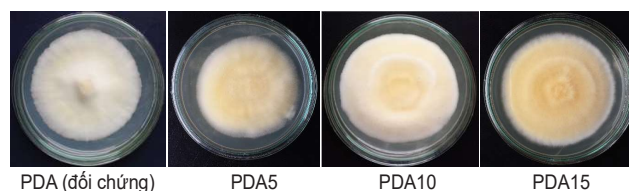
phát triển dày đặc trên môi trường SDAY, hệ sợi phát triển mạnh, đan xen chặt chẽ vào nhau, rất khó có thể quan sát được các nhánh hệ sợi riêng rẽ. Mật độ hệ sợi bắt đầu giảm dần theo thứ tự từ môi trường SDAY>MYPS>SMAY>PDA. Một giả thuyết thú vị được đặt ra là mật độ hệ sợi phụ thuộc vào hàm lượng nitơ tổng số của môi trường. Nitơ đóng vai trò trong quá trình chuyển hóa sơ cấp và thứ cấp của nấm. Cũng trong một nghiên cứu khác, Vladimir nhận thấy, việc bổ sung nguồn nitơ không phù hợp dẫn tới những ức chế về sự phát triển của hệ sợi nấm [12]. Do đó, để kiểm định giả thuyết này đối với chủng nấm của Trung tâm Tài nguyên sinh vật NITE (Nhật Bản), chúng tôi lựa chọn môi trường PDA có tốc độ phát triển tốt nhất và bổ sung thêm các hàm lượng nitơ khác nhau.

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của hàm lượng pepton đến sự phát triển của hệ sợi nấm *C. militaris* trên môi trường nhân giống cấp 1

Để xác định sự ảnh hưởng của pepton đến sự sinh trưởng của hệ sợi nấm *C. militaris*, chúng tôi tiến hành bổ sung pepton với các tỷ lệ khác nhau, gồm: 5, 10 và 15 g/l trên nền môi trường PDA tương ứng với các công thức PDA5, PDA10, PDA15. Kết quả thử nghiệm được thể hiện ở bảng 2 và hình 3.

Bảng 2. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của hàm lượng nitơ đến sự phát triển của hệ sợi nấm *C. militaris*.

Môi trường	Đường kính khuẩn lạc của hệ sợi sau các ngày nuôi (cm)			
	5 ngày	10 ngày	15 ngày	20 ngày
PDA	3,5	5,8	7,5	8,9
PDA5	3,7	6,01	8,2	9,15
PDA10	3,8	6,25	8,65	9,74
PDA15	3,8	6,15	8,26	9,31



Hình 3. Hệ sợi nấm *C. militaris* ở môi trường PDA có bổ sung các nồng độ pepton khác nhau sau 15 ngày.

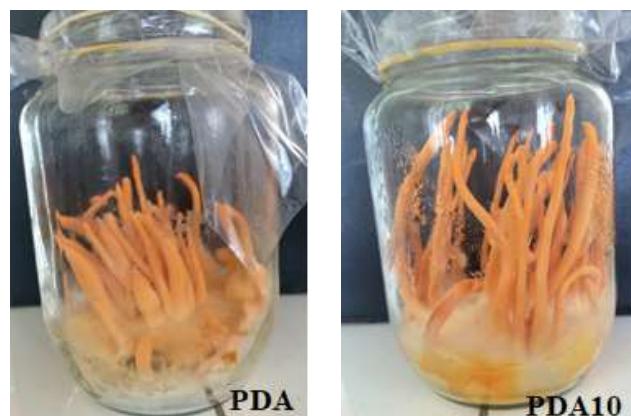
Từ kết quả trên cho thấy, môi trường nhân giống PDA bổ sung pepton có ảnh hưởng tới màu sắc, mật độ và tốc độ phát triển của hệ sợi. Mật độ hệ sợi và khả năng sinh sắc tố càng tăng khi tăng nồng độ pepton. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ pepton lên ngưỡng 15 g/l, tốc độ phát triển hệ sợi nấm có xu hướng giảm so với mức tối ưu là 10 g/l. Do đó, chúng tôi lựa chọn môi trường PDA có bổ sung 10 g/l pepton làm môi trường nhân giống cấp 1 nấm *C. militaris*.

Kết quả khảo sát mối liên hệ giữa môi trường nhân giống cấp 1 tới năng suất tạo quả thể nấm *C. militaris* trên môi trường nhân tạo thể rắn

Để khảo sát mối liên hệ giữa môi trường nhân giống cấp 1 tới khả năng hình thành quả thể nấm trên môi trường nhân tạo thể rắn, chúng tôi lựa chọn hai loại môi trường: môi trường PDA10 (cho chất lượng giống cấp 1 tốt nhất) và môi trường PDA (đối chứng). Kết quả được thể hiện ở bảng 3, hình 4.

Bảng 3. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường nhân giống cấp 1 tới khả năng hình thành quả thể nấm *C. militaris*.

CT	Môi trường	Thời gian phát triển hệ sợi (ngày)	Thời gian hình thành mầm (ngày)	Số lượng quả thể (quả thể/bình)	Chiều dài quả thể (mm)	BE (%)
1	PDA	10,71	16,47	35,23	45,66	5,76
2	PDA10	9,12	15,37	36,51	68,24	12,43



Hình 4. Năng suất tạo quả thể nấm *C. militaris* trên môi trường nhân tạo khi sử dụng 2 loại môi trường nhân giống cấp 1 khác nhau.

Từ kết quả trên cho thấy có sự khác biệt về khả năng thích nghi và sinh trưởng của nấm *C. militaris* trên môi trường nhân tạo thể rắn. Khả năng thích nghi, thời gian mọc kín cơ chất và nảy mầm quả thể của nấm *C. militaris* khi sử dụng môi trường giống cấp 1 PDA10 nhanh hơn so với môi trường PDA cơ bản. Về năng suất nhận thấy cũng có sự khác biệt khi sử dụng hai loại môi trường nhân giống này. Mặc dù không có sự khác biệt về số lượng quả thể/bình nuôi trồng, nhưng chiều dài quả thể khi sử dụng giống trên môi trường PDA10 cao hơn vượt trội so với môi trường PDA thông thường. Do đó, năng suất sinh học cũng cao hơn hẳn.

Kết luận

Từ các nghiên cứu trên cho thấy, môi trường nhân giống cấp I có ảnh hưởng tới năng suất tạo quả thể trên môi trường nhân tạo thể rắn. Trong các loại môi trường được khảo sát, môi trường PDA có bổ sung 10 g/l pepton cho tốc độ sinh

trưởng tốt nhất. Kết quả khảo sát mối tương quan chất lượng giống cấp 1 và khả năng tạo quả thể cũng cho thấy môi trường PDA10 cho năng suất cao hơn hẳn so với môi trường PDA thông thường: thời gian mọc kín cơ chất 9,12 ngày, thời gian xuất hiện mầm quả thể 15,37 ngày, số lượng quả thể/bình đạt 36,51 quả thể, chiều dài trung bình quả thể là 68,24 mm, năng suất sinh học đạt 12,43%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] E.J. Buenz, et al. (2005), "The traditional Chinese medicine *Cordyceps sinensis* and its effects on apoptotic homeostasis", *J. Ethnopharmacol.*, **96**(1), pp.19-29.
- [2] T.C. Wen, et al. (2009), "Enhanced production of mycelial and cordycepin by submerged culture using additives in *Cordyceps militaris*", *Food Ferment. Ind.*, **35**(8), pp.49-53.
- [3] E.S. Hana, et al. (2011), "*Cordyceps militaris* extract suppresses dextran sodium sulfate-induced acute colitis in mice and production of inflammatory mediators from macrophages and mast cells", *J. Ethnopharm.*, **134**, pp.703-710.
- [4] J.X. Nan, et al. (2001), "Antibiotic effect of extracellular biopolymer from submerged mycelial cultures of *Cordyceps militaris* on liver fibrosis induced by bile duct ligation and scission in rats", *Arch. Pharm. Res.*, **24**(4), pp.327-332.
- [5] C. Park, et al. (2005), "Growth inhibition of U937 leukemia cells by aqueous extract of *Cordyceps militaris* through induction of apoptosis", *Oncol. Rep.*, **13**, pp.1211-1216.
- [6] C.H.S. Hsu, et al. (2008), "Effects of the immunomodulatory agent *Cordyceps militaris* on airway inflammation in a mouse asthma model", *Pediatr. Neonatol.*, **49**(5), pp.171-178.
- [7] S.B. Choi, et al. (2004), "Improvement of insulin resistance and insulin secretion by water extracts of *Cordyceps militaris*, *Phellinus linteus*, and *Paecilomyces tenuipes* in 90% pancreatectomized rats Bioscience", *Biotechnology and Biochemistry*, **68**, pp.2257-2264.
- [8] J.X. Nan, et al. (2001), "Antifibrotic effect of extracellular biopolymer from submerged mycelial cultures of *Cordyceps militaris* on liver fibrosis induced by bile duct ligation and scission in rats", *Arch. Pharm. Res.*, **24**(4), pp.327-332.
- [9] S.K.M. Das, M. Sakurai, A. Sakakibara (2010), "Medicinal uses of the mushroom *Cordyceps militaris*: current state and prospects", *Fitoterapia*, **81**(8), pp.961-968.
- [10] R.S. Yu, et al. (2004), "Isolation and biological properties of polysaccharide CPS-1 from cultured *Cordyceps militaris*", *Fitoterapia*, **75**(5), pp.465-472.
- [11] Peter E. Mortimer, et al. (2012), "Prized edible Asian mushrooms: ecology, conservation and sustainability", *Fungal. Diversity*, **56**(1), pp.31-37.
- [12] E. Vladimir (2012), "Submerged cultivation of medicinal mushroom: Bioprocesses and products (review)", *Int. J. Med. Mushrooms*, **14**(3), pp.211-239.
- [13] R.B. Stevens (1981), *Mycology guidebook*, University of Washington Press, Seattle.
- [14] P.M. Stockdale (1971), *Fungi pathogenic for man and animals: I. Diseases of the keratinized tissues*, Academic Press, London.
- [15] A.B. Johnston (1983), *Plant pathologist's pocketbook 2nd*, Commonwealth Agricultural Bureaux, The Commonwealth Mycological Institute, Kew.