

BƯỚC ĐẦU NGHIÊN CỨU CÔNG NGHỆ NUÔI TRỒNG NHỘNG TRÙNG THẢO (*Cordyceps militaris* L.ex Fr.) Ở VIỆT NAM

Lê Văn Vẻ¹, Trần Thu Hà¹, Nguyễn Thị Bích Thùy², Ngô Xuân Nghiễn^{2*}

¹*Trung tâm Công nghệ Sinh học Thực vật, Viện Di truyền Nông nghiệp*

²*Khoa Công nghệ Sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*

Email*: xuannghien2006@yahoo.com

Ngày gửi bài: 18.12.2014

Ngày chấp nhận: 21.04.2015

TÓM TẮT

Bốn môi trường MT-1, MT-2, MT-3 và MT4 được sử dụng để nuôi trồng nấm *Cordyceps militaris* (nhộng trùng thảo), trong đó MT-4 là môi trường có năng suất sinh học cao nhất ($11.63 \pm 1.34\%$). Trong bốn loại cơ chất nền (3 loại gạo lứt A, B, C và thóc D) được đánh giá với năng suất sinh học đạt $10.92 \pm 1.96\%$, gạo B được xem là cơ chất nền phù hợp nhất để nuôi trồng nhộng trùng thảo. Ảnh hưởng của số lần nuôi cấy đến thoái hóa giống cho thấy F1 vẫn có các tính trạng tương tự như F0, F5 bắt đầu có hiện tượng thoái hóa giống, F8 có các dấu hiệu thoái hóa giống rõ ràng như màu sắc quả thể thay đổi, mật độ hệ sợi thưa, số mầm quả thể ít, năng suất sinh học chỉ đạt $0.95 \pm 0.14\%$.

Từ khóa: *Cordyceps militaris*, cơ chất nền, thoái hóa giống.

The Preliminary Investigation on Cultivation Technology of Orange Caterpillar Fungus *Cordyceps militaris* L. ex Fr. in Viet Nam

ABSTRACT

Four fruiting media (MT-1, MT-2, MT-3 and MT4) were used to cultivate *Cordyceps militaris* (orange caterpillar fungus). Results showed that MT-4 had highest biological productivity ($11.63 \pm 1.34\%$). Among four basal substrates including three brown rice types A, B, C and paddy rice D were assessed. With biological productivity of $10.92 \pm 1.96\%$, type B brown rice considered as the most suitable substrate to cultivate orange caterpillar fungus. However, fifth subculture started to showy degeneration of fungal stock as evidenced by the change of fruiting-body colour, the mycelial density, the number of fruiting-body primordia and biological productivity.

Keywords: *Cordyceps militaris*, basal substrates, degeneration.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Do có chứa nhiều hoạt chất (cordycepin, adenosin, polysaccharides, ergosterol và mannitol) nên từ lâu nhộng trùng thảo được coi là một loại thảo dược quý, có nhiều giá trị được liệu trong hạ đường huyết, chống viêm, ức chế sự phát triển của tế bào ung thư, điều hòa hệ miễn dịch, chống oxy hóa, tăng hoạt lực của tinh trùng. Tuy nhiên, nhộng trùng thảo có rất ít trong tự nhiên nên để tìm kiếm và sử dụng nhộng trùng thảo tự nhiên làm dược phẩm hoặc thực phẩm chức năng là vấn đề không khả thi

(Hong, 2010). Do đó, nghiên cứu một số nhân tố ảnh hưởng đến sự hình thành và sinh trưởng quả thể nhộng trùng thảo trên môi trường nhân tạo là rất cần thiết.

Những nghiên cứu ban đầu trên thế giới về môi trường nuôi trồng nhộng trùng thảo được thực hiện trên côn trùng. Tuy nhiên, nhược điểm của phương pháp nuôi trồng này là giá thành kinh tế cao, sản lượng thấp. Theo Shrestha (2012), ngũ cốc và một số chất hữu cơ khác được chứng minh là cơ chất tốt để thay thế côn trùng. Năm 1941, Kobayasi đã nghiên cứu sự hình thành quả thể của nhộng trùng thảo

trên cơ chất gạo. Kể từ đó, gạo được sử dụng như một thành phần chủ yếu cho sự sinh trưởng quả thể của nhộng trùng thảo (Li, 2002; Zhang 2003; Li et al., 2006; Wen et al., 2008). Gạo Husked thường được sử dụng trong nuôi trồng nhộng trùng thảo. Năng suất quả thể lớn nhất thu được khi sử dụng gạo (Wen et al., 2008). Bên cạnh đó, một số cơ chất hữu cơ khác có thể được sử dụng để nuôi trồng nhộng trùng thảo bao gồm: bột đậu, hạt ngô, lõi ngô, vỏ hạt bông, kê, lúa miến, lúa mì, ngũ cốc, hoa hướng dương (Li et al., 2004; Zhao et al., 2006). Gạo trộn với nhộng tằm được chứng minh là cơ chất tốt hơn các cơ chất khác và cho đến nay thường được sử dụng làm môi trường nuôi trồng (Zhao et al., 2006; Jin et al., 2009). Môi trường chứa Agar không phù hợp cho sự hình thành quả thể (Yahagi et al., 2004).

Hàm lượng nitơ trong môi trường nuôi trồng nhộng trùng thảo tương đối thấp. Nếu hàm lượng nitơ quá nhiều trong môi trường sẽ làm chậm quá trình biệt hóa để hình thành quả thể (Gao et al., 2000, Kobayasi, 1941).

Thời gian nuôi trồng nhộng trùng thảo phụ thuộc vào hình dạng và thể tích bình nuôi cấy. Quả thể thường được hình thành trong khoảng 35 -70 ngày (Yue, 2010). Theo Zhang và Liu (1997) giai đoạn hình thành quả thể là 35 -45 ngày trên cơ chất chính là gạo và 40 -70 ngày trên các cơ chất khác như ngô, kê và gạo Tussah.

Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm tuyển chọn môi trường phù hợp nhất trong nuôi trồng nấm nhộng trùng thảo và đánh giá ảnh hưởng của thể hệ nuôi trồng đến hiện tượng thoái hóa giống.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Giống nhộng trùng thảo được lưu giữ và bảo quản ở 4°C trên môi trường PDA (200g/l khoai tây, 10g/l glucose, 15 g/l agar) tại phòng nghiên cứu, Trung tâm Công nghệ Sinh học Thực vật - Viện Di truyền Nông nghiệp. Môi trường YMK được sử dụng để nhân giống dịch thể: 20 g/l glucose, 5 g/l cao nấm men, 2 g/l KH_2PO_4 , 1 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ở nhiệt độ 25°C, pH 6,0, tốc độ lắc 150 vòng/phút, thời gian nhân giống là 120 giờ.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Nuôi trồng nhộng trùng thảo

Môi trường nuôi nhộng trùng thảo được chia thành 2 nhóm: Nhóm I (thành phần phụ gia là các chất hữu cơ tự nhiên) gồm môi trường nuôi trồng của Shrestha et al., (2004) kí hiệu là MT-1 và môi trường Shrestha đã được phòng nghiên cứu, Trung tâm Công nghệ sinh học thực vật cải tiến, kí hiệu là MT-2. Nhóm II (thành phần phụ gia hóa chất sản xuất nhân tạo có nguồn gốc từ Trung Quốc) gồm môi trường nuôi trồng của Wen et al., (2012), kí hiệu MT-3. Môi trường Wen cải tiến được kí hiệu là MT-4.

Cơ chất nền nuôi trồng nhộng trùng thảo: 4 loại cơ chất nền được sử dụng trong thí nghiệm này gồm 3 loại gạo lứt khác nhau kí hiệu là A, B, C và 1 loại thóc kí hiệu là D.

Các giống F0 (giống gốc ban đầu, chưa được nuôi trồng); F1, F5 và F8 được nuôi trồng qua 1, 5 và 8 thế hệ.

2.2.2. Ươm sợi và chăm sóc ra quả thể

Nhộng trùng thảo được nuôi trong bình có kích thước 7x10cm với cơ chất trong mỗi bình nuôi trồng là 25g, chế độ ươm và chăm sóc ra quả thể theo quy trình của Wen et al., (2012). Bình nuôi trồng được để ở điều kiện tối, không chiếu sáng, nhiệt độ 20°C trong 10 ngày. Sau đó được để ở nhiệt độ ra quả thể: 25°C với chu kỳ chiếu sáng/tối: 14/10 (500 lux). Các chỉ tiêu: thời gian hệ sợi phát triển kín cơ chất (ngày), đặc điểm hình thái sợi, mật độ sợi bề mặt, thời gian hình thành mầm (ngày), số lượng mầm, đặc điểm hình thái và phát triển của mầm quả thể, chiều dài (mm), đường kính quả thể (mm) và thời gian thu quả thể (ngày) được theo dõi. Mật độ hệ sợi bề mặt được đánh giá theo các mức độ +: mật độ thưa, ++: mật độ trung bình, +++: mật độ cao.

2.2.3. Tính năng suất sinh học (BE%)

Năng suất sinh học được tính theo phương pháp của Shrestha et al., (2012)

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

Trong đó, BE là biological efficiency

Quả thể được sấy theo phương pháp của ở 60°C trong 24 giờ.

2.2.4. Xử lý số liệu

Mỗi thí nghiệm được tiến hành lặp lại 3 lần. Số liệu được phân tích bằng sử dụng phần mềm Microsoft Excel 2010. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất $P < 0,05$ được biểu hiện bằng ký tự (theo cột) sau giá trị trung bình và sai số chuẩn.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của môi trường đến khả năng sinh trưởng của sợi nấm, sự hình thành và phát triển của mầm quả thể, năng suất sinh học

3.1.1. Ảnh hưởng của môi trường đến tốc độ phát triển, mật độ và đặc điểm hình thái sợi

Tốc độ phát triển sợi là một trong những chỉ tiêu liên quan chặt chẽ đến điều kiện nuôi trồng như thành phần dinh dưỡng, độ ẩm cơ chất, nhiệt độ. Trong các yếu tố dinh dưỡng, hàm lượng nitơ và cacbon được chú ý hơn cả. Theo Gao et al., (2000), trong môi trường nuôi trồng nhộng trùng thảo, nhu cầu hàm lượng nitơ tương đối thấp. Nếu hàm lượng nitơ quá cao sẽ làm chậm quá trình phát triển của sợi và quá trình biệt hóa hình thành quả thể. Trong hai nhóm môi trường, thành phần nhộng tằm và peptone được coi là hai thành phần bổ sung nitơ. Kết quả cho thấy bốn loại môi trường không có

sự khác nhau đáng kể đến tốc độ phát triển sợi, mật độ sợi và đặc điểm hình thái của sợi. Thời gian hệ sợi phát triển kín cơ chất dao động từ $10,44 \pm 1,35$ ngày (MT-3) đến $11,61 \pm 1,10$ ngày (MT-1). Trong giai đoạn ươm sợi, sợi có màu trắng đồng nhất và chuyển dần sang màu vàng cao khi được chiếu sáng. Mật độ sợi cao. Căn cứ vào các chỉ tiêu này cho thấy, cả 4 loại môi trường khá phù hợp với giai đoạn ươm sợi của nhộng trùng thảo.

3.1.2. Ảnh hưởng của môi trường đến sự hình thành và phát triển mầm quả thể, năng suất sinh học

Sau khi để trong điều kiện tối 10 ngày ở nhiệt độ 20°C, các bình nuôi trồng được chiếu sáng với chu kỳ 14 giờ sáng/10 giờ tối và nhiệt độ 25°C. Thời gian hình thành mầm quả thể ở các môi trường không có sự sai khác nhiều, dao động từ $16,01 \pm 0,83$ ngày (trên MT-2) đến $17,33 \pm 1,23$ ngày (trên MT-1). Tuy nhiên, số lượng mầm quả thể ở MT-4 cao nhất với $90,94 \pm 16,55$ mầm trong khi MT-1 có $62,83 \pm 14,45$ mầm. Đặc điểm hình thái của mầm ở các môi trường giống nhau không có sự khác biệt: màu vàng cam, đỉnh nhọn, không tù. Trong quá trình phát triển, mầm quả thể hướng quang mạnh, phát triển tương đối nhanh. Chiều dài quả thể và đường kính quả thể ở các môi trường không khác nhau đáng kể. Do số lượng mầm ở MT-4 cao hơn các môi trường khác nên năng suất sinh học ở MT- 4 cao nhất với 11,63%.

Bảng 1. Ảnh hưởng của bốn loại môi trường đến tốc độ phát triển, đặc điểm hình thái và mật độ sợi

Môi trường	Thời gian hệ sợi phát triển kín cơ chất (ngày)	Đặc điểm hình thái sợi	Mật độ sợi bề mặt
MT-1	$11,61 \pm 1,10$	Màu trắng đồng nhất trong giai đoạn ươm sợi, màu vàng cam trong giai đoạn chiếu sáng.	+++
MT-2	$10,95 \pm 0,92$	Màu trắng đồng nhất trong giai đoạn ươm sợi, màu vàng cam trong giai đoạn chiếu sáng.	+++
MT-3	$10,44 \pm 1,35$	Màu trắng đồng nhất trong giai đoạn ươm sợi, màu vàng cam trong giai đoạn chiếu sáng.	+++
MT-4	$10,57 \pm 1,19$	Màu trắng đồng nhất trong giai đoạn ươm sợi, màu vàng cam trong giai đoạn chiếu sáng.	+++

Bảng 2. Ảnh hưởng của môi trường nuôi trồng đến thời gian hình thành mả, số lượng mả và đặc điểm hình thái quả thể của nhộng trùng thảo

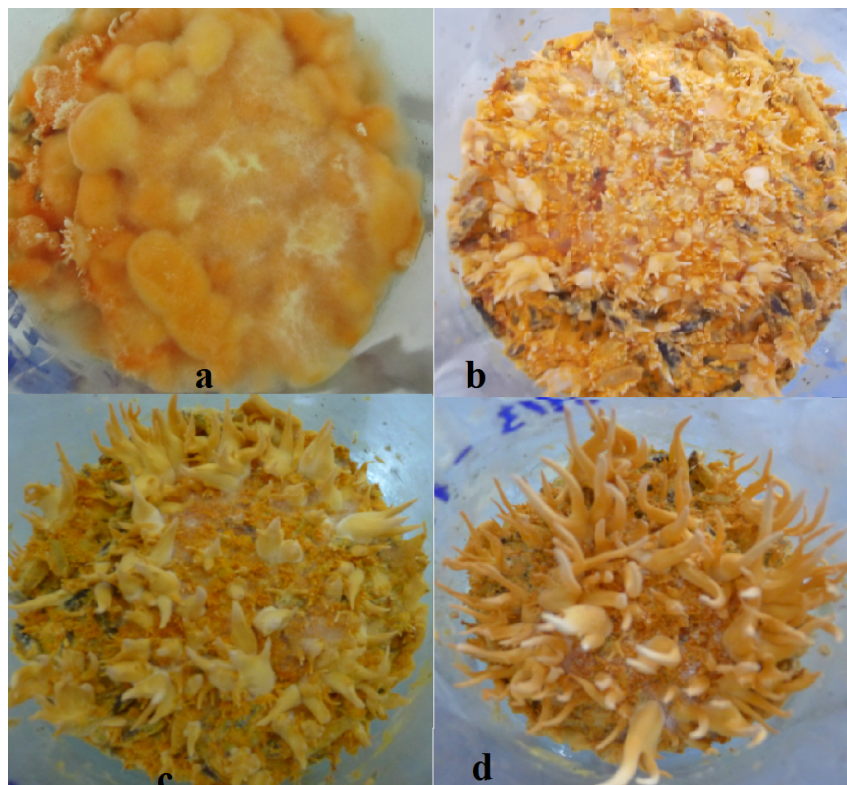
Môi trường	Thời gian hình thành mả (ngày)	Số lượng mả	Đặc điểm hình thái và phát triển mả quả thể
MT-1	17,33 ± 1,23	62,83 ± 14,45 ^b	Đỉnh nhọn, màu vàng cam, hương quang mạnh
MT-2	16,01 ± 0,83	75,32 ± 11,34 ^a	Đỉnh nhọn, màu vàng cam, hương quang mạnh
MT-3	16,52 ± 1,26	81,11 ± 14,81 ^{a,c}	Đỉnh nhọn, màu vàng cam, hương quang mạnh
MT-4	16,24 ± 1,12	90,94 ± 16,55 ^c	Đỉnh nhọn, màu vàng cam, hương quang mạnh

Ghi chú: Trong phạm vi cùng một cột, các giá trị mang các chữ cái khác nhau chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức $P < 0,05$.

Bảng 3. Ảnh hưởng của môi trường đến sự phát triển quả thể và năng suất sinh học

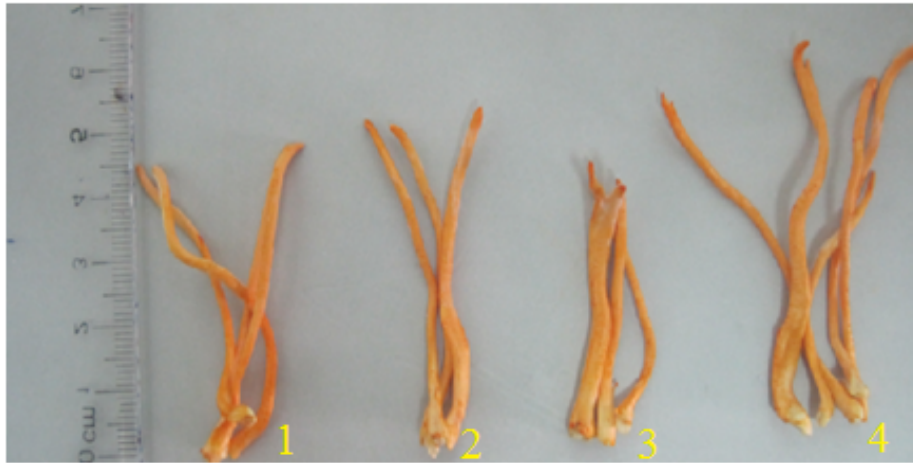
Môi trường	Thời gian thu quả thể (ngày)	Chiều dài quả thể (mm)	Đường kính quả thể (mm)	BE (%)
MT-1	45-50	52,78 ± 5,07	2,10 ± 0,56	7,28 ± 1,52 ^a
MT-2	45-50	54,5 ± 9,85	2,44 ± 0,68	8,84 ± 0,11 ^a
MT-3	45-50	52,89 ± 5,08	2,11 ± 0,42	9,89 ± 1,71 ^a
MT-4	45-50	55,33 ± 3,99	2,51 ± 0,67	11,63 ± 1,34 ^b

Ghi chú: Trong phạm vi cùng một cột, các giá trị mang các chữ cái khác nhau chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức $P < 0,05$.



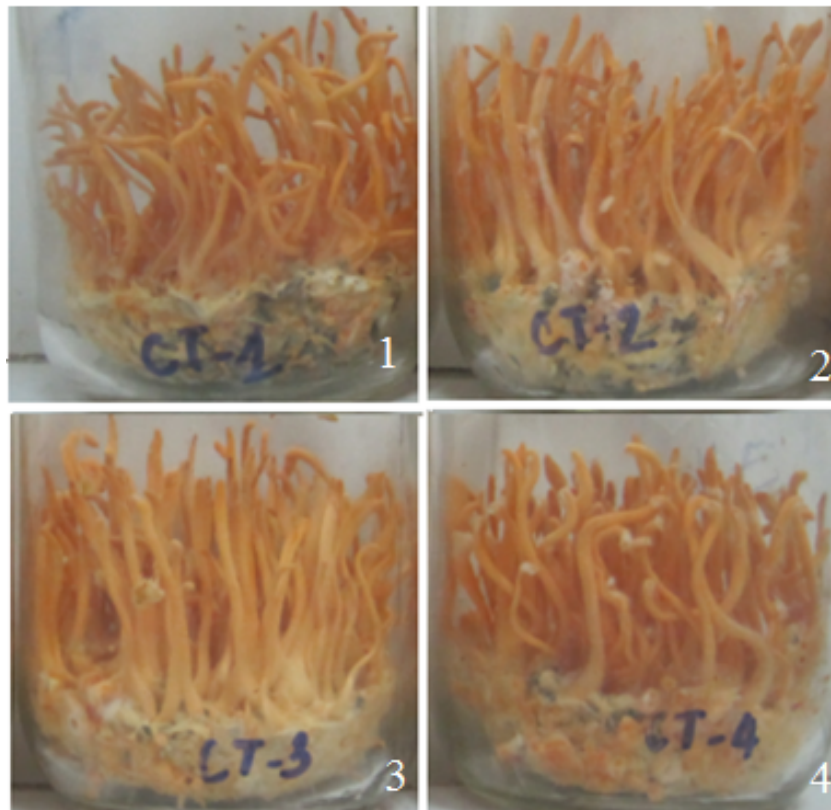
Hình 1. Các giai đoạn phát triển mả quả thể

Ghi chú: a- Mả quả thể hình thành, b- mả quả thể được 5 ngày tuổi, c- mả quả thể được 9 ngày tuổi, d- mả quả thể được 13 ngày tuổi.



Hình 2. Đặc điểm hình thái, chiều dài và đường kính quả thể nhộng trùng thảo ở các môi trường nuôi khác nhau

Ghi chú: 1-MT-1; 2: MT-2, 3: MT-3, 4: MT-4



Hình 3. Nhộng trùng thảo được nuôi trồng trên 4 loại môi trường khác nhau

Ghi chú 1: MT-1; 2: MT-2, 3: MT-3, 4: MT-4

Bốn môi trường được chúng tôi chia thành 2 nhóm: nhóm môi trường 1 có thành phần chủ yếu là các chất hữu cơ tự nhiên và nhóm môi trường 2 có thành phần là các hợp chất hữu cơ

sản xuất nhân tạo. Dựa trên các chỉ tiêu thu được, có thể nhận thấy nhóm môi trường 2 khá vượt trội so với nhóm môi trường 1. Môi trường MT-4 là môi trường hiệu quả hơn so với môi

trường nguyên bản ban đầu. Theo kết quả nghiên cứu của Shrestha et al., (2012), hai chỉ tiêu chiều dài quả thể và năng suất sinh học khi nuôi trồng nhộng trùng thảo phụ thuộc vào từng giống nhộng trùng thảo. Trong đó chiều dài quả thể dao động từ 49 - 106mm và năng suất sinh học đạt từ 13,68 - 27,25%.

3.2. Ảnh hưởng của cơ chất nền đến khả năng sinh trưởng của sợi nấm, sự hình thành và phát triển mầm quả thể, năng suất sinh học

3.2.1. Ảnh hưởng của cơ chất đến tốc độ phát triển, mật độ và đặc điểm hình thái sợi nấm

Trong môi trường nuôi trồng nhộng trùng thảo, gạo là thành phần chính. Tuy nhiên, không phải loại gạo nào cũng phù hợp để đóng vai trò làm cơ chất chính trong môi trường nuôi trồng nhộng trùng thảo. Gạo lứt thường được sử dụng do vẫn còn lớp vỏ cám bên ngoài hạt chứa nhiều vitamin B1. Trong nghiên cứu này, để tìm ra được loại cơ chất nền phù hợp trong nuôi trồng nhộng trùng thảo, 4 loại cơ chất nền (không công bố) đã được chúng tôi tiến hành khảo sát gồm: 3 loại gạo (kí hiệu: A, B, C) và 1 loại thóc (kí hiệu: D). Kết quả thu được: mật độ sợi và đặc điểm hình thái sợi khi nuôi trồng trong 4 loại cơ chất nền không có sự khác nhau. Sợi có màu trắng đồng nhất, phát triển kín bình nuôi trồng khi được ươm trong điều kiện tối và dần chuyển sang màu vàng cam khi được chiếu sáng, mật độ sợi

cao. Tuy nhiên, thời gian hệ sợi phát triển kín cơ chất khác nhau ở các công thức. Với thời gian hệ sợi phát triển kín bình nuôi trồng là $9,33 \pm 0,54$ ngày, loại gạo C cho tốc độ sợi phát triển nhanh nhất. Tốc độ sợi phát triển chậm nhất trên loại thóc D ($12,47 \pm 1,25$ ngày).

3.2.2. Ảnh hưởng của cơ chất nền đến sự hình thành và phát triển mầm quả thể, năng suất sinh học

Đánh giá hiệu quả của các loại cơ chất nền đến sự hình thành mầm quả thể trong nuôi trồng nhộng trùng thảo cho thấy, mặc dù loại gạo C cho tốc độ phát triển sợi cao nhất, kết quả thu được loại gạo A là cơ chất nền cho thời gian hình thành mầm quả thể nhộng trùng thảo ngắn nhất với $15,82 \pm 0,80$ ngày. Số lượng mầm quả thể thu được từ cơ chất B là cao nhất với $55,19 \pm 12,04$ mầm/bình nuôi trồng. Về đặc điểm hình thái, mầm quả thể và sự phát triển của quả thể thu được khi nuôi trồng nhộng trùng thảo trong cơ chất D có sự khác biệt so với khi nuôi trồng nhộng trùng thảo trên các cơ chất khác. Mầm quả thể được nuôi trồng trong cơ chất D có đỉnh tù, màu vàng cam, tốc độ phát triển chậm, số lượng mầm ít ($15,92 \pm 5,76$ mầm/bình nuôi trồng). Đặc điểm hình thái quả thể cũng có sự khác biệt (thấp, đường kính to). Căn cứ vào chiều dài quả thể, đường kính quả thể, số lượng mầm và năng suất sinh học, gạo B là cơ chất nền phù hợp nhất trong các loại cơ chất nền đã khảo sát với năng suất sinh học đạt 10,92%.

Bảng 4. Ảnh hưởng của cơ chất nền đến tốc độ phát triển, đặc điểm hình thái và mật độ sợi

Loại gạo	Thời gian hệ sợi phát triển kín cơ chất (ngày)	Đặc điểm hình thái sợi	Mật độ sợi bề mặt
A	$10,13 \pm 1,14^a$	Màu trắng đồng nhất trong giai đoạn ươm sợi, màu vàng cam trong giai đoạn chiếu sáng.	+++
B	$11,25 \pm 1,06^b$	Màu trắng đồng nhất trong giai đoạn ươm sợi, màu vàng cam trong giai đoạn chiếu sáng.	+++
C	$9,33 \pm 0,54^c$	Màu trắng đồng nhất trong giai đoạn ươm sợi, màu vàng cam trong giai đoạn chiếu sáng.	+++
D	$12,47 \pm 1,25^d$	Màu trắng đồng nhất trong giai đoạn ươm sợi, màu vàng cam trong giai đoạn chiếu sáng.	+++

Ghi chú: Trong phạm vi một cột, các giá trị mang các chữ cái khác nhau chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức $P < 0,05$.

Bảng 5. Ảnh hưởng của cơ chất nền đến thời gian hình thành mầm, số lượng mầm và đặc điểm hình thái quả thể của nhộng trùng thảo

Cơ chất nền	Thời gian hình thành mầm (ngày)	Số lượng mầm	Đặc điểm hình thái và phát triển mầm quả thể
A	15,82 ± 0,80 ^a	49,45 ± 11,76 ^a	Đỉnh nhọn, thẳng, màu vàng cam, hướng quang mạnh, tốc độ phát triển nhanh
B	16,60 ± 1,01 ^b	55,19 ± 12,04 ^b	Đỉnh nhọn, thẳng, màu vàng cam, hướng quang mạnh, tốc độ phát triển nhanh
C	16,89 ± 0,52 ^b	38,23 ± 16,58 ^a	Đỉnh nhọn, thẳng màu vàng cam, hướng quang mạnh, tốc độ phát triển nhanh
D	17,11 ± 0,78 ^b	15,92 ± 5,76 ^c	Đỉnh tù, màu vàng cam, hướng quang mạnh, tốc độ phát triển chậm

Ghi chú: Trong phạm vi cùng một cột, các giá trị mang các chữ cái khác nhau chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức $P < 0,05$.

Bảng 6. Ảnh hưởng của cơ chất nền đến sự phát triển quả thể và năng suất sinh học

Cơ chất nền	Thời gian thu quả thể (ngày)	Chiều dài quả thể (mm)	Đường kính quả thể (mm)	BE (%)
A	45 - 50	58,65 ± 6,75 ^a	2,06 ± 0,64 ^a	8,74 ± 1,86 ^a
B	45 - 50	59,55 ± 7,25 ^b	2,15 ± 0,55 ^a	10,92 ± 1,96 ^b
C	45 - 50	48,45 ± 8,25 ^b	2,04 ± 0,56 ^a	8,08 ± 0,89 ^a
D	45 - 50	39,85 ± 7,55 ^c	3,11 ± 0,44 ^b	2,43 ± 0,74 ^c

Ghi chú: Trong phạm vi cùng một cột, các giá trị mang các chữ cái khác nhau chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức $P < 0,05$.



Hình 4. Ảnh hưởng của cơ chất nền đến số lượng mầm quả thể

Ghi chú: a - gạo A, b- gạo B, c- gạo C, d- thóc D

3.2.3. Ảnh hưởng của các thế hệ nuôi trồng đến hiện tượng thoái hóa giống trong nuôi trồng nhộng trùng thảo

Thoái hóa giống là một trong những vấn đề lớn trong nuôi trồng nhộng trùng thảo. Chúng tôi đã tiến hành các thí nghiệm so sánh sự phát triển của các mẫu nhộng trùng thảo F0, F1, F5 và F8. Kết quả thí nghiệm cho thấy thời gian hình thành mầm quả thể khác nhau giữa F1, F5, F8. F1 vẫn giữ được các tính trạng tương

tự như F0, trong khi F8 có các dấu hiệu của thoái hóa giống như: mật độ sợi bề mặt thưa hơn, khả năng hình thành mầm quả thể kém hơn. Số lượng mầm quả thể của F8 biến động khá lớn giữa các bình và chỉ đạt $5,70 \pm 4,84$ mầm/bình nuôi trồng. Do số lượng mầm quả thể của F8 quá ít, không phải cạnh tranh dinh dưỡng nhiều nên quả thể phát triển chiều dài đến $80,15 \pm 7,15\text{mm}$ vượt trội hơn các giống F0, F1 và F5.

Bảng 7. Ảnh hưởng của giống đến đặc điểm phát triển của hệ sợi

Giống	Thời gian hệ sợi phát triển kín cơ chất (ngày)	Đặc điểm hình thái sợi	Mật độ sợi bề mặt
F0	$10,89 \pm 0,63^a$	Màu trắng đồng nhất trong giai đoạn ươm sợi, màu vàng cam trong giai đoạn chiếu sáng.	+++
F1	$10,55 \pm 0,55^a$	Màu trắng đồng nhất trong giai đoạn ươm sợi, màu vàng cam trong giai đoạn chiếu sáng.	+++
F5	$13,42 \pm 2,40^b$	Màu trắng đồng nhất trong giai đoạn ươm sợi, màu vàng nhạt trong giai đoạn chiếu sáng.	++
F8	$16,57 \pm 1,89^c$	Màu trắng đồng nhất trong giai đoạn ươm sợi, màu vàng nhạt trong giai đoạn chiếu sáng.	++

Ghi chú: Trong phạm vi cùng một cột, các giá trị mang các chữ cái khác nhau chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức $P<0,05$.

Bảng 8. Ảnh hưởng của giống đến thời gian hình thành mầm, số lượng mầm và đặc điểm hình thái quả thể của nhộng trùng thảo

Giống	Thời gian hình thành mầm (ngày)	Số lượng mầm	Đặc điểm hình thái và phát triển mầm quả thể
F0	$15,56 \pm 0,62^a$	$70,15 \pm 15,69^a$	Đỉnh nhọn, thẳng, màu vàng cam đậm, hướng quang mạnh, tốc độ phát triển nhanh
F1	$16,65 \pm 1,15^b$	$71,35 \pm 19,66^b$	Đỉnh nhọn, thẳng, màu vàng cam đậm, hướng quang mạnh, tốc độ phát triển nhanh
F5	$20,55 \pm 1,50^c$	$34,15 \pm 6,00^c$	Đỉnh nhọn, thẳng màu vàng cam đậm, hướng quang mạnh, tốc độ phát triển nhanh
F8	$25,55 \pm 1,75^d$	$5,70 \pm 4,84^d$	Đỉnh nhọn, màu vàng cam nhạt, hướng quang mạnh, tốc độ phát triển nhanh

Ghi chú: Trong phạm vi một cột, các giá trị mang các chữ cái khác nhau chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức $P<0,05$.

Bảng 9. Ảnh hưởng của giống đến sự phát triển quả thể và năng suất sinh học

Giống	Thời gian thu quả thể (ngày)	Chiều dài quả thể (mm)	Đường kính quả thể (mm)	BE (%)
F0	45 - 50	$54,90 \pm 3,15^a$	$2,15 \pm 0,55^a$	$12,95 \pm 1,55^a$
F1	45 - 50	$55,65 \pm 4,00^b$	$2,09 \pm 0,58^a$	$12,98 \pm 1,46^a$
F5	60 - 65	$40,80 \pm 5,00^c$	$2,15 \pm 0,65^a$	$6,55 \pm 0,85^b$
F8	70 - 75	$80,15 \pm 7,15^d$	$5,11 \pm 0,41^b$	$0,95 \pm 0,14^c$

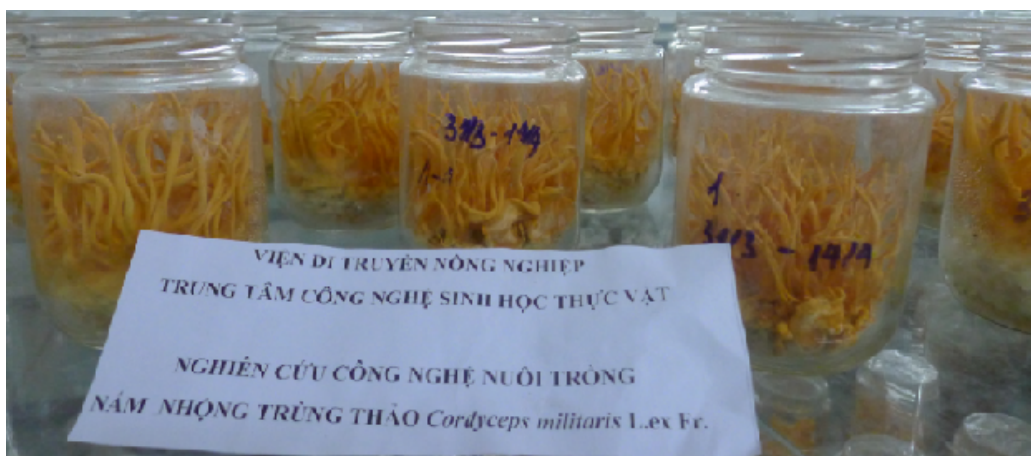
Ghi chú: Trong phạm vi một cột, các giá trị mang các chữ cái khác nhau chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức $P<0,05$.



Hình 5. Đặc điểm hình thái và số lượng quả thể nhộng trùng thảo F8

Hiện tượng thoái hóa giống của nhộng trùng thảo đã được nghiên cứu nhiều trên thế giới. Theo Shrestha et al., (2004) nếu các chủng được tạo ra từ bào tử phức (multi-spores) hoặc mô tế bào, thời gian bị thoái hóa nhanh hơn, có thể sau 1 đến 2 lần cấy chuyển. Ngược lại, có thể hạn chế quá trình thoái hóa nếu các chủng nuôi cấy được phân lập từ đơn bào tử (Shrestha et al., 2004; Sung et al., 2006). Trong nghiên cứu này, giống nấm được chúng tôi tạo ra bằng phương pháp phân lập mô tế bào. Kết quả quan sát cho thấy từ thế hệ 5 đã xuất hiện những dấu hiệu ban đầu bị thoái hóa giống. F8 có những đặc điểm rõ ràng của thoái hóa giống. Màu sắc quả thể của F8 nhạt dần. Đặc điểm này phù hợp với nghiên cứu của Sung et al., (2006) về sự thay

đổi màu sắc quả thể của các chủng *C. militaris* sau khi nuôi trồng qua nhiều thế hệ. Theo Lin et al., (2010), các chủng *C. militaris* thoái hóa có hoạt tính dehydrogenase giảm, quả thể thay đổi sắc tố nhưng không thay đổi kiểu ghép cặp hoặc dsRNA. Thêm vào đó, các chủng *C. militaris* thoái hóa có thể hình thành quả thể đậm (synnemata) màu trắng trong khi nuôi trồng (Wang et al., 2009). Bản chất thoái hóa của các chủng *C. militaris* nói riêng và nấm nói chung là do đột biến DNA (Li et al., 2003). Qua nhiều thế hệ nuôi trồng, tần số đột biến DNA tăng lên, dẫn đến tình trạng bị thoái hóa. Hiện nay, những gen liên quan đến thoái hóa khi nuôi trồng *C. militaris* vẫn chưa được xác định (Zheng et al., 2011).



Hình 6. Mô hình nuôi trồng nhộng trùng thảo tại Trung tâm Công nghệ Sinh học thực vật - Viện Di truyền nông nghiệp

4. KẾT LUẬN

- Đã cải tiến thành công môi trường của Wen et al., (2012) với năng suất sinh học cao hơn so với đối chứng ở môi trường MT-4 ($11,63 \pm 1,34\%$).

- Cơ chất từ loại gạo B có thể được sử dụng làm cơ chất nền phù hợp trong môi trường nuôi trồng nhộng trùng thảo với năng suất sinh học cao nhất ($10,92 \pm 1,96\%$).

- Qua nhiều thế hệ nuôi trồng, nhộng trùng thảo có hiện tượng thoái hóa. Đến đời F8, nhộng trùng thảo có các dấu hiệu thoái hóa giống rõ rệt: mật độ sợi bề mặt thưa hơn, khả năng hình thành mầm quả thể kém, màu sắc quả thể nhạt dần, năng suất sinh học thấp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Gao XH, Wu W, Qian GC (2000). Study on influences of abiotic factors on fruitbody differentiation of *Cordyceps militaris*. Acta Agric Shanghai, 16(Suppl): 93 -98.
- Hong IP, Kang PD, Kim KY (2010) Fruit body formation on silkworm by *Cordyceps militaris*. Mycobiology, 38: 128 -132.
- Jin LY, Du ST, 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.
- Kobayasi Y (1941) The genus *Cordyceps* and its allies. Sci Rep Tokyo Bunrika Daigaku B, 84(5): 53 -260
- Li CB, Tong XD, Bai J (2004). Artificial stromata production of *Cordyceps militaris*. J Dalian Natl Univ., 6(5): 29 -31.
- Li MN, Wu XJ, Li CY (2003). Molecular analysis of degeneration of artificial planted *Cordyceps militaris*. Mycosystema, 22: 277 -282.
- Li SZ, Xia FN, Yang XB (2006). Comparative studies on the cultivation of 5 selected strains of *Cordyceps militaris*. Edible Fungi China, 25(6):15 -16.
- Li X (2002). Man made cultivates of *Cordyceps militaris* (L) Link. J Microbiol (China), 22(6): 56 -57.
- Lin QQ, Qiu XH, Zheng ZL (2010). Characteristics of the degenerate strains of *Cordyceps militaris*. Mycosystema, 29: 670 -677.
- Shrestha B, Han SK, Sung JM and Sung GH (2012). Fruiting Body Formation of *Cordyceps militaris* from Multi-Ascospore Isolates and Their Single Ascospore Progeny Strains. Mycobiology, 40(2): 100-106.
- Shrestha B, Park YJ, Han SK, Choi SK, Sung JM (2004). Instability in in vitro fruiting of *Cordyceps militaris*. J Mushroom Sci Prod., 2: 140-4.
- Shrestha B, Zhang W, Zhang Y, Liu XZ (2012). The medicinal fungus *Cordyceps militaris*: research and development. German Mycological Society and Springer.
- Sung JM, Park YJ, Lee Jo (2006). Effect of preservation periods and subcultures on fruiting body formation of *Cordyceps militaris* in vitro. Mycobiology, 34: 196 -199.
- Wen TC, Li, Kang C and He J (2012). A molecular genetic study on fruiting-body formation of *Cordyceps militaris*. African Journal of Microbiology Research, 6(24): 5215-5221.
- Yahagi N, Yahagi R, Takano F (2004). Growth of ascocarps from cultured *Cordyceps militaris* (L.:Fr.) Fr. và *Cordyceps formicarium* Kobayasi in an agar medium. Nippon Kingakukai Kaiho, 45: 15 -19.
- Yue C (2010). Optimization on *Cordyceps militaris*'s cultivating conditions. Food Ind., 2: 60 -61.
- Zhang XK, Liu WX (1997). Experimental studies on planting *Cordyceps militaris* (L. ex Fr.) Link with different culture materials. Edible Fungi China, 16(2): 21 -22.
- Zhang XZ (2003). Biological characteristics and cultivation techniques of *Cordyceps militaris* C-48. Edible Fungi, 25(S1):12.
- Zheng P, Xia YL, Xiao GH (2011). Genome sequence of the insectpathogenic fungus *Cordyceps militaris*, a valued traditional Chinese medicine. Genome Biol., 12: R116.
- Zhao CY, Li H, Zhang M (2006). Optimization on conditions of artificial cultivation of *Cordyceps militaris*. J Shenyang Agric Univ., 37: 209 -212.
- Wang HJ, Lv ZL, Zhang BP (2009). Study on variability of *Cordyceps militaris*. Edible Fungi China., 28(5): 30 -31.
- Wen TC, Kang JC, Li GR (2008). Effects of different solid culture condition on fruit body and cordycepin output of *Cordyceps militaris*. Guizhou Agric Sci., 36(4): 92 -94.