

# NGHIÊN CỨU NUÔI TẠO QUẢ THỂ NẤM ĐÔNG TRÙNG HẠ THẢO (*CORDYCEPS MILITARIS*) TẠI TRÀ VINH

## INVESTIGATION ON FRUITING BODY OF *CORDYCEPS MILITARIS* CULTIVATION IN TRA VINH

Nguyễn Ngọc Trai<sup>1</sup>, Phan Quốc Nam<sup>2</sup>, Sơn Que Sa Na<sup>3</sup>, Trần Thị Thảo Đàng<sup>4</sup>

**Tóm tắt** – Nấm đông trùng hạ thảo *Cordyceps sinensis* là loại dược liệu truyền thống được sử dụng ở Trung Quốc. Tuy nhiên, *C. sinensis* chỉ mọc trong điều kiện tự nhiên với sản lượng rất thấp trong khi quả thể nấm *Cordyceps militaris* có thể được nuôi trồng trong môi trường ngũ cốc. *C. militaris* chứa thành phần dược chất tương tự nấm *C. sinensis*, đặc biệt là cordycepin-chất có khả năng chống ung thư. Nghiên cứu được thực hiện nhằm mục tiêu khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ, cường độ chiếu sáng, lượng nhộng tằm xay bổ sung vào môi trường gạo lứt, tuổi nhộng tằm lên sự hình thành quả thể nấm *C. militaris*. Kết quả nghiên cứu cho thấy nhiệt độ tối ưu cho sự hình thành quả thể là 25°C dưới điều kiện chiếu sáng 500 lux. Hộp nuôi với 50 g gạo lứt được bổ sung 50 ml nước cất và 5 g nhộng tằm xay sau 60 ngày chủng giống, số lượng quả thể đạt được là 20,11 quả thể và đạt trọng lượng 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/g. Nhộng tằm 9 ngày tuổi là tốt nhất cho việc gây nhiễm và phát triển quả thể nấm *C. militaris* với số quả thể đạt trung bình 1,69 quả thể/nhộng.

**Từ khóa:** *Cordyceps militaris*, nhộng tằm, quả thể, gạo lứt, nấm dược liệu.

**Abstract** – *Cordyceps sinensis* has traditionally been used in traditional Chinese medicine. However, *C. sinensis* has very low mass production and only grows in natural environment, whereas the fruiting bodies of *Cordyceps militaris* can be successfully farmed in cereals. *C.*

*militaris* contains similar biochemical components as *C. sinensis* as well as the anticancer component cordycepin. This study is to investigate the effect of temperature, light intensity, milling of silkworm pupae supplemented with brown rice medium and silkworm pupae age on fruiting bodies of *C. militaris*. The optimal temperature for the formation of fruiting bodies was 25°C, under conditions of 500 lux lighting. A bottle with 50 g of brown rice supplemented with 50 ml of distilled water and 5 g of milling silkworm pupae produced 20,11 fruiting bodies with the weight of 10.14 g, Cordycepin and Adenosine obtained were 10.08 mg/g and 0.57 mg/g, respectively. From mounting, the nine-day-old pupae showed the best incidence of infection and development of fruiting bodies of *C. militaris* with 1.69 fruiting bodies/pupae.

**Keywords:** *Cordyceps militaris*, silkworm pupae, fruiting body, brown rice, medicinal mushroom.

### I. TÍNH CẤP THIẾT CỦA ĐỀ TÀI

Ngày nay, nhu cầu sử dụng các thảo dược có nguồn gốc từ thiên nhiên để phòng và trị bệnh đã trở nên phổ biến như đông trùng hạ thảo, nấm linh chi, nhân sâm, sâm Ngọc Linh,... Trong đó, đông trùng hạ thảo (ĐTHT) được xem là loại thảo dược thượng hạng trong các loại thảo dược. ĐTHT là tên gọi chung cho một nhóm nấm kí sinh và gây bệnh trên côn trùng. Cuối mùa thu đầu mùa đông, chúng kí 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

<sup>1,2,3,4</sup>Khoa Nông nghiệp – Thủy sản, Trường Đại học Trà Vinh.

Email: ngoctrain@tvu.edu.vn

Ngày nhận bài: 21/5/2017; Ngày nhận kết quả bình duyệt: 17/8/2017; Ngày chấp nhận đăng: 12/9/2017

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 [1]. Giá trị dược liệu của ĐTHT được chứng minh là do chất chiết xuất từ nấm Cordyceps. Giống Cordyceps với hơn 400 loài đã được tìm thấy và mô tả, trong đó có khoảng 36 loài được nuôi trồng nhân tạo để sản xuất quả thể [2], [3]. Tuy nhiên, chỉ một vài loài được chọn lọc có khả năng sử dụng làm dược liệu bao gồm *C. sinensis*, *C. militaris*, *C. ophioglossoides*, *C. sobolifera*, *C. liangshanensis* và *C. cicadicola*. Trong đó, hai loài đã được sử dụng rộng rãi trong y học cổ truyền châu Á là *C. sinensis* và *C. militaris*. Mặc dù loài *C. sinensis* đã được sử dụng từ rất lâu nhưng chúng có giá thành rất cao do rất khó để nuôi trồng nhân tạo mà chỉ được thu hái ngoài tự nhiên [4]. 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 và trên kí chủ nhộng tằm [5]. Điểm đặc biệt quan trọng là loài *C. militaris* cũng chứa các chất có hoạt tính sinh học giống như ở loài *C. militaris*.

Thế giới và Việt Nam đã có một số công trình nghiên cứu nuôi trồng thành công loài ĐTHT (*C. militaris*) trên môi trường nhân tạo (gạo lức có bổ sung dinh dưỡng) và trên kí chủ nhộng tằm. Tuy nhiên, do việc chuyển giao công nghệ nuôi trồng khá đắt nên giá sản phẩm nấm ĐTHT (*C. militaris*) nuôi trồng được bán ra với giá cao (từ 100 - 120 triệu đồng/kg). Đề tài “Nghiên cứu nuôi tạo quả thể nấm đông trùng hạ thảo (*Cordyceps militaris*) tại Trà Vinh” được thực hiện với mục tiêu nghiên cứu nuôi tạo quả thể nấm ĐTHT (*C. militaris*) để tạo ra sản phẩm có giá thành vừa phải phục vụ nhu cầu phòng trị bệnh và bồi bổ sức khỏe cho người dân trong và ngoài tỉnh.

## II. PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### A. Phương tiện nghiên cứu

1) *Vật liệu*: Chủng nấm ĐTHT (*C. militaris*) được mua từ Viện Công nghệ và Đo lường Quốc gia (National Institute of Technology and Evaluation) Nhật Bản; gạo lức đỏ (sản phẩm của

Công ty TNHH Thương mại Dịch vụ Xuân Hồng) và nhộng tằm (loại nhộng đã được lấy kén) bổ sung vào môi trường nuôi nhân tạo (gạo lức) được mua tại siêu thị Co.opmart Trà Vinh. Kí chủ nhộng tằm là nhộng tằm được nuôi từ trứng tằm tại Trường Đại học Trà Vinh.

2) *Trang thiết bị, dụng cụ*: nghiên cứu sử dụng các trang thiết bị và dụng cụ thí nghiệm sẵn có tại Phòng Thí nghiệm Vi sinh, Khoa Nông nghiệp - Thủy sản, Trường Đại học Trà Vinh.

### B. Phương pháp nghiên cứu

Giống nấm *C. militaris* sau khi nhập về được hoạt hóa và cấy trên môi trường PDA (Potato Dextrose Agar) tại Khoa Nông nghiệp - Thủy sản, Trường Đại học Trà Vinh. Giống sau hoạt hóa được nuôi trong bình tam giác 250 ml chứa 100 ml môi trường với thành phần: 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 vòng/phút) để lấy dịch nuôi chủng vào các môi trường gạo lức hoặc tiêm vào kí chủ nhộng tằm.

Ảnh hưởng của nhiệt độ và cường độ chiếu sáng lên sự hình thành và phát triển quả thể nấm ĐTHT (*C. militaris*) được thực hiện trên giá thể chứa 20g gạo lức huyết rồng/keo thủy tinh được bổ sung 30 ml dung dịch dinh dưỡng/keo bao gồm: 10 g/l glucose; 10 g/l peptone; 1,0 g/l  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 1,0 g/l  $K_2HPO_4$ ; 1,0 mg/l NAA, pH được điều chỉnh = 5,6. Giá thể sau khử trùng được làm nguội để chủng dịch nuôi nấm *C. militaris*. Ảnh hưởng của lượng nhộng tằm xay bổ sung được nghiên cứu trên giá thể chứa 50 g gạo lức huyết rồng/hộp nuôi bổ sung 50 ml nước cất và nhộng tằm được xay nhuyễn với hàm lượng 0,0; 5; 10; 15; 20 g tương ứng với từng nghiệm thức. Dịch nuôi được chủng vào môi trường sau khi được thanh trùng và để nguội.

Môi trường nhân tạo (gạo lức) hoặc kí chủ sau khi chủng/tiêm dịch nuôi nấm *C. militaris* được đặt ở điều kiện thích hợp để tơ nấm phát triển và chuyển vào phòng nuôi để quả thể hình thành và phát triển.

Thí nghiệm được bố trí kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên với ba lần lặp lại. Trên môi trường nhân tạo, mỗi lần lặp lại là 10 keo nuôi. Nuôi tạo quả thể trên kí chủ nhộng tằm được thực hiện theo

phương pháp được mô tả bởi Hong et al. [6] với mỗi lần lặp lại là 10 con nhộng.

Các chỉ tiêu theo dõi được thu sau thời gian 60 ngày chủng giống gồm: số lượng quả thể, trọng lượng tươi quả thể (g), chiều cao quả thể (mm).

### C. Quy mô nghiên cứu

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

### D. Xử lý số liệu

Số liệu nghiên cứu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2003 và phần mềm thống kê StatgraphicS Centurion XVI.

## III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### A. Ảnh hưởng của nhiệt độ và cường độ chiếu sáng đến sự hình thành quả thể nấm đông trùng hạ thảo (*Cordyceps militaris*).



a



b

Hình 1: Tơ nấm *C. militaris* phủ kín bề mặt môi trường gạo lức (a) và giai đoạn quả thể sau 35 ngày chủng giống (b)

Sau thời gian 10,8 ngày (dao động từ 8 - 13 ngày) chủng giống (dịch nuôi) vào môi trường

gạo lức, tơ nấm đã phủ kín bề mặt 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 ương tơ, tơ nấm có màu trắng đục (Hình 1a) và chuyển sang màu vàng cam khi được chiếu sáng. Kết quả nghiên cứu cho thấy 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 và quả thể có màu cam, đỉnh nhọn đạt chiều cao 1,5-2cm sau 35 ngày chủng giống (Hình 1b). So với nghiên cứu được thực hiện bởi Lê Văn Vẻ và cộng sự [7], thời gian tơ nấm phủ kín bề mặt môi trường là không chênh lệch nhau nhiều nhưng thời gian mọc 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, 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 và được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của nhiệt độ và cường độ chiếu sáng lên tỉ lệ (%) keo nuôi hình thành quả thể

Cường độ ánh sáng (lux) (B)	Nhiệt độ (°C) (A)		Trung bình (%)
	20	25	
500	70,00	86,67	75,33
1000	66,67	73,33	70,00
<b>Trung bình (%)</b>	68,33 <sup>b</sup>	80,00 <sup>a</sup>	
<b>F(A)</b>	*		
<b>F(B)</b>	ns		
<b>F(A × B)</b>	ns		
<b>CV (%)</b>	9,53		

(Ghi chú: Trong cùng một hàng, số có chữ cái theo sau khác nhau thì có sự khác biệt thống kê qua phép kiểm định LSD ( $n, s$ ): khác biệt không có ý nghĩa thống kê; (\*): Khác biệt ở mức ý nghĩa 5% ( $P < 0,05$ ). Các giá trị đã được biến đổi dưới dạng  $Asin\sqrt{x}$  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 tỉ 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 tỉ lệ này và cũng không có sự tương tác giữa nhiệt độ nuôi và cường độ chiếu sáng lên tỉ 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 tỉ lệ keo nuôi hình thành quả thể cao nhất (86,67%) và thấp nhất 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/keo

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

(Ghi chú: Trong cùng một hàng, số có chữ cái theo sau khác nhau thì có sự khác biệt thống kê qua phép kiểm định LSD, (ns): khác biệt không có ý nghĩa thống kê; (\*\*): khác biệt ở mức ý nghĩa 1% ( $P < 0,01$ ). 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). Kết quả thí nghiệm cho thấy 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 (đạt 22,85 quả thể) và

thấp nhất 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
<b>Trung bình (%)</b>	28,98 <sup>b</sup>	42,03 <sup>a</sup>	
<b>F(A)</b>		**	
<b>F(B)</b>		ns	
<b>F(A × B)</b>		ns	
<b>CV (%)</b>		10,32	

(Ghi chú: Trong cùng một hàng, số có chữ cái theo sau khác nhau thì có sự khác biệt thống kê qua phép kiểm định LSD, (ns): khác biệt không có ý nghĩa thống kê; (\*\*): khác biệt ở mức ý nghĩa 1% ( $P < 0,01$ ). Các giá trị trong bảng là trung bình của các lần lặp lại.)

Giống với chỉ tiêu về số lượng quả thể và tỉ lệ keo nuôi có quả thể hình thành, chiều cao quả thể nấm ĐTHT chỉ chịu tác động bởi nhiệt độ môi trường nuôi (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 tuy cần ánh sáng nhưng ở dạng ánh sáng khuếch tán, nhưng 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 ghi nhận cho thấy 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.

Trọng lượng tươi 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 ĐTHT. Kết quả thí nghiệm cho thấy, trọng lượng tươi quả thể thu được ở điều kiện nhiệt độ 25°C đạt cao nhất (6,89 g/keo) và khác biệt có ý nghĩa thống kê 5% so với trọng lượng quả thể nấm ĐTHT nuôi ở điều kiện 20°C (chỉ đạt 5,32 g/keo), trong khi hai cường độ chiếu sáng được nghiên cứu không ảnh hưởng đến trọng lượng quả thể của

Bảng 4. Ảnh hưởng của nhiệt độ và cường độ chiếu sáng lên trọng lượng tươi quả thể nấm ĐTHT/keo nuôi

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

(Ghi chú: Trong cùng một hàng, số có chữ cái theo sau khác nhau thì có sự khác biệt thống kê qua phép kiểm định LSD., (ns): khác biệt không có ý nghĩa thống kê; (\*): khác biệt ở mức ý nghĩa 5% ( $P < 0,05$ ). Các giá trị trong bảng là trung bình của các lần lặp lại.)

dòng nấm này. Trong đó, nghiệm thức với điều kiện 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 4).

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 [5], [8], [9]. Kết quả nghiên cứu sự hình thành và phát triển quả thể nấm *C. cardinalis* cũng cho thấy 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 [10]. Từ các kết quả thí nghiệm được phân tích bên trên, 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 (*C. militaris*) được nghiên cứu. Vì vậy, điều kiện này được chọn để nuôi dòng nấm *C. militaris* trong các thí nghiệm tiếp theo.

### B. Ảnh hưởng của lượng nhộng tằm xay bổ sung đến sự hình thành và phát triển quả thể nấm đông trùng hạ thảo

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. Sau 60 ngày chủng giống, tỉ lệ keo nuôi có nấm hình thành quả thể ở các nghiệm thức 1, 2, 3, 4, 5 lần lượt là: 50%; 100%; 90% và 80% (nghiệm thức 4 và 5).

Kết quả thí nghiệm trình bày ở Bảng 5 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 20 g 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 tươi quả thể/hộp nuôi đều thấp hơn so với các môi trường nuôi được bổ sung nhộng tằm. Điều này cho thấy rằng môi trường chỉ gồm gạo lức sẽ hạn chế sự phát triển quả thể nấm ĐTHT.

Trọng lượng tươi 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 (9,91 g/hộp nuôi) và nghiệm thức 4 (8,88 g/hộp nuôi). 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 số lượng quả thể nhiều nhưng chiều cao lại cao hơn và đường kính nhỏ hơn nên trọng lượng quả thể nấm *C. militaris* được nuôi trên môi trường

Bảng 5. Ảnh hưởng của lượng nhộng tằm xay bổ sung đến sự hình thành và phát triển của quả thể nấm ĐTHT

Nghiệm thức	Chỉ tiêu sinh trưởng			
	Số lượng quả thể/hộp	Trọng lượng tươi quả thể/hộp (g)	Chiều cao trung bình quả thể/hộp (mm)	Đường kính trung bình quả thể/hộp (mm)
NT1 (0g)	30,60 <sup>ab</sup>	2,24 <sup>b</sup>	21,63 <sup>d</sup>	0,92 <sup>d</sup>
NT2 (5g)	34,40 <sup>a</sup>	9,91 <sup>a</sup>	53,82 <sup>a</sup>	1,47 <sup>c</sup>
NT3 (10g)	28,11 <sup>abc</sup>	10,14 <sup>a</sup>	42,79 <sup>b</sup>	2,06 <sup>b</sup>
NT4 (15g)	25,13 <sup>bc</sup>	8,88 <sup>a</sup>	34,69 <sup>bc</sup>	2,27 <sup>a</sup>
NT4 (15g)	19,63 <sup>c</sup>	8,65 <sup>a</sup>	32,69 <sup>cd</sup>	2,06 <sup>b</sup>
F	**	**	**	**
CV (%)	23,21	37,43	19,09	8,38

(Ghi chú: Trong cùng một cột, 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% ( $P < 0,01$ ). Các giá trị trong bảng là trung bình của các lần lặp lại.)

nghiệm thức 2 nhỏ hơn so với nghiệm thức 3.

Nhìn chung, với lượng nhộng tằm bổ sung cao hơn 10 g/hộp nuôi quả thể nấm *C. militaris* vẫn hình thành nhưng có đặc điểm là số lượng quả thể ít, quả thể to nhưng ngắn, trọng lượng quả thể trung bình đạt được trên đơn vị 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 *C. 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, nghiệm thức 2 (5 g nhộng tằm xay/hộp) được chọn để sản xuất thử nghiệm nấm *C. militaris* trên môi trường gạo lức bổ sung nhộng tằm xay vì ở nghiệm thức này tuy có trọng lượng quả thể thấp hơn nghiệm thức 3 nhưng có đến 100% keo nuôi có nấm *C. militaris* hình thành quả thể.

Quả thể nấm *C. militaris* ở nghiệm thức 2 được phơi khô và 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 cho thấy hàm lượng Cordycepin

và Adenosine đạt lần lượt là 10,08 mg/g và 0,57 mg/l.

So sánh với các kết quả phân tích được công bố bởi các công ty như Công ty Cổ phần Dược thảo Thiên Phúc (Cordycepin và Adenosine lần lượt là 6,29 và 0,26 mg/g; gửi mẫu phân tích ngày 30/1/2015) hoặc Công ty Nấm Ta (Cordycepin và Adenosine lần lượt là 3,43 và 0,31 mg/g; gửi mẫu phân tích ngày 19/4/2014) cho thấy hàm lượng Cordycepin và Adenosin trong quả thể nấm *C. militaris* mà chúng tôi phân tích có cao hơn so với các các phân tích được công bố. Tuy nhiên, hàm lượng hai chất này phụ thuộc nhiều vào chủng nấm *C. militaris*, thể hệ giống và điều kiện nuôi. Vì vậy, cần đưa công thức này vào sản xuất thử nghiệm để có kết luận chính xác hơn.

#### C. Nghiên cứu nuôi tạo quả thể nấm đông trùng hạ thảo (*Cordyceps militaris*) trên kí chủ nhộng tằm

Nhộng tằm được nuôi từ giai đoạn trứng và tuổi nhộng được tính từ lúc tằm bắt đầu nhả tơ. Lượng dịch nuôi tiêm vào mỗi nhộng tằm là 75  $\mu$ l. Kết quả cho thấy sau 3-5 ngày tiêm nhộng tằm nhiễm nấm *C. militaris* (tơ nấm màu trắng mọc ra từ nhộng tằm) với tỉ lệ nhiễm dao động từ 43,33 đến 66,67%. Nhộng tằm trở nên cứng sau 7-9 ngày tiêm và hình thành quả thể sau từ 21-30 ngày sau khi được đưa vào điều kiện kích thích sự hình thành quả thể.

Bảng 6. Ảnh hưởng của vị trí tiêm và tuổi nhộng tằm lên số lượng quả thể nấm *Cordyceps militaris* hình thành

Vị trí tiêm (B)	Tuổi nhộng (ngày) (A)				Trung bình (quả thể/nhộng)
	9	10	11	12	
Phần ngực	12,29	1,45	1,55	1,47	1,53
Phần bụng	1,70	1,47	1,57	1,38	1,53
<b>Trung bình (quả thể/nhộng)</b>	1,69 <sup>a</sup>	1,46 <sup>b</sup>	1,56 <sup>ab</sup>	1,43 <sup>b</sup>	
F (A)			*		
F (A)			ns		
F (A × 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% ( $P < 0,05$ ). Các giá trị trong bảng là trung bình của các lần lặp lại.)

Không có sự tương tác giữa tuổi nhộng tằm và vị trí tiêm lên số lượng quả thể nấm *C. militaris* được hình thành (Bảng 6). Tuy nhiên, nhìn chung số lượng quả thể hình thành trên mỗi nhộng tằm ở các nghiệm thức tương đối thấp dao động từ 1,38 - 1,7 quả thể/nhộng tằm. Vị trí tiêm không ảnh hưởng đến số lượng quả thể nấm *C. militaris* hình thành mà giá trị này chịu tác động bởi tuổi nhộng tằm. Nhộng tằm giai đoạn 9 ngày tuổi có số lượng quả thể hình thành/nhộng tằm đạt cao nhất với trung bình 1,69 quả thể/nhộng tằm trong khi ở giai đoạn 12 ngày tuổi giá trị này đạt thấp nhất (1,43 quả thể/nhộng tằm).

Kết quả thí nghiệm trình bày ở Bảng 7 cho thấy độ tuổi nhộng tằm khi tiêm dịch có ảnh hưởng đến chiều cao quả thể nấm *C. militaris*. Chiều cao quả thể nấm *C. militaris* dao động trong khoảng từ 26,72 mm đến 31,67 mm và tỉ lệ nghịch với tuổi nhộng tằm thí nghiệm. Nhộng tằm 9 ngày tuổi, quả thể nấm *C. militaris* đạt chiều cao 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 thấp nhất (27,38 mm) khi nhộng tằm ở 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.

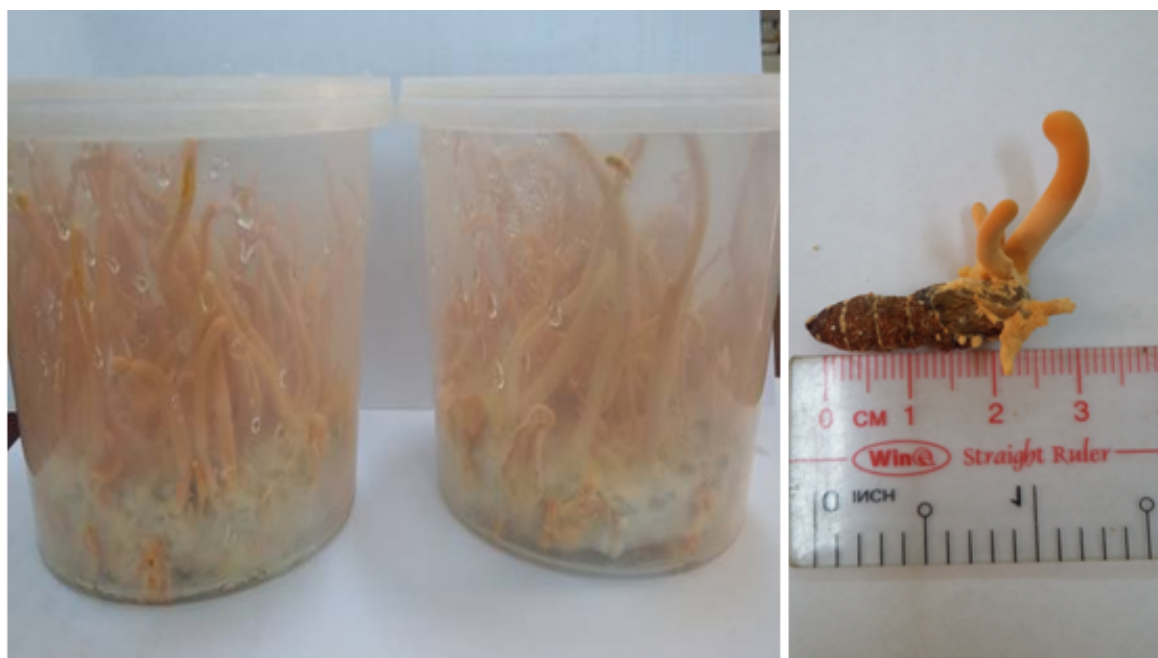
Kết quả nghiên cứu nuôi tạo quả thể trên nhộng tằm được thực hiện và báo cáo bởi Hong et al. [10] cũng cho thấy rằng sau thời gian 2-3 ngày tiêm dịch nuôi nấm *C. militaris* nhộng tằm sẽ bị nhiễm và cơ thể nhộng trở nên cứng sau thời gian khoảng 7 ngày sau khi tiêm, 1 - 3 quả thể hình thành/nhộng với chiều cao từ 34 - 70 mm. Mặc dù kết quả nghiên cứu được thực hiện thấp hơn so với nghiên cứu của Hong et al. [10] nhưng đây có thể do ảnh hưởng bởi chủng nhộng tằm và chế độ cho ăn nên sẽ ảnh hưởng đến thành phần dinh dưỡng trong nhộng dẫn đến ảnh hưởng lên sự hình thành và phát triển quả thể. Tuy nhiên, kết quả đạt được cho thấy sự thành công của nghiên cứu vì hiện nay hầu hết các nghiên cứu trong và ngoài nước chủ yếu thực hiện thành công trên giá thể gạo lúc còn trên kí chủ nhộng tằm vẫn đang được nghiên cứu.

Các kết quả thí nghiệm nghiên cứu nuôi tạo quả thể nấm *C. militaris* trên kí chủ nhộng tằm được thu thập, phân tích và trình bày bên trên cho thấy rằng nhộng tằm có tuổi đời nhỏ (9 ngày tuổi) là phù hợp nhất vì ở tuổi này sau khi gây nhiễm nấm ĐTHT số lượng quả thể, chiều cao quả thể thu được cao 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 hàm lượng dinh dưỡng bên trong nhộng tằm mà đặc biệt là hàm lượng protein giảm khi nhộng tằm chuẩn bị hóa bướm nên thiếu dinh

Bảng 7. Ảnh hưởng của vị trí tiêm và tuổi nhộng tằm lên chiều cao quả thể nấm *Cordyceps militaris*

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

(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% ( $P < 0,01$ ). Các giá trị trong bảng là trung bình của các lần lặp lại.)



Hình 2: Quả thể nấm *C. militaris* trên môi trường gạo lúc bổ sung nhộng tằm xay (bên trái) và trên kí chủ nhộng tằm (bên phải)

dưỡng cho sự phát triển quả thể. Vì vậy, nhộng tằm 9 ngày tuổi được chọn để nghiên cứu sản xuất nấm ĐTHT trên kí chủ nhộng tằm.

#### IV. KẾT LUẬN

Điều kiện nuôi với nhiệt độ 25°C và cường độ chiếu sáng 500 lux phù hợp cho sự sinh trưởng và phát triển quả thể của dòng nấm *C. militaris* được nghiên cứu.

Lượng nhộng tằm xay bổ sung phù hợp cho việc nuôi tạo quả thể nấm *C. militaris* trên môi trường gạo lúc là 5 g với lượng gạo lúc là 50 g/hộp nuôi.

Nhộng tằm ở độ tuổi 9 ngày sau khi nở tơ phù hợp để gây nhiễm và nuôi tạo quả thể nấm *C. militaris* trên kí chủ nhộng tằm.



## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Liu J B. Forestry history of Ganzi Tibetan Autonomous Prefecture (Chin.). *Chengdu: Sichuan Kexue Jisu Chubanshe*. 1994;p. 1–323.
- [2] Sung J M. *The insects-born fungus of Korea in color*. Seoul: Kyohak Publishing Co. Ltd; 1996.
- [3] Li S P, Yang F Q, Tsim K W K. Quality control of *Cordyceps sinensis*, a valued traditional Chinese medicine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2006;41:1571–84.
- [4] Zhang Y J, Li E, Wang C S. *Ophiocordyceps sinensis*, the flagship fungus of China: terminology, life strategy and ecology. *Mycology*. 2012;3:2–10.
- [5] Sung J M, Choi Y S, Lee H K, Kim S H, Kim Y O, Sung G H. Production of fruiting body using cultures of entomopathogenic fungal species. *Kor J Mycol*. 1999;27:15–9.
- [6] Hong I P, Kang P D, Kim K Y, Nam S H, Lee M Y, Choi Y S, et al. Fruit body formation on silkworm by *Cordyceps militaris*. *Mycobiology*. 2010;38(2):128–132.
- [7] Lê Văn Vẽ, Trần Thu Hà, Nguyễn Thị Bích Thủy, Ngô Xuân Nghiễn. 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*. 2015;13(3):445–454.
- [8] Gao X H, Wu W, Qian G C. Study on influences of abiotic factors on fruitbody differentiation of *Cordyceps militaris*. *Acta Agriculture Shanghai*. 2000;16:93–98.
- [9] Sato H, Shimazu M. Stromata production for *Cordyceps militaris* (Clavicipitales: Clavicipitaceae) by injection of hyphal bodies to alternative host insects. *Applied Entomology and Zoology*. 2002;37:85–92.
- [10] Kim S Y, Shrestha B, Sung G H, Han S K, Sung J M. Optimum conditions for artificial fruiting body formation of *Cordyceps cardinalis*. *Mycobiology*. 2010;38(2):133–136.