

Xác định môi trường và kỹ thuật phân lập giống gốc nấm Đông trùng hạ thảo (*Cordyceps militaris*) thu thập tại Vườn quốc gia Hoàng Liên Sơn (Lào Cai)

Nguyễn Thị Hồng¹, Lê Minh Sát^{1*}, Nguyễn Thị Hồng Gấm²

¹Công ty Cổ phần dược thảo Thiên Phúc

²Trường Đại học Lâm nghiệp

Ngày nhận bài 29/10/2018; ngày chuyển phản biện 2/11/2018; ngày nhận phản biện 6/12/2018; ngày chấp nhận đăng 14/12/2018

Tóm tắt:

Trong bài báo này, các tác giả đã nghiên cứu kỹ thuật phân lập giống gốc và nhân giống nấm Đông trùng hạ thảo (*Cordyceps militaris*) trong môi trường nhân tạo. Từ quả thể nấm Đông trùng hạ thảo thu nhận tại Vườn quốc gia Hoàng Liên Sơn, đã phân lập được 24 chủng giống gốc và tiến hành nhân giống cấp 1 và 2 các chủng giống trong môi trường nhân tạo. Kết quả cho thấy, công thức khử trùng quả thể nấm cho tỷ lệ mẫu sạch cao nhất (92,86%) là dùng cồn 70% trong 1 phút và cefotaxim 0,4 mg/ml trong 1 phút. Môi trường nhân giống cấp 1 hiệu quả là: agar 10 g/l + dịch chiết khoai tây (1 g khoai tây/1 ml dịch chiết) 200 ml/l + đường sucrose 20 g/l + KH₂PO₄ 0,5 g/l + K₂HPO₄ 0,5 g/l + KNO₃ 1 g/l + Pepton 5 g/l + cao nấm men 5 g/l. Môi trường gồm đường glucose 10 g/l + nhộng tằm 100 g/l + KH₂PO₄ 0,5 g/l + K₂HPO₄ 0,5 g/l + KNO₃ 1 g/l + CaCl₂.2H₂O 0,1 g/l + Pepton 5 g/l + cao nấm men 10 g/l + vitamin B₁ 0,2 g/l + vitamin B₈ 0,2 g/l phù hợp để nhân giống cấp 2 nấm Đông trùng hạ thảo. Kết quả là cơ sở khoa học quan trọng, tạo tiền đề cho sản xuất giống nấm Đông trùng hạ thảo phục vụ nhu cầu về giống nấm chất lượng cao ngày một lớn hiện nay.

Từ khóa: *Cordyceps militaris*, nấm Đông trùng hạ thảo, nhân giống, phân lập giống gốc.

Chỉ số phân loại: 4.1

Đặt vấn đề

Cordyceps militaris là loài nấm thuộc họ Cordycipitaceae, giống *Cordyceps*. Loài này được Carl Linnaeus mô tả vào năm 1753 với tên gọi *Clavaria militaris* [1]. *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 nhân 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 mẽ chiếm toàn bộ cơ thể và gây chết ký chủ. Đến mùa hè quả thể nhô ra ngoài để phát tán bào tử vào không khí [1].

Các hợp chất dược liệu của nấm *C. militaris* đã được ứng dụng trong điều trị bệnh và nâng cao sức khỏe con người. Hợp chất cordycepin (3'-deoxyadenosine) từ nấm cho thấy có hoạt tính kháng vi sinh vật, ung thư, ngừa di căn, điều hòa miễn dịch [2]. Hợp chất CM-hs-CPS2 có tính kháng DPPH,

hoạt tính khử và tạo phức ở nồng độ (8 mg/ml) là 89% [3]. Acidic polysaccharide (APS) có khả năng ứng dụng trong điều trị cúm A và góp phần điều hòa hoạt động miễn dịch của các đại thực bào [4]. Protein (CMP) có kích thước 12 kDa, pI 5,1 và có hoạt tính trong khoảng pH 7-9, ức chế nấm *Fusarium oxysporum* và gây độc đối với tế bào ung thư bàng quang [5]. Hợp chất cordycepin có khả năng kháng vi khuẩn *Clostridium*. Các hợp chất dẫn xuất từ nấm được ứng dụng trong điều trị các bệnh nhiễm khuẩn đường ruột [6]. Cordycepin ngăn sự biểu hiện của gen T2D chịu trách nhiệm điều hòa bệnh tiểu đường thông qua việc ức chế các đáp ứng phản ứng viêm phụ thuộc NF-κB, hy vọng sẽ ứng dụng được như một chất điều hòa miễn dịch dùng trong điều trị các bệnh về miễn dịch [7]. Enzyme tiêu sợi huyết tách chiết từ nấm *C. militaris* có hoạt tính gắn fibrin, xúc tiến việc phân hủy fibrin. Enzyme này có khả năng sử dụng trong điều trị tan huyết khối tương tự như các enzym fibrinolytic mạnh khác như nattokinase và enzyme chiết từ giun đất. Khi enzyme này có thể sản xuất ở quy mô lớn sẽ là một giải pháp thay thế hữu hiệu cho các enzym fibrinolytic giá thành cao hiện đang được sử dụng cho bệnh tim lão hóa

*Tác giả liên hệ: Email: lmsat@most.gov.vn

Determination of the environment and techniques of isolating the *Cordyceps militaris* collected in Hoang Lien Son National Park (Lao Cai)

Thi Hong Nguyen¹, Minh Sat Le^{1*},
Thi Hong Gam Nguyen²

¹Thien Phuc Medicinal Herbs Joint Stock Company

²Vietnam National University of Forestry

Received: 29 October 2018; accepted 14 December 2018

Abstract:

We have researched techniques for isolation and propagation of *Cordyceps militaris* in artificial culture media. From the fruit bodies of the fungus collected in the Hoang Lien National Park, 24 strains were isolated and rapidly multiplied in the artificial culture medium. The results showed that the highest percentage of fungal isolates (92.86%) was gained using 70% alcohol for 1 minute and cefotaxime 0.4 mg/ml for 1 minute. The effective medium for level 1 propagation included: Agar 10 g/l + Potato extracts (1 g potatoes/1 ml extract) 200 ml/l + sucrose 20 g/l + KH_2PO_4 0.5 g/l + K_2HPO_4 0.5 g/l + KNO_3 1 g/l + Pepton 5 g/l + Yeast 5 g/l. And the culture medium which included: Glucose 10 g/l + silkworm 100 g/l + KH_2PO_4 0.5 g/l + K_2HPO_4 0.5 g/l + KNO_3 1 g/l + $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/l + Pepton 5 g/l + Yeast extract 10 g/l + Vitamin B₁ 0.2 g/l + Vitamin B₈ 0.2 g/l was suitable for level 2 propagation of *C. militaris*. This finding is an important scientific evidence to create a premise for the production of *C. militaris* seedlings to serve the demand of high quality mushroom.

Keywords: *Cordyceps militaris*, isolation, mushroom, propagation.

Classification number: 4.1

ở người [8]. Dịch chiết từ quả thể nấm *C. militaris* (CMWE) được thử nghiệm về tác dụng kiểm soát lipopolysaccharide (LPS) (chịu trách nhiệm kích thích việc sản xuất nitric oxide), việc phóng thích yếu tố hoại tử khối u α (TNF- α) và interleukin-6 (IL-6) của tế bào RAW 264,7. Các đại thực bào được xử lý với nồng độ CMWE khác nhau làm giảm đáng kể LPS, TNF- α , IL-6 và mức độ giảm theo nồng độ của dịch chiết. Những kết quả này cho thấy, CMWE có tác dụng ức chế mạnh đến việc sản xuất các chất trung gian gây viêm của tế bào [9]. Các polysaccharide CPS-1 và CPS-2 được tách chiết từ nấm *C. militaris* có thành phần từ các đơn phân là các đường monosaccharide, mannose và galactose. Hai polysaccharide này có khả năng phục hồi các tổn thương gan do ethanol và tác dụng này tăng lên khi tăng liều dùng chiết xuất [10]. *C. militaris* đã được trồng ở quy mô lớn do nó có được tính rất tốt và có thời gian sản xuất ngắn. Tuy nhiên, các nghiên cứu về phân lập giống gốc và nhân giống nấm Đông trùng hạ thảo ở Việt Nam còn nhiều hạn chế so với các nước trên thế giới. Mục đích của nghiên cứu nhằm xác định được công thức khử trùng trong phân lập giống gốc nấm, môi trường nhân giống cấp 1 và nhân giống cấp 2 hiệu quả, có thể áp dụng vào sản xuất đại trà tại Việt Nam.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

Quả thể nấm Đông trùng hạ thảo (*C. militaris*) thu nhận tại Vườn quốc gia Hoàng Liên Sơn (Lào Cai) ở các vị trí và cơ chất khác nhau, được ký hiệu thành 26 dòng riêng biệt. Hình 1 là một số vật liệu nghiên cứu được thu thập tại Vườn quốc gia Hoàng Liên Sơn.



Hình 1. Quả thể nấm Đông trùng hạ thảo (*C. militaris*) dùng để phân lập giống gốc.

Khoai tây, đường sucrose, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , KNO_3 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; Pepton, cao nấm men (Yeast extract), vitamin B_1 , vitamin B_8 , cồn tuyệt đối, cefotaxime.

Phương pháp nghiên cứu

Chuẩn bị môi trường phân lập giống gốc, nhân giống cấp 1: khoai tây gọt vỏ, rửa sạch, thái mỏng, cho vào nồi (định lượng 200 g khoai tây/1 lít môi trường). Cho nước vào nồi, đun khoai tây cho đến khi sôi; giảm lửa, đun tiếp cho đến khi khoai chín nhừ; tắt bếp, đổ chất lấy nước dịch chiết khoai tây. Cho đường sucrose và các chất (KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , KNO_3 , Pepton, cao nấm men, vitamin B_1 , vitamin B_8) vào dịch chiết khoai và khuấy cho đường và các chất tan hoàn toàn. Dẫn nước cất vào trong cốc đong chứa hỗn hợp môi trường dinh dưỡng đến vạch 1.000 ml. Môi trường được chuẩn pH đến 7,0 bằng dung dịch NaOH 1N hoặc HCl 1N. Cho hỗn hợp môi trường dinh dưỡng vào nồi, đun đến nhiệt độ 60°C (có bọt lăn tăn dưới đáy nồi) thì cho từ từ agar vào nồi, cho đến đâu thì khuấy cho agar tan đến đáy. Tiếp tục đun cho đến khi nồi dịch môi trường tan hoàn toàn, tạo thành dịch đồng nhất. Rót môi trường vào trong bình 500 ml, đậy nắp bình và cho vào nồi hấp thanh trùng 118°C trong 20 phút. Khử trùng xong, để bình môi trường nguội đến 40°C rồi rót môi trường vào đĩa petri (15 ml/đĩa), để môi trường đông đặc, đậy nắp đĩa petri. Bảo quản đĩa môi trường ở nhiệt độ phòng ($\leq 25^\circ\text{C}$), sử dụng trong vòng 7 ngày.

Chuẩn bị môi trường nhân giống cấp 2: cân chính xác các loại hóa chất cần thiết (đường glucose, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , KNO_3 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Pepton, cao nấm men, vitamin B_1 , vitamin B_8) rồi cho từng chất vào cốc chứa nước sạch; khuấy cho tan hoàn toàn. Dẫn nước cất vào trong cốc đong chứa hỗn hợp môi trường dinh dưỡng đến vạch 1.000 ml. Môi trường được chuẩn pH đến 7,0 bằng dung dịch NaOH 1N hoặc HCl 1N. Rót môi trường vào trong bình trụ (200 ml/bình), đậy nắp bình và cho vào nồi hấp thanh trùng 118°C trong 20 phút. Khử trùng xong, để bình môi trường nguội đến nhiệt độ phòng ($\leq 25^\circ\text{C}$), sử dụng trong vòng 7 ngày.

Phân lập giống gốc nấm: quả thể nấm Đông trùng hạ thảo được mang về phòng thí nghiệm dùng bông thấm nước cất đã khử trùng để rửa đất, bụi bẩn bám bên ngoài. Sau đó, ngâm quả thể nấm trong ống đựng cồn 70% trong vòng 30 giây đến 1 phút. Loại bỏ cồn, rửa mẫu bằng nước cất vô trùng 2 lần. Tiếp theo, ngâm quả thể nấm trong ống đựng dung dịch cefotaxim (4 mg/ml) từ 30 giây đến 2 phút. Loại bỏ dung dịch cefotaxim, rửa mẫu bằng nước cất vô trùng 2 lần. Thấm khô mẫu bằng giấy thấm vô trùng. Dùng dao vô trùng cắt mẫu thành những phần 2×2 mm, rồi dùng panh vô trùng kẹp lấy mẫu cấy đặt trên bề mặt đĩa môi trường phân lập mẫu (2-3 mảnh mẫu/đĩa petri). Dán kín

mép đĩa petri, đặt nuôi đĩa mẫu ở điều kiện nhiệt độ $\leq 25^\circ\text{C}$ và không có ánh sáng.

Kỹ thuật nhân giống cấp 1: dùng dao cấy vô trùng cắt 1 mảnh thạch mang hệ sợi giống gốc nấm (5×5 mm) trên bề mặt đĩa; dùng panh kẹp vô trùng để lấy mảnh thạch mang hệ sợi giống gốc nấm cấy đặt lên đĩa môi trường nhân giống cấp 1 (1 mảnh thạch mang hệ sợi giống gốc/đĩa petri). Dán kín mép đĩa petri, đặt nuôi đĩa mẫu ở nhiệt độ $\leq 25^\circ\text{C}$ và không có ánh sáng.

Kỹ thuật nhân giống cấp 2: dùng dao cấy vô trùng cắt 1 mảnh thạch mang hệ sợi giống cấp 1 (1×1 cm); dùng panh kẹp vô trùng để lấy mảnh thạch mang hệ sợi giống cấp 1 thả vào bình môi trường nhân giống cấp 2. Đóng chặt nắp bình và để lên trên khay kẹp bình mẫu của máy lắc nuôi mẫu. Nuôi mẫu ở điều kiện nhiệt độ $\leq 25^\circ\text{C}$, cường độ ánh sáng yếu (< 500 lux), độ ẩm 62-65%, vận tốc máy lắc mẫu 180-200 vòng/phút cho hệ sợi nấm ăn lan trong bình môi trường nhân giống cấp 2.

Kỹ thuật bảo quản giống gốc nấm: dùng dao cấy cắt 1 mảnh thạch mang hệ sợi giống gốc nấm (2×2 mm) trên bề mặt đĩa; dùng panh kẹp để lấy phần hệ sợi giống gốc nấm phía trên mặt thạch cho vào trong ống eppendorf chứa môi trường dinh dưỡng; dùng pipet hút 500 μl glycerol 10% cho lên phía trên ống eppendorf đã cấy giống; đóng chặt nắp ống eppendorf. Cho các ống giống nấm vào phích, đổ nito lỏng vào phích sao cho lượng nito lỏng làm ngập các ống giống nấm, nắp phích lại và chờ cho đến khi lượng nito lỏng trong phích bay hơi hết; dùng kẹp gấp các ống giống gốc nấm xếp vào hộp bảo quản ống eppendorf; xếp hộp bảo quản ống eppendorf có chứa các ống giống gốc nấm đã xử lý với nito lỏng vào trong tủ lạnh sâu ($-20 \div -80^\circ\text{C}$) để bảo quản.

Xử lý số liệu: dùng phần mềm Microsoft Excell (2007).

Kết quả và thảo luận

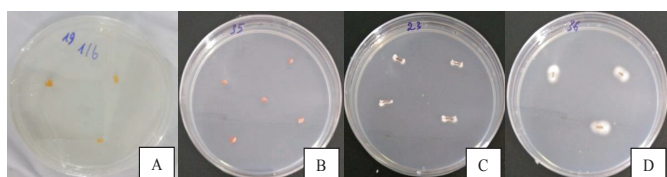
Kết quả phân lập giống gốc nấm Đông trùng hạ thảo

Từ 26 chủng quả thể (260 mẫu), thực hiện 4 công thức khử trùng khác nhau, kết quả chúng tôi thu được 24 chủng (216 mẫu) giống gốc nấm Đông trùng hạ thảo. Trong đó, công thức khử trùng KT3 với cồn 70% trong 60 giây và cefotaxim (4 mg/ml) trong 1 phút cho hiệu quả tạo giống gốc cao nhất (92,86%), cụ thể: tỷ lệ mẫu sạch đạt 92,86% và 100% mẫu sạch bung sợi nấm sau 24-36 giờ phân lập. Kết quả cho thấy, thời gian khử trùng quả thể bằng cồn 70% từ 30 lên 60 giây cho hiệu quả khử trùng tăng lên, chứng tỏ thời gian khử trùng có ảnh hưởng đến hiệu quả tạo giống gốc nấm Đông trùng hạ thảo. Các công thức khử trùng đều cho thời gian mẫu bắt đầu bung sợi nấm từ 24-36h sau khi phân lập giống (bảng 1, hình 2 và 3).

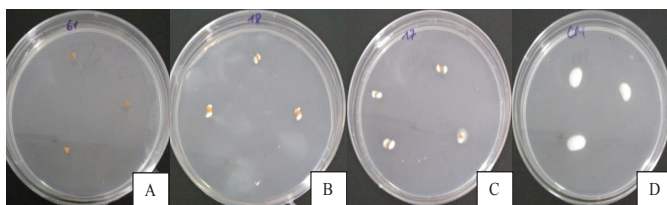
Bảng 1. Hiệu quả tạo giống gốc nấm Đông trùng hạ thảo.

CTTN	Thời gian khử trùng		Tỷ lệ mẫu sạch (%)	Tỷ lệ mẫu sạch bung sợi (%)	Hiệu quả tạo giống gốc (%)	Thời gian mẫu bắt đầu bung sợi (h)
	Cồn 70% (giờ)	Cefotaxim (4 mg/ml) (phút)				
KT1	30	1	70,00±0,15 ^a	100,00±0,00 ^b	70,00±0,12 ^c	24±36
KT2	30	2	73,33±0,08 ^a	100,00±0,00 ^b	73,33±0,06 ^c	24±36
KT3	60	1	92,86±0,10 ^a	100,00±0,00 ^b	92,86±0,10 ^c	24±36
KT4	60	2	92,86±0,19 ^a	92,31±0,08 ^b	85,71±0,14 ^c	24±36

Ghi chú: a, b, c chỉ sự khác nhau có ý nghĩa về mặt thống kê p<0,05.



Hình 2. Mẫu sạch và mẫu bung sợi nấm Đông trùng hạ thảo sau phân lập bằng công thức khử trùng KT2. A: mẫu ban đầu; B: mẫu sau 24h; C: mẫu sau 48h và D: mẫu sau 72h nuôi cấy.



Hình 3. Mẫu sạch và mẫu bung sợi nấm Đông trùng hạ thảo sau phân lập bằng công thức khử trùng KT3. A: mẫu ban đầu; B: mẫu sau 24h; C: Mẫu sau 48h; D: mẫu sau 72h nuôi cấy.

Kết quả nhân giống cấp 1 nấm Đông trùng hạ thảo

Giống gốc nấm, sau 7 ngày nuôi, đủ tiêu chuẩn để cấy chuyển sang môi trường nhân giống cấp 1. Chúng tôi bố trí 6 công thức nghiên cứu ảnh hưởng của KNO₃ và pepton đến khả năng nhân giống cấp 1 nấm Đông trùng hạ thảo. 6 công thức này đều có chung các chất: agar 10 g/l + dịch chiết khoai tây (1 g khoai tây/1 ml dịch chiết) 200 ml/l + đường sucrose 20 g/l + KH₂PO₄ 0,5 g/l + K₂HPO₄ 0,5 g/l + cao nấm men 5 g/l. Sử dụng dòng giống gốc có ký hiệu CM làm vật liệu cho nghiên cứu này. Kết quả ở bảng 2 và hình 4 cho thấy, nồng độ chất dinh dưỡng khác nhau có ảnh hưởng rất rõ đến khả năng ăn lan hệ sợi giống cấp 1 trên môi trường nhân giống. Công thức môi trường G4 cho hệ sợi giống cấp 1 ăn lan nhanh nhất, hệ sợi khỏe, ăn lan đồng đều khắp bề

mặt đĩa môi trường nhân giống. Độ vượt hệ sợi của công thức này sau 3 ngày là 1,2 cm; sau 5 ngày là 2,1 cm; sau 7 ngày là 2,2 cm và sau 9 ngày là 1,8 cm. Kết quả cũng cho thấy, tốc độ ăn lan hệ sợi nhanh nhất là sau 5-7 ngày cấy giống vào môi trường nhân giống cấp 1.

Bảng 2. Hiệu quả nhân giống cấp 1 nấm Đông trùng hạ thảo.

CTTN	KNO ₃ (g/l)	Pepton (g/l)	Đường kính vòng khuẩn lạc sau các ngày nuôi cấy (cm)					Đặc điểm hệ sợi nấm
			0 ngày	3 ngày	5 ngày	7 ngày	9 ngày	
G1	0,5	3,0	0,5	1,0±0,05 ^a	2,2±0,07 ^b	4,0±0,09 ^c	5,5±0,08 ^d	Hệ sợi mảnh, ăn lan chậm, sợi bông xù
G2	0,5	5,0	0,5	1,2±0,07 ^a	2,5±0,08 ^b	4,5±0,08 ^c	6,0±0,06 ^d	Hệ sợi mảnh, ăn lan chậm, sợi bông xù
G3	1,0	3,0	0,5	1,5±0,08 ^a	3,3±0,10 ^b	5,8±0,09 ^c	7,6±0,05 ^d	Hệ sợi khỏe, ăn lan đồng đều
G4	1,0	5,0	0,5	1,7±0,04 ^a	3,8±0,05 ^b	6,0±0,07 ^c	7,8±0,04 ^d	Hệ sợi khỏe, ăn lan đồng đều
G5	1,5	3,0	0,5	1,4±0,06 ^a	2,6±0,08 ^b	4,4±0,08 ^c	6,1±0,05 ^d	Hệ sợi khỏe, ăn lan đồng đều
G6	1,5	5,0	0,5	1,3±0,05 ^a	2,6±0,10 ^b	4,2±0,09 ^c	5,7±0,07 ^d	Hệ sợi khỏe, ăn lan đồng đều



Hình 4. Giống nấm cấp 1 Đông trùng hạ thảo trong các môi trường nhân giống. A: môi trường G2; B: môi trường G4.

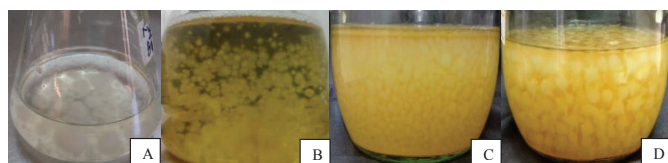
Kết quả nhân giống cấp 2 nấm Đông trùng hạ thảo

Nghiên cứu thực hiện với 6 công thức thí nghiệm, thay đổi hàm lượng đường glucose và cao nấm men bổ sung vào môi trường nhân giống cấp 2 nấm Đông trùng hạ thảo. Các công thức môi trường đều có chung hàm lượng các chất dinh dưỡng khác: nhộng tằm 100 g/l + KH₂PO₄ 0,5 g/l + K₂HPO₄ 0,5 g/l + KNO₃ 1 g/l + CaCl₂.2H₂O 0,1 g/l + Pepton 5 g/l + vitamin B₁ 0,2 g/l + vitamin B₈ 0,2 g/l. Kết quả ở bảng 3 cho thấy, khi tăng hàm lượng đường glucose từ 5 đến 10 g/l và tăng hàm lượng cao nấm men từ 5 đến 10 g/l cho hiệu quả nhân giống nấm cấp 2 thay đổi rõ rệt.

Công thức NG4 phù hợp nhất để nhân giống cấp 2. Môi trường này cho mật độ pellet cao nhất (82 pellet/10 ml môi trường), dịch giống sánh, pellet có tua gai, ít phân nhánh (hình 5).

Bảng 3. Hiệu quả nhân giống cấp 2 nấm Đông trùng hạ thảo.

CTTN	Đường glucose (g/l)	Cao nấm men (g/l)	Mật độ pellet (số pellet/10 ml môi trường)	Đường kính pellet (mm)	Đặc điểm dịch giống
NG1	5	5	57±0,96 ^a	3,47±0,05 ^b	Dịch giống lỏng, pellet không có hình dạng nhất định
NG2	5	10	61±1,14 ^a	5,74±0,04 ^b	Dịch giống sánh, pellet không có hình dạng nhất định
NG3	10	5	58±1,22 ^a	3,69±0,08 ^b	Dịch giống sánh, pellet hình thành nhánh, có nhiều tua gai
NG4	10	10	82±1,18 ^a	1,92±0,02 ^b	Dịch giống sánh, pellet có tua gai, ít phân nhánh.
NG5	15	5	72±0,92 ^a	2,84±0,05 ^b	Dịch giống sánh, pellet không có hình dạng nhất định
NG6	15	10	66±1,24 ^a	5,3±0,16 ^b	Dịch giống sánh, pellet hình thành nhánh, có nhiều tua gai



Hình 5. Giống nấm cấp 2 Đông trùng hạ thảo trong các môi trường nhân giống khác nhau. A: môi trường NG1; B: môi trường NG2; C: môi trường NG4; D: môi trường NG6.

Kết luận

Đã phân lập thành công 24 chủng (216 mẫu) giống gốc nấm Đông trùng hạ thảo từ quả thể nấm mọc tự nhiên thu nhận tại Vườn quốc gia Hoàng Liên Sơn. Công thức khử trùng KT3 với cồn 70% trong 60 giây và cefotaxim (4 mg/ml) trong 1 phút cho hiệu quả tạo giống gốc cao nhất (92,86%).

Môi trường nhân giống cấp 1 hiệu quả là: agar 10 g/l + dịch chiết khoai tây (1 g khoai tây/1 ml dịch chiết) 200 ml/l + đường sucrose 20 g/l + KH₂PO₄ 0,5 g/l + K₂HPO₄ 0,5 g/l + KNO₃ 1 g/l + Pepton 5 g/l + cao nấm men 5 g/l. Hệ sợi giống cấp 1 ăn lan nhanh nhất, hệ sợi khỏe, ăn lan đồng đều khắp bề mặt đĩa môi trường nhân giống.

Môi trường nhân giống cấp 2 tốt nhất là: đường glucose 10 g/l + nhộng tằm 100 g/l + KH₂PO₄ 0,5 g/l + K₂HPO₄ 0,5 g/l + KNO₃ 1 g/l + CaCl₂.2H₂O 0,1 g/l + Pepton 5 g/l + cao nấm men 10 g/l + vitamin B₁ 0,2 g/l + vitamin B₈ 0,2 g/l.

Mật độ pellet cao nhất (82 pellet/10 ml môi trường), dịch giống sánh, pellet có tua gai, ít phân nhánh.

Như vậy, kỹ thuật phân lập giống gốc và nhân giống nấm Đông trùng hạ thảo đã được xây dựng. Kỹ thuật này có khả năng áp dụng vào thực tiễn sản xuất giống nấm để cung cấp giống nấm Đông trùng hạ thảo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Y. Kobayasi (1982), “Keys to the taxa of the genera *Cordyceps* and *Torrubiella*”, *Transactions of the Mycological Society of Japan*, **23**, pp.329-364.
- [2] K.D. Shonkor, et al. (2010), “Efficient production of anticancer agent Cordycepin by repeated batch culture of *C. militaris* Mutant”, *Lecture Notes in Engineering and Computer Science*, **4**, pp.20-22.
- [3] W. Fengyao, et al. (2011), “Structural characterization and antioxidant activity of purified polysaccharide from cultured *C. Militaris*”, *African Journal of Microbiology Research*, **5(18)**, pp.2743-2751.
- [4] O. Yuko, et al. (2007), “In vivo antiinfluenza virus activity of an Immunomodulatory acidic polysaccharide isolated from *C. militaris* grown on germinated soybeans”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**, pp.10194-10199.
- [5] P. Byung Tae, et al. (2009), “Antifungal and Anticancer Activities of a Protein from the Mushroom *C. Militaris*”, *Korean Journal of Physiol Pharmacology*, **13**, pp.49-54.
- [6] A. Young Joon, et al. (2000), “Cordycepin: Selective growth inhibitor derived from liquid culture of *C. militaris* against *Clostridium* spp.”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, pp.2744-2748.
- [7] S. Seulmee, et al. (2009), “Cordycepin suppresses expression of diabetes regulating genes by inhibition of lipopolysaccharide-induced inflammation in macrophages”, *Immune Network*, **9(3)**, pp.98-105.
- [8] K. Jae-Sung, et al. (2006), “A Fibrinolytic Enzyme from the Medicinal Mushroom *C. Militaris*”, *Journal of Microbiology*, **44(6)**, pp.622-631.
- [9] J. Wol Soon, et al. (2010), “The anti-inflammatory effects of water extract from *C. militaris* in murine macrophage”, *Mycobiology*, **38(1)**, pp.46-51.
- [10] H. Yan, et al. (2008), “A study on *C. militaris* polysaccharide purification, composition and activity analysis”, *African Journal of Biotechnology*, **7(22)**, pp.4004-4009.