

**BỘ GIÁO DỤC  
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM  
KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

**HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**

---



**Bùi Ngọc Ánh**

**NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA THÀNH PHẦN MÔI TRƯỜNG  
NUÔI CẤY ĐẾN NĂNG SUẤT, CHẤT LƯỢNG VÀ KHẢ NĂNG  
THOẢI HÓA NẤM NHỌNG TRÙNG THẢO  
*CORDYCEPS MILITARIS***

**LUẬN VĂN THẠC SĨ NGÀNH SINH HỌC**

**Hà Nội - 2023**

**BỘ GIÁO DỤC  
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM  
KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

**HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**



**Bùi Ngọc Ánh**

**NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA THÀNH PHẦN MÔI TRƯỜNG  
NUÔI CÂY ĐẾN NĂNG SUẤT, CHẤT LƯỢNG VÀ KHẢ NĂNG  
THOÁI HÓA NẤM NHỘN TRÙNG THẢO  
*CORDYCEPS MILITARIS***

**Chuyên ngành : Sinh học thực nghiệm**

**Mã số: 8420114**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ : NGÀNH SINH HỌC**

**NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC**

Hướng dẫn 1: TS. Đỗ Tiến Phát

Hướng dẫn 2 : TS. Đỗ Thị Gấm

**Hà Nội - 2023**

**LỜI CAM ĐOAN**

*Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi hoàn toàn chịu trách nhiệm.*

Hà nội, ngày      tháng      năm 2023  
Học viên

Bùi Ngọc Ánh

## LỜI CẢM ƠN

*Trong quá trình thực hiện và hoàn thành luận văn này, tôi đã nhận được sự giúp đỡ nhiệt tình về tinh thần, kiến thức cũng như cơ sở vật chất của các nhà khoa học, các cơ sở nghiên cứu.*

- *Đặc biệt tôi xin được bày tỏ sự kính trọng và biết ơn sâu sắc tới **TS. Đỗ Tiến Phát** và **TS. Đỗ Thị Gấm** – những người thầy đã tận tình định hướng, hướng dẫn và giúp đỡ tôi hết sức tận tình trong suốt thời gian tôi nghiên cứu và hoàn thành luận văn.*
- *Kết quả nghiên cứu được hỗ trợ từ đề tài nghiên cứu: Nghiên cứu tuyển chọn giống, bảo tồn và tối ưu điều kiện nuôi trồng nhằm nâng cao chất lượng nấm nhộng trùng thảo (*Cordyceps militaris*) cho sản xuất chế phẩm bảo vệ sức khỏe. Mã số: ĐTDTCN.28/23.*
- *Tôi xin trân trọng cảm ơn Ban lãnh đạo Viện Công nghệ sinh học và Phòng Công nghệ tế bào thực vật đã tạo mọi điều kiện thuận lợi giúp đỡ tôi suốt quá trình nghiên cứu học tập tại viện.*
- *Bên cạnh đó tôi cũng trân trọng cảm ơn sự hướng dẫn tận tình của **ThS. Tạ Thị Đông** và **ThS. Nguyễn Thị Hồng Hà** cùng toàn thể cán bộ phòng Công nghệ tế bào thực vật – Viện Công nghệ sinh học – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam trong suốt quá trình tôi làm nghiên cứu luận văn.*
- *Tôi xin trân trọng cảm ơn ban Lãnh đạo, phòng Đào tạo, các phòng chức năng của Học viện Khoa học và Công nghệ và các thầy cô giáo Khoa Công Nghệ Sinh học - Học viện Khoa học Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam về sự dạy dỗ và chỉ bảo tận tình trong quá trình tôi học tập.*
- *Tôi cũng xin được trân trọng cảm ơn Ban lãnh đạo Viện nghiên cứu, đào tạo và tư vấn khoa học công nghệ đã tạo điều kiện giúp đỡ tôi về thời gian và cơ sở vật chất để tôi hoàn thành công việc.*

*Nhân dịp này tôi đặc biệt gửi lời cảm ơn đến gia đình thân yêu luôn hi sinh và ủng hộ tôi, tôi gửi lời cảm ơn đến bạn bè và các anh chị đồng nghiệp đã đồng viên và giúp đỡ để tôi hoàn thành luận văn này.*

## MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN .....	i
LỜI CẢM ƠN .....	ii
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT .....	vi
DANH MỤC CÁC BẢNG .....	vii
DANH MỤC CÁC HÌNH .....	viii
MỞ ĐẦU .....	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU.....	3
<b>1.1.    PHÂN LOẠI, ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC VÀ PHƯƠNG THỨC SINH SẢN NẤM NHỘNG TRÙNG THẢO (<i>Cordyceps militaris</i>) .....</b>	<b>3</b>
1.1.1.    Vị trí phân loại nấm nhộng trùng thảo ( <i>Cordyceps militaris</i> ) .....	3
1.1.2.    Đặc điểm của nấm nhộng trùng thảo ( <i>Cordyceps militaris</i> ).....	3
1.1.3.    Phương thức sinh sản của nấm nhộng trùng thảo ( <i>Cordyceps militaris</i> ).....	4
<b>1.2.    GIÁ TRỊ DINH DƯỠNG, THÀNH PHẦN HOẠT CHẤT CỦA NẤM NHỘNG TRÙNG THẢO (<i>CODYCEPS MILITARIS</i>) .....</b>	<b>5</b>
<b>1.3.    TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU NUÔI TRỒNG NẤM NHỘNG TRÙNG THẢO (<i>Cordyceps militaris</i>) .....</b>	<b>8</b>
1.3.1.    Nghiên cứu nuôi trồng nấm <i>C. militaris</i> trong nước và trên thế giới.....	8
1.3.2.    Nghiên cứu nâng cao năng suất, hàm lượng hoạt chất trong nấm nhộng trùng thảo ( <i>Cordyceps militaris</i> ) .....	10
<b>1.4.    THOÁI HÓA GIỐNG NHỘNG TRÙNG THẢO, ĐẶC ĐIỂM, NGUYÊN NHÂN VÀ MỘT SỐ PHƯƠNG THỨC KHẮC PHỤC.....</b>	<b>13</b>
1.4.1.    Đặc điểm thoái hóa giống <i>Cordyceps militaris</i> trong nuôi cấy nhân tạo.....	13
1.4.2.    Một số nguyên nhân dẫn tới thoái hóa giống <i>Cordyceps militaris</i> .....	14

<b>CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1.    ĐỐI TƯỢNG VÀ NGUYÊN VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU.....</b>	<b>17</b>
2.1.1.    Đối tượng nghiên cứu.....	17
2.1.2.    Nguyên vật liệu nghiên cứu .....	17
<b>2.2.    PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....</b>	<b>17</b>
2.2.1.    Nuôi cấy nấm nhộng trùng thảo.....	17
2.2.2.    Đánh giá hình thái sinh trưởng, phát triển của nấm trên môi trường cơ chất tạo quả thể.....	18
2.2.3.    Phân tích chất lượng của quả thể nấm .....	19
2.2.4.    Phân lập và phát triển các dòng bào tử đơn .....	19
2.2.5.    Phân tích tỷ lệ, thành phần và sự biến đổi gen MAT.....	20
2.2.6.    Phương pháp thống kê và xử lý số liệu.....	21
<b>CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....</b>	<b>22</b>
<b>3.1.    ẢNH HƯỞNG CỦA HÀM LƯỢNG KHOÁNG TỚI HÌNH THÁI, SINH TRƯỞNG VÀ PHÁT TRIỂN CỦA CHỦNG NẤM <i>CORDYCEPS MILITARIS</i> S1 .....</b>	<b>22</b>
3.1.1.    Xác định thông tin di truyền của chủng nấm <i>Cordyceps militaris</i> S1.....	22
3.1.2.    Sự sinh trưởng hệ sợi của chủng nấm <i>Cordyceps militaris</i> S1 trong giai đoạn ủ tối.....	25
3.1.3.    Sự sinh trưởng và tạo mầm quả thể của chủng nấm <i>Cordyceps militaris</i> S1 trong giai đoạn chiếu sáng.....	28
3.1.4.    Sự sinh trưởng và phát triển của chủng nấm <i>Cordyceps militaris</i> S1 trong giai đoạn tạo quả thể.....	30
3.1.5.    Sinh khối và chất lượng chủng nấm <i>Cordyceps militaris</i> S1.....	33
<b>3.2.    ẢNH HƯỞNG HÀM LƯỢNG KHOÁNG TRONG MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY TỚI KHẢ NĂNG THOÁI HÓA CHỦNG NẤM <i>CORDYCEPS MILITARIS</i> S1 .....</b>	<b>37</b>

3.2.1. Đặc điểm hình thái và sinh trưởng của hệ sợi các dòng đơn bào tử sau 7 ngày nuôi trong tối .....	37
3.2.2. Đặc điểm hình thái và sinh trưởng phát triển của các dòng đơn bào tử sau 15 ngày nuôi chiếu sáng .....	39
3.2.3. Đặc điểm về thành phần và tỷ lệ gen MAT .....	42
<b>CHƯƠNG 4: KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....</b>	<b>45</b>
<b>KẾT LUẬN .....</b>	<b>45</b>
<b>KIẾN NGHỊ .....</b>	<b>46</b>
<b>DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ .....</b>	<b>47</b>
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO .....</b>	<b>48</b>
<b>PHỤ LỤC .....</b>	<b>57</b>

## DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT

<b>Chữ viết tắt</b>	<b>Tiếng Anh</b>	<b>Tiếng Việt</b>
<b><i>C. militaris</i></b>	<i>Cordyceps militaris</i>	Nhộng trùng thảo
<b><i>C. senensis</i></b>	<i>Cordyceps senensis</i>	Đông trùng hạ thảo
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic acid	Axit deoxyribonucleic
<b>ITS</b>	Internal transcribed spacer	
<b>SDS</b>	Sodium dodecyl sulphate	
<b>SDB</b>	Sabouraud dextrose	
<b>PDA</b>	Potato dextrose agar	Môi trường thạch khoai tây và đường dextrose
<b>SDAY</b>	Sabouraud dextrose agar plus yeast extract	
<b>HPLC</b>	High performance liquid chromatography	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
<b>CTAB</b>	Cetyl trimethyl ammonium bromide	
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction	Phản ứng chuỗi Polymerase
<b>MAT</b>	A single mating type	
<b>bp</b>	Base pair	Cặp bazơ nitơ
<b>M</b>	Marker	
<b>CTTN</b>		Công thức thí nghiệm
<b>Locus</b>		Vị trí mang gen trên nhiễm sắc thể
<b>BLAST</b>	Basic Local Alignment Search Tool	Công cụ để so sánh các trình tự gen/ protein cơ bản
<b>NCBI</b>	National Center for Biotechnology Information	Trung tâm thông tin Công nghệ sinh học Quốc gia (Mỹ)



## DANH MỤC CÁC BẢNG

<b>Bảng</b>	<b>Tên bảng</b>	<b>Trang</b>
<b>Bảng 2.1</b>	Nồng độ khoáng bổ sung vào các công thức thí nghiệm	19
<b>Bảng 2.2</b>	Thành phần một phản ứng nhân dòng gen (PCR)	21
<b>Bảng 3.1</b>	Tỷ lệ và thành phần gen MAT của chủng nấm <i>Cordyceps militaris</i> S1	24
<b>Bảng 3.2</b>	Đặc điểm hình thái, sinh trưởng và phát triển hệ sợi của chủng <i>Cordyceps militaris</i> S1 trong giai đoạn ủ tối	27
<b>Bảng 3.3</b>	Đặc điểm hình thái, sinh trưởng và tạo mầm quả thể của chủng <i>Cordyceps militaris</i> S1	29
<b>Bảng 3.4</b>	Đặc điểm hình thái, sinh trưởng và phát triển quả thể của chủng <i>Cordyceps militaris</i> S1	32
<b>Bảng 3.5</b>	Khối lượng quả thể của chủng <i>Cordyceps militaris</i> S1 trên các công thức môi trường thí nghiệm	34
<b>Bảng 3.6</b>	Chất lượng quả thể của chủng <i>Cordyceps militaris</i> S1 trên các công thức môi trường thí nghiệm	36
<b>Bảng 3.7</b>	Đặc điểm hình thái, sinh trưởng và phát triển hệ sợi của các dòng đơn bào tử sau 7 ngày nuôi trong tối	39
<b>Bảng 3.8</b>	Đặc điểm hình thái, sinh trưởng và phát triển của các dòng bào tử đơn sau 15 ngày nuôi dưới điều kiện chiếu sáng	41
<b>Bảng 3.9</b>	Tỷ lệ và thành phần gen MAT từ các công thức thí nghiệm	43

## DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình	Tên hình	Trang
Hình 1.1	Nấm <i>Cordyceps militaris</i> trong môi trường tự nhiên hoang dại	3
Hình 1.2	Nấm <i>Cordyceps militaris</i> nuôi trồng trên môi trường nhân tạo	3
Hình 1.3	Phương thức sinh sản của nấm nhộng trùng thảo <i>Cordyceps militaris</i>	4
Hình 1.4	Công thức hóa học của cordycepin, adenosin và pentostatin	6
Hình 3.1	Kết quả tìm kiếm và so sánh trình tự ITS của chủng <i>Cordyceps militaris</i> S1 bằng công cụ BLAST trên NCBI	22
Hình 3.2	Cây phát chủng loại của 14 dòng nấm nhộng trùng thảo dựa trên trình tự ITS1	23
Hình 3.3	Nhân giống dịch thể cấp 2 chủng nấm <i>C. militaris</i> S1	25
Hình 3.4	Hình thái hệ sợi chủng nấm <i>Cordyceps militaris</i> S1 trên môi trường cơ chất	26
Hình 3.5	Đặc điểm hình thái mầm quả thể chủng nấm <i>Cordyceps militaris</i> S1	28
Hình 3.6	Hình thái quả thể chủng nấm <i>Cordyceps militaris</i> S1 sau 60 ngày nuôi cấy	31
Hình 3.7	Hình thái quả thể nấm <i>Cordyceps militaris</i> S1 sau khi sấy thăng hoa	33
Hình 3.8	Các bào tử đơn được phân lập từ quả thể sau 5 ngày trên môi trường nuôi cấy	37

<b>Hình 3.9</b>	Hệ sợi phát triển từ các dòng đơn bào tử thu được sau 7 ngày nuôi trong tối	38
<b>Hình 3.10</b>	Các dòng bào tử đơn sau 15 ngày chiếu sáng	40
<b>Hình 3.11</b>	Kết quả kiểm tra tỷ lệ và thành phần gen MAT trong các công thức thí nghiệm	42

## MỞ ĐẦU

Nhộng trùng thảo (*Cordyceps militaris*) từ lâu đã được coi là một loại dược liệu quý trong y học cổ truyền Trung Quốc [1]. Nấm *Cordyceps militaris* (*C.militaris*) chứa nhiều hoạt chất sinh học như cordycepin, adenosine, cordiceptic acid, polychaccaride, superoxide dismutase (SOD) và một số thành phần dinh dưỡng khác. Các polysaccharide của *Cordyceps militaris* có các hoạt tính kháng tế bào ung thư ở cổ tử cung và ung thư ở gan [2]. Hợp chất cordycepin (3'- deoxyadenosine) từ nấm có hoạt tính sinh học như kháng vi sinh vật, kháng ung thư, ngăn ngừa di căn, điều hòa miễn dịch [3]. Ngoài ra, các nghiên cứu cho thấy chất CM-hs-CPS2 có chứa trong dịch chiết nấm *C. militaris* có tính kháng 2, 2 – diphenyl – 1 – picrylhydrazyl (DPPH), hoạt tính khử và tạo phức ở nồng độ (8 mg/ml) là 89%, 1,188 và 85% [4]. Thêm vào đó, một số chất được chiết xuất từ quả thể nấm có hoạt tính như là chất chống oxy hóa, các chất kháng khuẩn, các chất kháng nấm và các chất kháng thể dòng tế bào ung thư [5,6,2].

Do có giá trị dược lý cao nên nhu cầu sử dụng *C. militaris* để nâng cao sức khỏe, tăng cường miễn dịch là rất lớn. Tuy nhiên, nguồn cung cấp *C. militaris* trong tự nhiên còn rất hạn chế và khan hiếm dẫn tới giá thành rất cao. Gần đây, các nhà khoa học trên thế giới đã nghiên cứu thành công quy trình nuôi nấm *Cordyceps militaris* trên môi trường nuôi cấy nhân tạo ở quy mô phòng thí nghiệm. Để đáp ứng nhu cầu rất lớn của người tiêu dùng, việc nuôi trồng và sản xuất nấm nhộng trùng thảo cần được mở rộng ở quy mô công nghiệp nhằm làm tăng sản lượng.

Tuy nhiên, sản xuất nấm nhộng trùng thảo *Cordyceps militaris* ở quy mô công nghiệp đang gặp phải các vấn đề như năng suất không cao, chất lượng không đảm bảo, thoái hóa giống sau vài chu kỳ nuôi cấy. Các nghiên cứu gần đây đã khẳng định năng suất, chất lượng và khả năng thoái hóa nấm nhộng trùng thảo *C. militaris* chịu ảnh hưởng lớn bởi các thành phần môi trường khoáng, các chất bổ sung vào môi trường nuôi cấy [7,8]. Do vậy việc nghiên cứu về ảnh hưởng của thành phần và hàm lượng các khoáng, các chất dinh dưỡng hữu cơ đến việc thoái hóa giống để từ đó xác định được công thức môi trường nuôi cấy tối ưu, giảm thiểu tốc độ thoái hóa nấm nhộng trùng thảo là nghiên cứu có ý

nghiã thực tiễn lớn và là cơ sở khoa học cho việc nâng cao năng suất, chất lượng và hiệu quả kinh tế trong sản xuất loại dược liệu quý này.

Xuất phát từ các cơ sở khoa học và thực tiễn trên, để nâng cao hiệu quả trong sản xuất nấm nhộng trùng thảo *C. militaris* thương phẩm tại Việt Nam, chúng tôi tiến hành đề tài: **“Nghiên cứu ảnh hưởng của thành phần môi trường nuôi cấy đến năng suất, chất lượng và khả năng thoái hóa nấm nhộng trùng thảo *Cordyceps militaris*”**.

#### **Mục đích của đề tài:**

Đánh giá được ảnh hưởng của hàm lượng khoáng vô cơ và nguyên liệu hữu cơ bổ sung tới sinh trưởng, năng suất, chất lượng và khả năng thoái hóa giống nấm nhộng trùng thảo *Cordyceps militaris* trong điều kiện nuôi trồng nhân tạo.

#### **Nội dung nghiên cứu:**

- Đánh giá ảnh hưởng của hàm lượng môi trường khoáng tới sinh trưởng, phát triển và chất lượng của nấm *Cordyceps militaris*.
- Đánh giá ảnh hưởng của hàm lượng môi trường khoáng tới khả năng thoái hóa giống nấm nhộng trùng thảo *Cordyceps militaris*.

## CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

### 1.1. PHÂN LOẠI, ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC VÀ PHƯƠNG THỨC SINH SẢN NẤM NHỘNG TRÙNG THẢO (*Cordyceps militaris*)

#### 1.1.1. Vị trí phân loại nấm nhộng trùng thảo (*Cordyceps militaris*)

Nhộng trùng thảo *Cordyceps militaris* (*C. militaris*) thuộc giới Nấm, ngành Ascomycota, lớp Sordariomycetes, bộ Hypocreales, họ Cordycipitaceae, giống *Cordyceps* và loài *Cordyceps militaris*. Loài này được tác giả Carl Linnaeus mô tả vào năm 1753 với tên gọi *Clavaria militaris*, sau đó được đổi tên thành *Cordyceps militaris* [10]. Trong họ Cordycipitaceae, thì *Cordyceps* là chi nấm ký sinh côn trùng, với số lượng loài lớn (có hơn 600 loài đã được phát hiện) và có phổ ký chủ đa dạng, chúng thường ký sinh trên ấu trùng và trên nhộng hoặc sâu trưởng thành của các loài côn trùng thuộc bộ cánh cứng (Coleoptera), bộ cánh màng (Hymenoptera), bộ hai cánh (Diptera) [11]. Những loài thuộc chi *Cordyceps* có phạm vi phân bố trải rộng khắp trên toàn cầu từ các nước châu Á sang các nước ở châu Âu và cả các nước ở Bắc Mỹ [12].



**Hình 1.1.** Nấm *Cordyceps militaris* trong môi trường tự nhiên hoang dại [3]



**Hình 2.2.** Nấm *Cordyceps militaris* nuôi trồng trên môi trường nhân tạo [13]

#### 1.1.2. Đặc điểm của nấm nhộng trùng thảo (*Cordyceps militaris*)

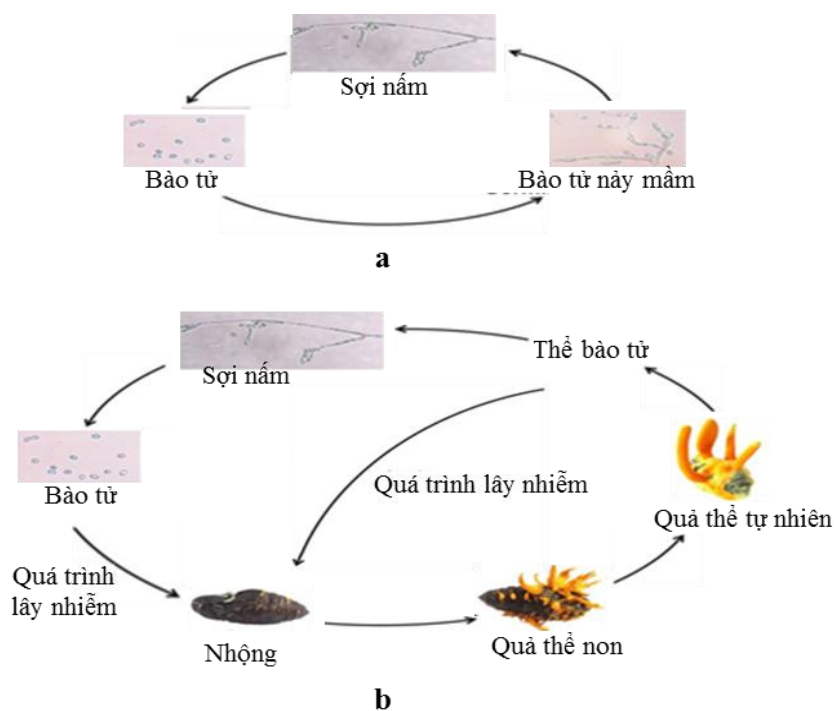
*C. militaris* là loài ký sinh trên côn trùng và ấu trùng của côn trùng, con đường lây nhiễm chủ yếu là ở giai đoạn nhộng của các loài bướm khác nhau, rồi nhân lên trong cơ thể ký chủ vào mùa đông. Bào tử nấm theo gió dính vào bên

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 ký chủ. Sau đó, hệ sợi nấm hút dinh dưỡng và sinh trưởng mạnh mẽ chiếm toàn bộ cơ thể và làm chết vật chủ. Đến cuối hè hoặc mùa thu, quả thể nhô ra ngoài để phát tán bào tử vào không khí [10,14]. Thời gian này kéo dài từ 2-3 tháng, quả thể phát triển và hình thành bào tử phát tán chúng đi khắp nơi [14].

Nấm nhộng trùng thảo *C. militaris* thường quả thể có màu sắc vàng nhạt hoặc màu da cam [15], dài khoảng 8 cm-10 cm. Phần đầu quả thể nấm tròn và có các đốm màu vàng cam sáng. Các nang bào tử nằm ở phần đầu quả thể dài đến 300  $\mu\text{m}$  – 510  $\mu\text{m}$ , bề rộng 4  $\mu\text{m}$ . Các bào tử nang hình sợi, không màu và phân đoạn, kích thước 3,5-6  $\mu\text{m}$   $\times$  1-1,5  $\mu\text{m}$ . Trong điều kiện nghèo dinh dưỡng, các bào tử nang này sẽ đứt ra và nảy chồi tạo các bào tử thứ cấp [12].

### 1.1.3. Phương thức sinh sản của nấm nhộng trùng thảo (*Cordyceps militaris*)

Sinh sản của nhộng trùng thảo được thực hiện thông qua cả hai hình thức là sinh sản vô tính thông qua việc sinh bào tử tính (conidia) và sinh sản hữu tính thông qua hình thành thể bào tử (ascospores)



**Hình 1.3.** Phương thức sinh sản của nhộng trùng thảo *C. militaris*  
**a.** Hình thức sinh sản vô tính; **b.** Phương thức sinh sản hữu tính [16]

Ở hình thức sinh sản hữu tính, *Cordyceps militaris* thuộc mô hình dị sản (heterothallism), trong đó locus bắt cặp tồn tại ở hai dạng đối ngược nhau MAT1-1 và MAT1-2 ở trên hai thể bào tử khác nhau [17,18]. Locus MAT1 có chứa 2 gen *MAT1-1-1* và *MAT1-1-2*, trong khi locus MAT2 có chứa gen *MAT1-2-1*. Các gen MAT mã hóa cho các yếu tố điều hòa phiên mã (transcription factor) đóng vai trò điều khiển gen liên quan tới quá trình sinh sản hữu tính của nấm này [19]. Trong đó, MAT1-1 và MAT1-2 mã hóa cho các nhân tố điều hòa phiên mã khác biệt có chứa các vùng (motifs) có chức năng gắn kết với DNA. Yếu tố điều hòa phiên mã MAT1-1 có chứa tiểu phần  $\alpha$  ( $\alpha$  domain) đóng vai trò vùng gắn kết DNA, trong khi đó tiểu phần HMG (HMG domain) của MAT1-2 có chức năng gắn kết DNA [20]. Quá trình bắt cặp được cảm ứng và khởi đầu khi hai bào tử đơn có mang yếu tố MAT trái ngược nhau tiếp xúc thông qua cơ chế nhận diện tín hiệu [21]. Khi hai bào tử đơn với MAT trái ngược nhau bắt cặp, các thể thụ cảm ứng (receptor) sẽ nhận biết các chất dẫn dụ (pheromone), các gen liên quan tới quá trình sinh sản được kích hoạt bởi các yếu tố điều hòa phiên mã MAT.

## **1.2. GIÁ TRỊ DINH DƯỠNG, THÀNH PHẦN HOẠT CHẤT CỦA NẤM NHỘNG TRÙNG THẢO (*CODYCEPS MILITARIS*)**

Từ các năm trước đã có nhiều nghiên cứu công bố về thành phần hóa học của nấm nhộng trùng thảo đã cho biết trong sinh khối quả thể có chứa các hợp chất sinh học sinh học quan trọng là 3-deoxyadenosin (cordycepin), adenosine, cordiceptic acid, polysaccharide, protein, mannitol...và giàu các loại vitamin như B12, B2, A, C, E, K và cũng có nhiều nguyên tố vi lượng như Na, K, Ca, Mg, Al, Mn, Cu, Zn, Bo, Fe... trong đó cao nhất là phosphor [22 -24,3]. Nhiều nghiên cứu về thành phần hóa học của nấm nhộng trùng thảo nuôi cấy trên môi trường nhân tạo cũng được đánh giá là tương tự như nấm nhộng trùng thảo thu từ tự nhiên [23].

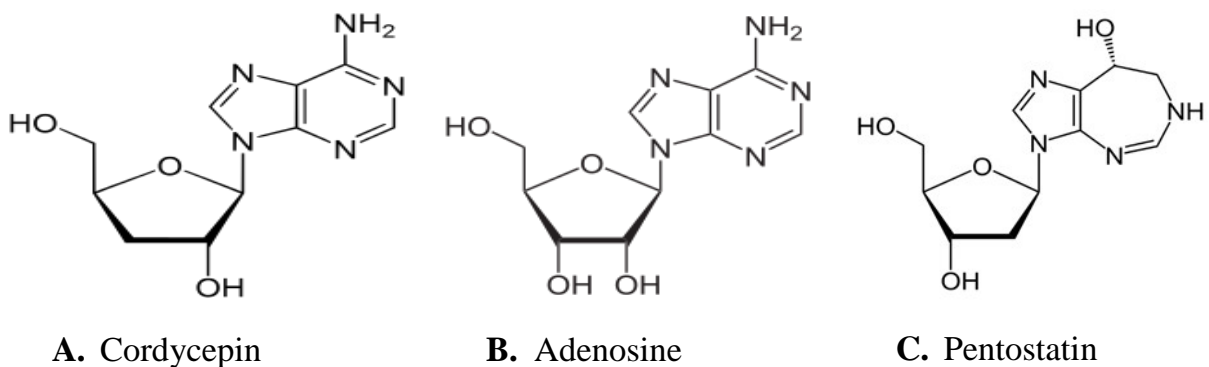
Trong nấm nhộng trùng thảo *C. militaris*, hợp chất cordycepin và adenosine được đánh giá là các hợp chất quan trọng quyết định giá trị dược học của loại nấm này, vì vậy hàm lượng cordycepin và adenosine được coi là 2 chỉ tiêu chính để đánh giá chất lượng của nấm *C. militaris* [25].



+ *Cordycepin*:

Cordycepin có cấu trúc 3 - deoxyadenosin là một purin alkaloid (có dạng của nucleosid adenosine bị mất một oxy ở vị trí 3' phần đường ribose). Cordycepin có công thức  $C_{10}H_{13}N_5O_3$  và có phân tử lượng 251, có điểm nóng chảy tại  $230-231^{\circ}C$ , độ hấp thu cực đại tại 259 nm. Cordycepin có thể hoà tan trong dung dịch đậm muối, methanol hay ethanol nhưng không hoà tan trong benzen, ether hay chloroform.

Huang và cộng sự (2009) đã đánh giá hàm lượng cordycepin và adenosine trong quả thể *C. militaris* nuôi cấy trên giá thể gạo và trong quả thể *Cordyceps sinensis* tự nhiên. Kết quả cho thấy hàm lượng cordycepin và adenosine trong quả thể *C. militaris* lần lượt là  $2,654 \pm 0,02$  mg/g và  $2,45 \pm 0,03$  mg/g. Trong khi đó hàm lượng hai hoạt chất này trong loài *Cordyceps sinensis* (*C. sinensis*) là  $0,980 \pm 0,01$  và  $1,643 \pm 0,03$  mg/g. Sinh khối sợi nấm *C. militaris* nuôi cấy theo phương pháp lên men chìm có hàm lượng cordycepin  $0,9040 \pm 0,02$  mg/g và adenosine  $1,592 \pm 0,03$  mg/g [26]. Như vậy có thể thấy chủng nấm *C. militaris* nuôi cấy nhân tạo có khả năng tổng hợp một số thành phần hoạt chất chính tương đương với *C. sinensis* sinh trưởng trong môi trường tự nhiên. Tuy nhiên, các yếu tố ngoại cảnh cũng như sự khác nhau giữa các chủng nấm sử dụng trong quá trình nuôi cấy đều tác động đến hàm lượng các hoạt chất trong sinh khối nấm *C. militaris*.



**Hình 1.4.** Công thức hóa học của cordycepin, adenosin và pentostatin

+ *Adenosine*: Adenosine là 1 trong hai hợp chất có dược tính cao của nấm *C. militaris*. Adenosine là một nucleotide nội sinh hiện diện trong các tế bào của cơ thể con người. Cấu trúc hóa học của adenosine là 6-amino-9-beta-D-ribofuranosyl-9-H-purine. Adenosine tham gia cấu thành nên DNA, ATP và tạo

ra các hoạt chất khác như Cordycepin, D-manitol. Nhiều nghiên cứu cho biết trên mẫu quả thể nấm *C. militaris* hàm lượng adenosine đều cao hơn rất nhiều so với hệ sợi phát triển trên giá thể tương ứng. Nghiên cứu của Huyn và cộng sự vào năm 2008 cho biết: Adenosine chiếm khoảng 0,18% trong quả thể và khoảng 0,06% trong sinh khối nấm [27]; Huang và cộng sự (2009) ghi nhận hàm lượng adenosine của *C. sinensis* tự nhiên là 1,643 mg/g [26].

+ Pentostatin: Là hợp chất lần đầu mới được phát hiện trong nấm nhộng trùng thảo (*C. militaris*), là hoạt chất ức chế adenosine deaminase được sử dụng để điều trị các bệnh lý ung thư hệ bạch huyết. Gần đây Yongliang Xia và cộng sự (2017) đã xác định được hàm lượng pentostatin trong quả thể nấm nhộng trùng thảo nuôi trồng trên các loại giá thể khác nhau. Kết quả cho thấy giá thể nhộng tằm và gạo đều có hàm lượng pentostatin cũng như cordycepin cao hơn so với môi trường Sabouraud dextrose (SDB). Pentostatin trên giá thể nhộng tằm đạt khoảng 3 mg/g quả thể, giá thể gạo khoảng 2,2 mg/g trong khi đó môi trường dinh dưỡng SDB khoảng 1,2 mg/g [28].

+ Axid cordyceptic: là một isomer của acid quinic, được nghiên cứu đầu tiên ở *C. sinensis* vào năm 1957. Sau này, cấu trúc tinh thể của cordyceptic axid được xác định là D-mannitol. Mannitol có cấu tạo gồm một alcohol và một đường hoặc một polyol, tương tự như xylitol hay sorbitol. Công thức hóa học của mannitol là  $C_6H_{14}O_6$ , trọng lượng phân tử 182, nhiệt độ nóng chảy  $166^{\circ}C$ , tỷ trọng 1,489 ( $20^{\circ}C$ ) và nhiệt độ sôi  $290 - 295^{\circ}C$  (467 kPa). Hàm lượng D-manitol trong quả thể nấm *C. militaris* dao động từ 6,48% đến 9,08% tùy theo điều kiện nuôi cấy cũng như giá thể sử dụng [29].

+ Polysaccharide: thuộc nhóm các hợp chất carbohydrate là một trong những thành phần hoạt chất đã được phát hiện ở nấm *C. militaris*, *C. sinensis* cũng như các loài nấm lớn khác. Polysaccharide có cấu tạo gồm nhiều nhóm đường đơn liên kết với nhau qua các liên kết glycoside. Polysaccharide chiết xuất từ *Cordyceps* spp. đã và đang được thử nghiệm trong điều trị một số bệnh lý như: béo phì, tiểu đường, ung thư và các bệnh truyền nhiễm [30]. Yan và cộng sự (2008) đã thu nhận thành công 2 loại polysaccharide CPS-1 và CPS-2 từ quả thể nấm *C. militaris* nuôi cấy trên giá thể gạo. Phân tích cấu trúc cho thấy CPS-1 và CPS-2 được cấu thành từ mannose và galactose với tỷ lệ mol lần lượt là 0,96 :1 và 1,04 :1. Nhóm nghiên cứu cho thấy hai hợp chất này đều có khả

năng bảo vệ các tế bào gan chuột khỏi tổn thương gây ra bởi ethanol dựa trên cơ chế chống oxy hóa [31].

+ *Axit amin*: Kết quả nghiên cứu của Hyun và cộng sự (2008) cho thấy trong quả thể và hệ sợi nấm *C. militaris* chứa tổng hàm lượng axit amin là 69,32 mg/g và 14,03 mg/g [32]. Trước đó, Chang và cộng sự (2001) đã đánh giá hàm lượng các acid amin trong sinh khối nấm *C. militaris* nuôi cấy chìm. Kết quả cho thấy mặc dù thành phần không thay đổi nhưng hàm lượng đều thấp hơn so với quả thể nuôi trồng trên giá thể gạo [27].

+ *Axit béo*: Theo nghiên cứu của Hur (2008) quả thể nấm *C. militaris* chứa nhiều acid béo không no, chiếm 70% tổng số axit béo, trong đó lượng axit linoleic chiếm đến 61,3% trong quả thể và 21,5% trong sinh khối; lượng acid béo no chủ yếu là axit palmitic, chiếm 24,5% trong quả thể và 33,0% trong sinh khối [28].

### **1.3. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU NUÔI TRỒNG NẤM NHỘNG TRÙNG THẢO (*Cordyceps militaris*)**

#### **1.3.1. Nghiên cứu nuôi trồng nấm *C. militaris* trong nước và trên thế giới**

Hiện nay, nhộng trùng thảo *C. militaris* dần đang được sử dụng thay thế cho *C. sinensis* không chỉ do khả năng thích nghi cao với điều kiện nuôi cấy nhân tạo mà còn nhờ vào dược tính, giá trị dinh dưỡng chúng mang lại. Nghiên cứu của Lei Huang và cộng sự (2009) [26] đã chỉ ra hàm lượng của các thành phần hoạt tính sinh học chính là cordycepin và adenosine trong quả thể của *C. militaris* cao hơn *C. sinensis* ngoài tự nhiên, trong khi sợi nấm lên men *C. militaris* tương tự với *C. sinensis* ngoài tự nhiên.

Hiện nay, nấm nhộng trùng thảo được nuôi cấy chủ yếu trên môi trường cơ chất và môi trường lỏng (lên men chìm hoặc lên men bề mặt). Đã có nhiều công trình nghiên cứu từ các trường đại học và các viện nghiên cứu trên thế giới về nuôi trồng nấm *C. militaris* ở qui mô lớn gồm cả dạng sợi nấm lẫn dạng quả thể, như các nghiên cứu sản xuất quả thể *C. militaris* trên cơ thể côn trùng.

Một số nghiên cứu của các tác giả trên thế giới đã chỉ rằng: Ngũ cốc và một số cơ chất được chứng minh là cơ chất tốt trong nuôi cấy *C. militaris* hơn là nuôi cấy trên côn trùng [33]. Trong đó gạo được sử dụng là thành phần chính

cho sự sinh trưởng của quả thể nhộng trùng thảo [34]. Các loại cơ chất hữu cơ khác dùng để nuôi trồng Nhộng trùng thảo như: khoai tây, ngô, lõi ngô, vỏ hạt bông, kê, ngũ cốc...[35]. Trong đó, khi sử dụng cơ chất chính là gạo lứt thu được năng suất quả thể là cao nhất [34]. Mặt khác kết quả của Zhao và nhóm nghiên cứu (2006), gạo trộn với nhộng tằm là môi trường cơ chất tốt hơn các môi trường cơ chất khác và hiện nay được sử dụng phổ biến để làm môi trường nuôi trồng *C.militaris* [36].

Tại Việt Nam nấm Nhộng trùng thảo *Cordyceps militaris* có ở khắp các tỉnh như: Lai Châu, Lào Cai, Bắc Kạn, Thái Nguyên, Ninh Bình, Hà Tĩnh, Thanh Hóa, Lâm Đồng, Quảng Nam...để đáp ứng nhu cầu thị trường đã có những nghiên cứu cơ bản về nuôi trồng nhộng trùng thảo như nghiên cứu về phân bố của nhộng trùng thảo của Trịnh Tam Kiệt (1996) hay Phạm Quang Thu (2009) [37,38]. Trong nghiên cứu của Phạm Thị Thùy (2010) [39] đã xác định được 3 loài nấm: *Cordyceps nutans* Cúc Phương, Ninh Bình và Tam đảo - Vĩnh Phúc; *C. militaris* ở Vũ Quang, Hà Tĩnh; *Cordyceps sp1* ở Sơn Động, Bắc Giang.

Nghiên cứu về các đặc điểm sinh học của hệ sợi nấm nhộng trùng thảo trong các môi trường nuôi cấy cơ bản được thực hiện bởi Phạm Quang Thu và cộng sự (2012) [40]. Kết quả thu được cho thấy, trong 8 chủng nấm nghiên cứu có 4 chủng nấm thu thập ở Việt Nam, 3 chủng sưu tầm từ Nhật và 1 chủng từ Trung Quốc và các chủng nấm nghiên cứu này đều sinh trưởng bình thường trên môi trường dinh dưỡng nhân tạo PDA có bổ sung thêm 10% nhộng tằm, pH môi trường phù hợp là từ 4,5 -5,6; nhiệt độ không khí thích hợp nhất là từ 20 -25°C, độ ẩm trong không khí là từ 80 -85%.

Đối với việc nuôi trồng và sản xuất nấm nhộng trùng thảo *C. militaris* trong điều kiện nhân tạo ngoài việc kiểm soát chặt chẽ các yếu tố dinh dưỡng thì việc kiểm soát các điều kiện môi trường nuôi trồng nấm như giống, nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng và dinh dưỡng là hết sức cần thiết để duy trì sản lượng và chất lượng nấm *C.militaris* [41].

### **1.3.2. Nghiên cứu nâng cao năng suất, hàm lượng hoạt chất trong nấm nhộng trùng thảo (*Cordyceps militaris*)**

Nấm *Cordyceps militaris* được xem là loại thảo dược quý được phát triển, sử dụng đầu tiên trong các bài thuốc cổ truyền của Trung Quốc. Trong nhộng trùng thảo có chứa hoạt chất sinh học cordycepin, adenosine. Đây là các hoạt chất có tác dụng nâng cao sức đề kháng, chống lão hóa, kháng lại ung thư... Vì vậy, cordycepin đang được sử dụng phổ biến và là thành phần quan trọng trong sản xuất mỹ phẩm, thực phẩm chức năng... nhưng hàm lượng cordycepin thấp là một trở ngại lớn trong việc thương mại hóa và ứng dụng các sản phẩm từ nấm nhộng trùng thảo nuôi cấy. Để nâng cao hàm lượng cordycepin cũng như các hoạt chất sinh học khác trong nhộng trùng thảo nuôi cấy công nghiệp, rất nhiều nghiên cứu đã được thực hiện nhằm tối ưu các điều kiện nuôi cấy như thành phần dinh dưỡng, giá thể, nhiệt độ, độ ẩm, pH môi trường... Ngoài ra, các thành phần dinh dưỡng khác cũng như các loại dịch chiết động thực vật cũng đã được thử nghiệm nhằm tăng cường khả năng sinh trưởng cũng như hoạt chất sinh học của nhộng trùng thảo [42].

#### **1.3.2.1. Tối ưu các điều kiện môi trường cho nuôi cấy nấm nhộng trùng thảo (*C. militaris*)**

Các yếu tố môi trường ảnh hưởng trực tiếp tới sinh trưởng của sợi nấm cũng như quá trình chuyển tiếp từ sinh trưởng sinh dưỡng sang sinh trưởng sinh thực ở các loại nấm.

Nhiệt độ có ảnh hưởng rất lớn tới việc hình thành thể quả của nhộng trùng thảo. Nhiệt độ cao (khoảng 25°C) được xem là điều kiện tối thích cho sự phát triển thể sợi của nhộng trùng thảo. Tuy nhiên, ở nhiệt độ thấp hơn sẽ kích thích sự hình thành và phát triển của quả thể nấm. Các nghiên cứu cho thấy ngưỡng nhiệt độ tối thích cho nuôi cấy nhộng trùng thảo là từ 18-22°C [43]. Tuy nhiên, một số nghiên cứu gần đây cũng cho thấy, ngưỡng nhiệt độ 25°C giúp rút ngắn quá trình thành thực của quả thể đồng thời nâng cao hàm lượng cordycepin trong nhộng trùng thảo so với các ngưỡng nhiệt độ thấp hơn [44]. Ngoài ra, ngưỡng nhiệt độ tối thích cho sinh trưởng phát triển và tích lũy hoạt chất của nhộng trùng thảo còn phụ thuộc vào chủng giống được sử dụng.

Độ ẩm và trao đổi khí được khẳng định có ảnh hưởng lớn tới sinh trưởng và phát triển của nhộng trùng thảo nuôi cấy nhân tạo. Việc lưu thông không khí trong bình nuôi cấy giúp kích thích sợi nấm phát triển cũng như tăng cường sự hình thành quả thể và năng suất nhộng trùng thảo. Việc sử dụng các bình nuôi cấy có sử dụng màng thông khí mang lại hiệu quả tốt nhất cho sinh trưởng của nhộng trùng thảo [44]. Độ ẩm cao (70-90%) là điều kiện phù hợp với yêu cầu sinh trưởng phát triển của nấm ngoài tự nhiên. Ở điều kiện độ ẩm thấp có thể làm môi trường nuôi cấy khô nhanh và ảnh hưởng tới sinh trưởng của nấm nhộng trùng thảo [33].

Độ pH được xem là nhân tố môi trường vô cùng quan trọng trong nuôi cấy nhộng trùng thảo (*C. militaris*). Sự thay đổi của pH có thể tác động tới quá trình trao đổi chất, khả năng hấp thụ dinh dưỡng, tốc độ sinh trưởng và khả năng tích lũy hoạt chất sinh học, trong đó có cordycepin trong quá trình nuôi cấy nhộng trùng thảo [50]. Trong nghiên cứu của Adnan và cộng sự, pH môi trường trong ngưỡng 5,6-6 phù hợp cho việc tích lũy cordycepin trong nấm nhộng trùng thảo, trong đó 5,5 là tối ưu nhất [44]. Tương tự, nghiên cứu của Tuli và đồng tác giả cũng khẳng định điều kiện thích hợp cho sinh tổng hợp và tích lũy cordycepin là ở pH 5,5 [47].

Ngoài ra, các nghiên cứu về môi trường nhân giống và nuôi tạo quả thể theo hướng hữu cơ nhằm nâng cao năng suất và chất lượng cũng được tiếp cận. Các nhà nghiên cứu cho thấy, môi trường nuôi cấy tạo quả thể tốt nhất là môi trường được bổ sung dịch chiết giá đỗ, yến mạch và tảo spirulina. Ở điều kiện môi trường này, quả thể xuất hiện sớm nhất là 3 ngày và năng suất cao nhất đạt 32,58g tươi/ hộp [48].

### ***1.3.2.2. Sử dụng các thành phần môi trường bổ trợ trong nuôi cấy nấm nhộng trùng thảo (C. militaris)***

Để nâng cao khả năng phát triển, kích thích việc hình thành quả thể cũng như nâng cao hoạt chất sinh học, rất nhiều các thành phần bổ sung đã được sử dụng trong nuôi cấy nấm nhộng trùng thảo. Trong đó, các hợp chất giàu dinh dưỡng như yeast extract, soytone, peptone, casein hydrolysate... đã được sử dụng trong hầu hết các công bố gần đây [49]. Cụ thể, casein hydrolysate được xem là nguồn bổ sung đạm tốt nhất cho nuôi cấy nhộng trùng thảo. Khả năng sinh trưởng và hàm lượng cordycepin cao nhất khi chủng nấm KYL05 được nuôi cấy trong

môi trường có bổ sung 10 g/l yeast extract, 10 g/l peptone và 9% casein hydrolysate [50]. Thêm vào đó, các amino axit cũng được bổ sung đơn lẻ hoặc kết hợp vào nuôi cấy nấm nhộng trùng thảo [49, 51-52]. Để lựa chọn các amino axit phù hợp nhằm tăng cường hàm lượng cordycepin trong lên men dạng đặc chủng nấm CM016, Wen và đồng tác giả đã bổ sung 4 g/L các amino axit (glutamic acid, cysteine, lysine, isoleucine, methionine, tyrosine, cystine, L-hydroxyproline, valine, histidine, arginine, tryptophan, leucine, alanine, proline, phenylalanine, asparagine, glycine, aspartate acid, and glutamine) ở dạng đơn lẻ vào môi trường nuôi cấy. Kết quả nghiên cứu khẳng định: lysine, histidine và glycine có hiệu quả tốt giúp tăng cao hàm lượng cordycepin trong nhộng trùng thảo [49]. Không chỉ có cordycepin, hàm lượng adenosine cũng tăng cao khi adenine và glycine được bổ sung vào nuôi cấy nhộng trùng thảo [52]. Mặc dù vậy, một số chủng nấm *C. militaris* yêu cầu hàm lượng đạm thấp trong môi trường nuôi cấy, khi hàm lượng đạm quá cao có thể ức chế sự phân hóa và hình thành quả thể [53]. Do vậy cần khảo nghiệm và tối ưu thành phần cũng như hàm lượng các nguồn đạm khi sử dụng các chủng nấm khác nhau trong nuôi cấy.

Theo tác giả Kang và cộng sự, (2017) [54] hàm lượng hoạt chất cordycepin từ các giống *C. militaris* được lai tạo thường cao hơn từ các giống đơn dòng bố mẹ. Có thể việc giao phối của hai bào tử đơn gây ra kết hợp nhân và giảm phân kích thích tái tổ hợp gen liên quan đến tổng hợp cordycepin. Do đó, hàm lượng cordycepin trong chủng giao phối không liên quan trực tiếp với hàm lượng cordycepin trong dòng bố mẹ. Kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng lai tạo các loài đơn dòng với nhau sẽ có thể tạo ra một chủng mới với khả năng sản xuất cordycepin cao hơn các chủng đã biết trước đó.

Các loại vitamin như B1, B8 cũng được sử dụng trong nuôi cấy nấm *C. militaris* và cho thấy hiệu quả rõ rệt trong kích thích sinh trưởng cũng như tăng cường khả năng tích lũy các hoạt chất sinh học quan trọng [55,2]. Thêm vào đó, việc bổ sung nguồn đạm tự nhiên như bột nhộng tằm, bột đậu tương... vào giá thể cơm gạo giúp tăng cường khả năng sinh trưởng phát triển cũng như nâng cao các hoạt chất quan trọng trong nấm nhộng trùng thảo [16,56].

## 1.4. THOÁI HÓA GIỐNG NHỘNG TRÙNG THẢO, ĐẶC ĐIỂM, NGUYÊN NHÂN VÀ MỘT SỐ PHƯƠNG THỨC KHẮC PHỤC

### 1.4.1. Đặc điểm thoái hóa giống *Cordyceps militaris* trong nuôi cấy nhân tạo

Việc bị thoái hóa giống là một trong những vấn đề lớn trong nuôi trồng nhộng trùng thảo. Cho đến hiện nay các công trình nghiên cứu về thoái hóa giống còn rất hạn chế. Mặc dù đã có những cải tiến trong môi trường và bổ sung nguồn dinh dưỡng khoáng để nâng cao năng suất và chất lượng nấm *C. militaris* nhưng thoái hóa giống là vấn đề lớn trong nuôi trồng nhộng trùng thảo nhân tạo. Sự thoái hóa giống làm giảm khả năng phát sinh, giảm số lượng mầm quả thể (primordia), giảm khả năng sản xuất bào tử, kéo dài chu kỳ sinh trưởng của nấm kéo và làm giảm hàm lượng các hoạt chất chính [57,7].

Các quả thể nấm được sinh ra cần phải có đủ các yếu tố như giống và nguồn khoáng, cacbon... Trong đó, giống là yếu tố quan trọng và quyết định đến sản lượng và chất lượng của nấm *C. militaris*. Giống khỏe mạnh thì sợi sẽ sinh trưởng lớn và phát triển mạnh mẽ thuận lợi trên các nguồn cơ chất khác nhau và hình thành quả thể tốt. Nhưng mỗi giống sẽ có thời gian sử dụng nhất định, sau đó sức sinh trưởng của nấm sẽ bị suy giảm, giống sẽ bị thoái hóa. Bộ phận chính được thu hoạch để phục vụ nhu cầu của nấm *C. militaris* là quả thể. Nhưng quả thể lại chỉ được tạo ra trong vòng đời sinh sản hữu tính của *C. militaris* mà không hình thành trong sinh sản vô tính. Việc thoái hóa của các chủng nấm *C. militaris* hay làm giảm hoặc không còn khả năng hình thành quả thể [57, 58]. Các dấu hiệu cho biết giống bị thoái hóa như : mật độ hệ sợi thấp, tỷ lệ sinh trưởng bị giảm, năng suất thấp hoặc hình thái quả thể có hình dạng bất thường, màu sắc quả thể nấm bị thay đổi. Bản chất của thoái hóa giống ở các chủng nấm *cordyceps* nói riêng và các loài nấm nói chung là do đột biến DNA [59]. Nuôi trồng nhộng trùng thảo qua nhiều thế hệ thì tần số đột biến DNA càng lớn thì dẫn đến tình trạng thoái hóa càng cao.

Lê Văn Vẻ và đồng tác giả đã tiến hành so sánh sự phát triển của các mẫu Nhộng trùng thảo qua các thế hệ F0, F1, F5 và F8 [60]. Kết quả nghiên cứu cho thấy thời gian hình thành mầm quả thể khác nhau giữa các thế hệ theo dõi. Thế hệ F1 vẫn giữ được các tính trạng tương tự như F0. Trong khi thế hệ F8 có các dấu hiệu của thoái hóa giống rất rõ ràng như: mật độ sợi bề mặt thưa hơn, khả



năng hình thành mầm quả thể kém hơn, số lượng mầm quả thể của thể hệ F8 ít và thay đổi khá nhiều giữa các hộp thí nghiệm.

#### **1.4.2. Một số nguyên nhân dẫn tới thoái hóa giống *Cordyceps militaris***

Nguyên nhân dẫn đến sự thoái hóa của nấm *C. militaris*: hầu hết các nghiên cứu về *C. militaris* tập trung vào nuôi cấy nhân tạo, bảo quản và phục hồi chủng, tách chiết và tinh chế các thành phần có hoạt tính sinh học, cũng như các chức năng sinh lý của các thành phần đó. Các nghiên cứu về sự thoái hóa của *C. militaris* còn rất hạn chế. Trên cơ sở các nghiên cứu trước đây, các yếu tố ảnh hưởng đến sự thoái hóa của *C. militaris* có thể được chia thành hai nhóm: yếu tố môi trường và sự biến đổi di truyền [61].

##### **1.4.2.1. Các yếu tố môi trường và điều kiện nuôi cấy ảnh hưởng đến sự thoái hóa của nấm nhộng trùng thảo (*C. militaris*)**

Trong quy trình nuôi cấy nhân tạo *C. militaris*, các chủng nấm chất lượng thường thoái hóa sau từ 6 tháng đến một năm. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng, các yếu tố môi trường có tác động nhất định đến sự thoái hóa của *C. militaris* [7]. Trong đó, ion kim loại có ảnh hưởng đến sự thoái hóa như  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  và  $Zn^{2+}$  làm chậm sự thoái hóa, trong khi  $Mn^{2+}$  và  $Mg^{2+}$  thúc đẩy sự thoái hóa của nhộng trùng thảo [8].

Phương pháp bảo quản thích hợp có thể giúp tránh được sự đột biến, thoái hóa, nhiễm tạp và chết của nấm *C. militaris*. Phương pháp bảo quản có ảnh hưởng đáng kể đến sức sống và sự thoái hóa của nấm *C. militaris*. Các điều kiện bảo quản (bao gồm nuôi cấy trên môi trường, đông khô, sử dụng nhiệt độ và chất bảo quản) của nấm *C. militaris* đã được khảo sát và đánh giá. Các kết quả nghiên cứu của Sun và cộng sự (2018) chỉ ra rằng chủng nấm nhộng trùng thảo được bảo quản ở 4°C có thể duy trì sức sống và khả năng tạo thể quả ít nhất 12 tháng. Các nghiên cứu cho thấy việc tích tụ các gốc oxy hóa tự do (ROS) trong tế bào có ảnh hưởng trực tiếp đến sự thoái hóa của nấm *C. militaris*. Gen glutathione peroxidase (*Gpx*) từ *Aspergillus nidulans* đã được chuyển vào hai chủng nhộng trùng thảo (chủng bình thường Cm01 có khả năng tạo thể quả và dòng thoái hóa Cm04 không có khả năng tạo thể quả) và các kết quả cho thấy rằng các dòng đột biến có hoạt tính *Gpx* cao hơn và khả năng loại bỏ ROS tế bào mạnh hơn các chủng gốc, và dòng thoái hóa Cm04 đã phục hồi khả năng tạo

thể quả của chúng, điều này cho thấy rằng sự thoái hóa của nấm *C. militaris* bị ảnh hưởng bởi stress oxy hóa [7]. Oxy là cần thiết trong quá trình nuôi cấy nhân tạo nấm *C. militaris*, và ảnh hưởng của oxy đối với sự thoái hóa của nấm *C. militaris* vẫn cần được nghiên cứu thêm.

Trong quá trình nuôi cấy nhộng trùng thảo, số lượng các thể hệ nuôi cũng được xem là một yếu tố quan trọng khác ảnh hưởng đến sự thoái hóa giống. Các nghiên cứu gần đây cho thấy nấm *C. militaris* bắt đầu có hiện tượng thoái hóa khi cấy chuyển đến thế hệ thứ ba. Ở một số trường hợp nghiêm trọng, thể quả của nấm nhộng trùng thảo bắt đầu xuất hiện không hoàn chỉnh ở thế hệ thứ tư, và thế hệ thứ năm hoàn toàn mất khả năng tạo thể quả [57]. Ngoài ra, ảnh hưởng của nhiệt độ và môi trường nuôi cấy đến sự thoái hóa của nấm *C. militaris* trong quá trình cấy chuyển cũng cần được tiếp tục nghiên cứu.

#### **1.4.2.2. Sự biến đổi di truyền ảnh hưởng đến sự thoái hóa của nấm nhộng trùng thảo (*C. militaris*)**

Nền tảng di truyền của *C. militaris* được coi là yếu tố quyết định cho sự phát triển bình thường của thể quả. Do đó, sự biến đổi di truyền là nguyên nhân gốc rễ của sự thoái hóa *C. militaris* [19, 62-63]. Hơn nữa, các nghiên cứu trước đây đã xác nhận rằng sự biến thiên di truyền của *C. militaris* không có tương quan với nguồn gốc địa lý [64].

Các nghiên cứu cũng cho thấy mức độ khác biệt trong gen của nấm *C. militaris* tự nhiên và dòng thoái hóa. Trong đó, dòng thoái hóa có tần số đột biến cao hơn so với các chủng tự nhiên. Điều quan trọng là, cơ chế thoái hóa của nấm *C. militaris* có liên quan đến các gen liên quan đến sinh tổng hợp độc tố, chuyển hóa năng lượng, methyl hóa DNA và tái cấu trúc nhiễm sắc thể [57]. Bằng cách so sánh và phân tích trình tự DNA giữa các chủng bình thường và các chủng thoái hóa của nấm *C. militaris*, các nghiên cứu thấy rằng vùng ITS1 + 5,8S + ITS2 và 28S của các chủng bình thường và các chủng thoái hóa là hoàn toàn giống nhau nhưng vùng 18S của chủng thoái hóa có chứa bảy đột biến điểm. So với dòng nấm *C. militaris* bình thường, dòng thoái hóa bị mất đoạn vùng *MAT 1-2-1*, ba đột biến điểm trong vùng *MAT 1-1-1* và đột biến điểm trong vùng *MAT 1-1-2*. Phân tích Real-time PCR xác nhận rằng gen *MAT 1-2-1* đã mất trong các dòng thoái hóa. Mức độ biểu hiện của gen *MAT 1-1-1* và *MAT 1-1-2*

được điều chỉnh giảm đáng kể ở dòng thoái hóa so với dòng bình thường. Do đó, các đột biến ở vùng 18S và MAT, cũng như sự điều hòa của gen MAT, có thể là nguyên nhân gây ra sự thoái hóa của nấm *C. militaris* [65]. Dựa trên những phát hiện trên, có thể khẳng định rằng DNA hệ gen đã bị đột biến sau khi nấm *C. militaris* thoái hóa và mức độ biểu hiện của một số gen đã thay đổi. Tuy nhiên, mối quan hệ giữa các vị trí đột biến và sự thoái hóa của nấm *C. militaris* cần được nghiên cứu thêm.

Gần đây, nhóm tác giả Vũ Xuân Tạo và cộng sự [73] đã nghiên cứu thành phần gen giới tính MAT của 8 chủng nấm dược liệu *cordyceps* đang được nuôi trồng tại Việt Nam. Cả 8 chủng nấm nghiên cứu đều được định danh dựa trên đặc điểm hình thái, trình tự vùng ITS của rDNA và xác định gen giới tính *MAT 1-1-1* và *MAT 1-2-1*. Kết quả thu được cho biết, ở trong 5 chủng nấm QN6, HL11, HL12, TN01 và TN02 đều thấy xuất hiện cả 2 gen giới tính *MAT 1-1-1* và *MAT 1-2-1*. Còn ở 3 chủng nấm SH03, HL13 và HN01 chỉ thấy xuất hiện gen giới tính *MAT 1-1-1*. Tuy nhiên, nghiên cứu cũng cho biết cả 8 chủng nấm nghiên cứu đều có khả năng hình thành quả thể.

Ngoài những lý do gây ra việc thoái hóa giống của nấm *C. militaris* nêu trên, một số nghiên cứu cũng chỉ ra rằng sự thoái hóa của nấm *C. militaris* có thể được gây ra bởi việc ức chế hoặc thay đổi cân bằng tổng hợp các chất chuyển hóa liên quan đến điều hòa trao đổi chất [19]. Mặc dù có nhiều nguyên nhân dẫn đến sự thoái hóa của nấm *C. militaris* và quá trình thoái hóa diễn ra rất phức tạp, những phát hiện trên sẽ giúp chúng ta hiểu được cơ chế thoái hóa của nấm *C. militaris* và là cơ sở cho công tác nghiên cứu chống thoái hóa giống nhộng trùng thảo trong quá trình sản xuất.

## CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. ĐỐI TƯỢNG VÀ NGUYÊN VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU

#### 2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

Chủng nấm *C. militaris* S1 thương mại được sưu tầm và lưu giữ tại phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam được sử dụng làm nguyên liệu cho thí nghiệm.

#### 2.1.2. Nguyên vật liệu nghiên cứu

**Hóa chất:** Các môi trường được sử dụng trong quá trình nuôi *C. militaris* S1 bao gồm: Sabouraud dextrose agar plus yeast extract (SDAY) đặc, SDAY lỏng, Potato dextrose agar (PDA), môi trường cơ chất.

Đệm CTAB, đệm TE, marker 1kb, lysozyme, SDS, proteinase K, natri clorua (NaCl), hỗn hợp clorofrom: isoamylacohol (CI, 24: 1), isopropanol, ethanol, dextro, agar bacteriological, peptone, yeast extract (cao nấm men), magie sulphat (MgSO<sub>4</sub>), potassium phosphate monobasic (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), glucose, thiamin B<sub>1</sub> và các hóa chất thông thường khác... .

**Thiết bị:** Box cấy chuyên dụng, nồi hấp khử trùng, cân phân tích, tủ sấy, máy lắc, ống fancel, đĩa petri, máy PCR, bể điện di, máy chụp ảnh bản gel... và các dụng cụ máy móc khác tại phòng Công nghệ tế bào thực vật.

**Máy móc:** Máy PCR System 9700 (Applied Biosystem), máy điện di EPS300 (Thụy Điển), máy chụp gel (Clever scientific, Vương quốc Anh), máy Vortex (Mimishaker, IKA, Đức), máy ly tâm, máy lắc, bể ủ (Memmert, Đức), máy nghiền mẫu, cùng các loại máy móc khác của Phòng thí nghiệm Công nghệ Tế bào Thực vật.

### 2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 2.2.1. Nuôi cấy nấm nhộng trùng thảo

Chủng nấm nhộng trùng thảo thương mại *C. militaris* S1 được sưu tầm, lưu giữ trên môi trường giữ giống và đặt trong kho bảo quản chuyên dụng của Viện Công nghệ Sinh học trong điều kiện tối và nhiệt độ là 4°C.

***Nhân giống cấp 1:***

Môi trường nhân giống cấp 1: Môi trường SDAY đặc.

Chủng giống gốc *C. militaris* được bảo quản và lưu giữ ở 4°C trên môi trường giữ giống được nuôi cấy lên đĩa môi trường nhân giống cấp 1 SDAY đặc có thành phần gồm: cao nấm men, peptone, MgSO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, agar, glucose. Đĩa nuôi cấy được đặt trong tối ở 20°C – 22°C trong 1 tuần và sau đó được chuyển ra nuôi ở điều kiện chiếu sáng liên tục trong 2 tuần. Mảnh môi trường đặc mang thể sợi đang sinh trưởng mạnh trên đĩa giống cấp 1 được tách ra và sử dụng làm nguyên liệu cho nuôi sinh khối lỏng phục vụ cho nhân giống cấp 2.

***Nhân giống cấp 2:***

Môi trường nhân giống cấp 2: Sử dụng đĩa chủng nấm được nuôi trên môi trường nhân giống cấp 1 được 3 tuần nuôi để làm nguyên liệu cho nuôi giống cấp 2. Dùng dao cấy cắt mảnh môi trường đặc có chứa các sợi nấm có kích thước (0,5 cm x 0,5 cm) có chứa hệ sợi nấm đang ở giai đoạn sinh trưởng mạnh và chuyển vào bình tam giác có chứa môi trường SDAY lỏng (thành phần gồm có: peptone, cao nấm men, MgSO<sub>4</sub>, glucose KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), để nhân sinh khối nấm [74]. Bình mẫu được nuôi lắc ở tốc độ 150 vòng/ phút trong điều kiện tối với nhiệt độ 22°C. Sau 5-7 ngày, dung dịch giống cấp 2 được sử dụng để cấy chuyển vào môi trường giá thể để cho việc hình thành mầm và phát triển quả thể.

***Nuôi cấy tạo quả thể nấm:***

*Cấy nấm:* Dịch nấm nuôi lắc sau 5 - 7 ngày sử dụng cho nuôi tạo quả thể. Dịch thể nấm được pha loãng và phun trên môi trường giá thể (gạo lứt, nhộng tằm...)

*Tạo hệ sợi:* sau khi dịch nấm được cấy lên môi trường cơ chất được tạo sợi trong tối ở điều kiện 22°C thời gian từ 7 - 12 ngày.

*Tạo quả thể nấm:* Thời gian kéo dài 45 - 60 ngày, nuôi cấy trong điều kiện phòng nuôi 20°C - 22°C độ ẩm 75% - 80%, cường độ ánh sáng 900 - 1200 lux thời gian chiếu sáng 14 giờ.

**2.2.2. Đánh giá hình thái sinh trưởng, phát triển của nấm trên môi trường cơ chất tạo quả thể**

Thí nghiệm được cải tiến, bố trí sắp xếp và thực hiện theo phương pháp của Wen và cộng sự 2012 [68]. Thành phần môi trường nuôi cấy trong thí

thí nghiệm là môi trường hạt gồm: gạo (50%), bột nhộng tằm (25%), khoai tây (15%), bột đậu tương (10%), nước dừa (10%) và thành phần khoáng bổ trợ ( $MgSO_4 + KH_2PO_4 +$  Thiamin B1+ đường glucose). Môi trường nuôi cấy được cho vào các hộp nhựa chịu nhiệt có kích thước là 9x9x9cm và được khử trùng ở 121°C thời gian kéo dài trong 15 phút. Sau đó, các hộp môi trường nuôi được cấy giống cấp 2 (giống dạng dịch thể) với lượng giống từ (3-5 ml/ hộp nuôi). Các hộp nuôi sau khi được phun cấy nguyên liệu giống cấp 2 của chủng nấm, sẽ được nuôi trong điều kiện tối hoàn toàn, ở nhiệt độ 22°C để tạo hệ sợi. Sau khi hệ sợi phát triển kín toàn bộ hộp nuôi thì sẽ được chuyển ra nuôi ở phòng sáng có cường độ từ 500 - 1200 lux, nhiệt độ 20°C - 22°C, độ ẩm 70 - 90%, thời gian chiếu sáng là 14/10h (sáng/tối), trong khoảng từ 2 - 2,5 tháng.

Các công thức thí nghiệm với thành phần môi trường cơ chất cơ bản như trên và được thay đổi nồng độ khoáng vô cơ ( $KH_2PO_4$ ,  $MgSO_4$ ) (**Bảng 2.1**) ở các ngưỡng 1; ½; ¼; 0 nồng độ tiêu chuẩn và bổ sung thêm dinh dưỡng hữu cơ (chuối, đậu xanh, đậu đen...).

**Bảng 2.1.** Nồng độ khoáng bổ sung vào các công thức thí nghiệm

<b>Thành phần khoáng</b>	<b>CT1</b>	<b>CT2</b>	<b>CT3</b>	<b>CT4</b>	<b>CT5</b>
$KH_2PO_4$ g/l	1X	0,5X	0,25X	0	50g chuối xanh
$MgSO_4$ g/l	1X	0,5X	0,25X	0	50g đậu xanh

### 2.2.3. Phân tích chất lượng của quả thể nấm

Quả thể nấm nhộng trùng thảo thu được trên các công thức môi trường cơ chất được sấy thăng hoa theo phương pháp của Thitiphan Chimsook 2018 [69]. Sau đó quả thể được sử dụng để định lượng hoạt chất cordycepin và adenosine. Việc phân tích được thực hiện tại Viện kiểm nghiệm vệ sinh an toàn thực phẩm, theo phương pháp NIFC.0.5.M.163 (HPLC) [25]

### 2.2.4. Phân lập và phát triển các dòng bào tử đơn

Bào tử đơn được phân lập từ quả thể nấm nhộng trùng thảo trên các công thức môi trường cơ chất có thay đổi về thành phần khoáng dựa theo phương pháp của Kang và nhóm nghiên cứu 2017 [54]. Cụ thể, cắt phần trên cùng của

quả thể có kích thước từ (1,5 cm – 2,5 cm) có chứa các túi sinh bào tử từ trên đỉnh quả thể gắn vào mặt bên trong của đĩa petri chứa nước cất và 2% agar (WA). Các đĩa môi trường sau khi được gắn quả thể được nuôi cấy trong điều kiện chiếu sáng để kích thích các bào tử phát tán và nảy mầm, thời gian nuôi kéo dài 5 ngày sẽ thu bào tử đơn để cấy trên môi trường nhân giống. Hệ sợi phát triển từ các bào tử đơn được phân lập và nuôi cấy trong 50 ml môi trường Potato Dextrose Broth (PDB).

### 2.2.5. Phân tích tỷ lệ, thành phần và sự biến đổi gen MAT

#### *Tách chiết DNA tổng số từ hệ sợi nấm*

Các đơn bào tử được nuôi cấy trên môi trường đặc PDA (Potato Dextrose Agar). Hệ sợi nấm nhộng trùng thảo trong giai đoạn sinh trưởng sinh dưỡng được thu thập trên những đĩa môi trường giữ giống và sử dụng làm nguyên liệu cho tách chiết DNA tổng số theo phương pháp CTAB [70] có cải tiến.

#### *Khuếch đại gen MAT trong các dòng bào tử đơn*

DNA tổng số đã được tách chiết được sử dụng để làm khuôn cho phản ứng PCR. Phản ứng PCR được thực hiện với các cặp mồi đặc hiệu ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') và ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATG C-3') [78]. Sản phẩm PCR được tinh sạch và dùng cho giải trình tự theo phương pháp Sanger với các hệ thống máy đọc tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

**Bảng 2.2. Thành phần một phản ứng nhân dòng gen (PCR)**

Thành phần	H <sub>2</sub> O	Mix 2X	Môi xuôi	Môi ngược	DNA khuôn	Tổng thể tích (μl)
Thể tích (μl)	8,0	8,0	1,0	1,0	2,0	20

Các cặp mồi cho các gen *MAT* được thiết kế dựa trên trình tự đã được công bố trong các nghiên cứu của Chen và cộng sự 2017; Kang và cộng sự 2017 [54,57] và sử dụng để khuếch đại các phân đoạn gen *MAT* trong bào tử nấm thu được từ các công thức thí nghiệm.

Các cặp mồi sử dụng trong phản ứng PCR bao gồm:

MAT1-1-1-F; (5'-ATGGAACACAGATCGAGCGACAC-3');

MAT1-1-1-R (5'-ATATACCTTCGCGATCATTGCCAG-3');

MAT1-1-2-F (5'-TTCAGCTTCAGTCCGTTCTGGACA-3');

MAT1-1-2-R (5'-GGCAGACATCGTACCTGGTCAAAT-3');

MAT1-2-1-F (5'-TGTTTTGTTCGCGATGGTTCTGG-3');

MAT1-2-1R (5'-CCTCTGGAGGTTCTGCATTCCA-3').

Phản ứng PCR được thực hiện sử dụng DreamTaq Green PCR Master Mix (Cat. No. K1081 - Thermo Scientific), với chu trình nhiệt (94°C - 30 giây; 55°C - 30 giây; 72°C - 60 giây) với số chu trình là 35 vòng. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 1% và chụp ảnh dưới hệ máy chụp hình với hệ thống ánh sáng UV.

#### **2.2.6. Phương pháp thống kê và xử lý số liệu**

Các thí nghiệm được lặp lại ít nhất 3 lần, số liệu được tổng hợp và xử lý bằng chương trình Anova trên phần mềm Microsoft Excel 2010, mức ý nghĩa thống kê ở ngưỡng  $P < 0,05$ .



### CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. ẢNH HƯỞNG CỦA HÀM LƯỢNG KHOÁNG TỚI HÌNH THÁI, SINH TRƯỞNG VÀ PHÁT TRIỂN CỦA CHỦNG NẤM *CORDYCEPS MILITARIS* S1

##### 3.1.1. Xác định thông tin di truyền của chủng nấm *Cordyceps militaris* S1

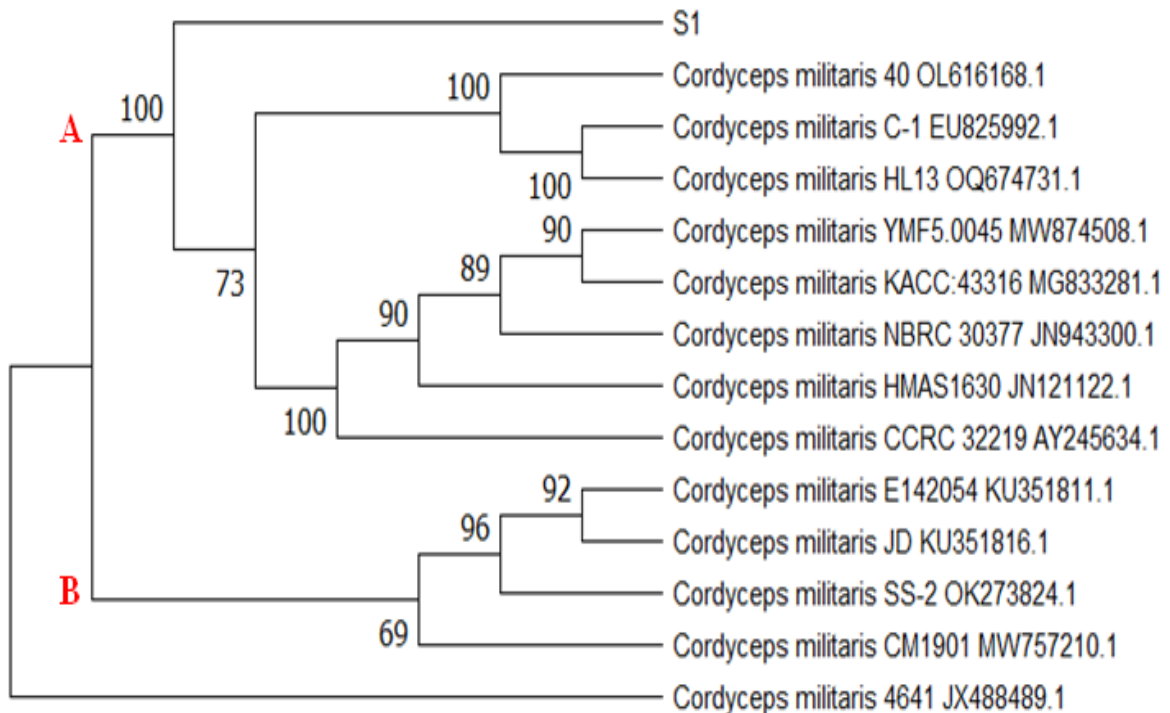
##### 3.1.1.1. Phân tích trình tự ITS chủng nấm *Cordyceps militaris* S1

Để đảm bảo độ tin cậy của chủng nấm dùng trong nghiên cứu, chúng tôi tiến hành kiểm tra, định danh trước khi tiến hành các thí nghiệm tiếp theo. Chủng *Cordyceps militaris* S1 được phân lập các dòng bào tử đơn, các dòng đơn bào được nuôi cấy trên môi trường đặc PDA (Potato Dextrose Agar). Sợi nấm trong giai đoạn phát triển sinh dưỡng được thu thập trên các đĩa môi trường PDA và sử dụng làm nguyên liệu cho tách chiết DNA tổng số theo phương pháp CTAB (Dolye 1991) [70]. DNA tổng số được sử dụng để nhân bản gen ITS của chủng nấm *Cordyceps militaris* S1. Sản phẩm PCR sau đó được tinh sạch và dùng để giải trình tự theo phương pháp Sanger. Trình tự ITS của chủng nấm S1 được dùng để tìm kiếm và so sánh với các chủng nấm cùng loài đã được công bố trước đây thông qua công cụ BLAST trên nguồn dữ liệu mở NCBI.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Cordyceps militaris 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA...	<a href="#">Cordyceps militaris</a>	952	952	99%	0.0	99.43%	570	<a href="#">MK209600.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Cordyceps militaris isolate 49 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 a...	<a href="#">Cordyceps militaris</a>	952	952	99%	0.0	99.43%	540	<a href="#">OL616168.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Cordyceps militaris isolate 40 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 a...	<a href="#">Cordyceps militaris</a>	952	952	99%	0.0	99.43%	540	<a href="#">OL616160.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Cordyceps militaris strain 14 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5...	<a href="#">Cordyceps militaris</a>	952	952	99%	0.0	99.43%	570	<a href="#">MT875255.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Cordyceps militaris strain C-1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribos...	<a href="#">Cordyceps militaris</a>	952	952	99%	0.0	99.43%	570	<a href="#">EU825992.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Cordyceps militaris 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA...	<a href="#">Cordyceps militaris</a>	952	952	99%	0.0	99.43%	556	<a href="#">AF368807.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Cordyceps militaris strain M150613 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8...	<a href="#">Cordyceps militaris</a>	950	950	99%	0.0	99.43%	573	<a href="#">KU351817.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Cordyceps militaris strain I140012 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S...	<a href="#">Cordyceps militaris</a>	950	950	99%	0.0	99.43%	555	<a href="#">KU351815.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Cordyceps militaris voucher 15006 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spac...	<a href="#">Cordyceps militaris</a>	950	950	99%	0.0	99.43%	568	<a href="#">ON553385.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Cordyceps militaris voucher 15001 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spac...	<a href="#">Cordyceps militaris</a>	950	950	99%	0.0	99.43%	568	<a href="#">ON553382.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Cordyceps taishanensis strain A-1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S...	<a href="#">Cordyceps taisha...</a>	950	950	99%	0.0	99.43%	567	<a href="#">FJ008927.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Cordyceps taishanensis 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal...	<a href="#">Cordyceps taisha...</a>	950	950	99%	0.0	99.43%	4496	<a href="#">JN411084.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Cordyceps militaris strain C-8 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribos...	<a href="#">Cordyceps militaris</a>	950	950	99%	0.0	99.43%	572	<a href="#">EU825999.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Cordyceps militaris strain C-7 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribos...	<a href="#">Cordyceps militaris</a>	950	950	99%	0.0	99.43%	572	<a href="#">EU825998.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Cordyceps militaris strain C-5 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribos...	<a href="#">Cordyceps militaris</a>	950	950	99%	0.0	99.43%	576	<a href="#">EU825996.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Cordyceps militaris strain C-4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribos...	<a href="#">Cordyceps militaris</a>	950	950	99%	0.0	99.43%	574	<a href="#">EU825995.1</a>

**Hình 3.1.** Kết quả tìm kiếm và so sánh trình tự ITS của chủng *Cordyceps militaris* S1 bằng công cụ BLAST trên NCBI.

Vùng *ITS1* (với kích thước khoảng 0,5kb) nằm trên gen mã hóa tiểu phần 18S RNA được khuếch đại và giải trình tự (**Phụ lục 1**). Kết quả so sánh trên ngân hàng gen NCBI thu được cho thấy, của trình tự ITS1 của chủng nhộng trùng thảo S1 có độ tương đồng cao với các chủng nấm đã nghiên cứu thuộc loài nhộng trùng thảo có tên khoa học là *Cordyceps militaris* (**Hình 3.1**). Trong đó, độ che phủ trình tự lên đến 99%, độ tương đồng trình tự là 99,43%, giá trị E-value đạt thấp (0.0).



**Hình 3.2.** Cây phát sinh chủng loại của 14 dòng nấm nhộng trùng thảo dựa trên trình tự ITS1

Tiếp theo, chúng tôi lựa chọn trình tự ITS1 của một số chủng nấm thuộc loài *Cordyceps militaris* đã được công bố trên nguồn dữ liệu mở NCBI cùng với trình tự này của chủng S1 để tiến hành dựng cây phát sinh chủng loại (**Hình 3.2**). Kết quả cho thấy, các chủng nấm phân tích được chia thành 2 nhóm chính:

Nhóm A gồm 9 chủng *Cordyceps militaris* 40; *Cordyceps militaris* C-1; *Cordyceps militaris* HL13; *Cordyceps militaris* YMF5.0045; *Cordyceps militaris* KACC:43316; *Cordyceps militaris* NBRC30377; *Cordyceps militaris* CCRC 32219; *Cordyceps militaris* HMAS1630 và dòng *Cordyceps militaris* S1.

Nhóm B gồm 4 chủng *Cordyceps militaris* SS-2; *Cordyceps militaris* JD; *Cordyceps militaris* E142054 và *Cordyceps militaris* CM1901. Ngoài ra, chủng *Cordyceps militaris* 4641 có độ tương đồng thấp so với các chủng còn lại và được chia thành một nhóm riêng.

Kết quả phân tích này khẳng định chủng S1 thuộc loài nấm nhộng trùng thảo *Cordyceps militaris*, đảm bảo tính an toàn và khả thi để tiến hành các nghiên cứu và phân tích tiếp theo.

### 3.1.1.2. Thành phần và tỷ lệ gen MAT của chủng nấm *Cordyceps militaris* S1

Như đã trình bày trên phần tổng quan, tỷ lệ và thành phần gen MAT là tiêu chí quan trọng để đánh giá khả năng thoái hóa giống nhộng trùng thảo. Do vậy, chúng tôi tiến hành phân tích tiêu chí này của chủng nấm S1. Tổng số 32 bào tử đơn được lựa chọn ngẫu nhiên và DNA tổng số được tách chiết. Quá trình PCR được thực hiện với các mồi đặc hiệu *MAT1-1-1*, *MAT1-1-2* và *MAT1-2-1*, kết quả được trình bày trên **Bảng 3.1**.

**Bảng 3.1.** Tỷ lệ và thành phần gen MAT của chủng nấm *Cordyceps militaris* S1

Chủng (số Clony)	Bào tử có gen MAT 1-1-1	Bào tử có gen MAT 1-1-2	Bào tử có gen MAT 1-2-1	Tỷ lệ bào tử mang gen MAT
S1(32)	2 ± 0,55	20 ± 0,71	0	68,75 ± 2,61

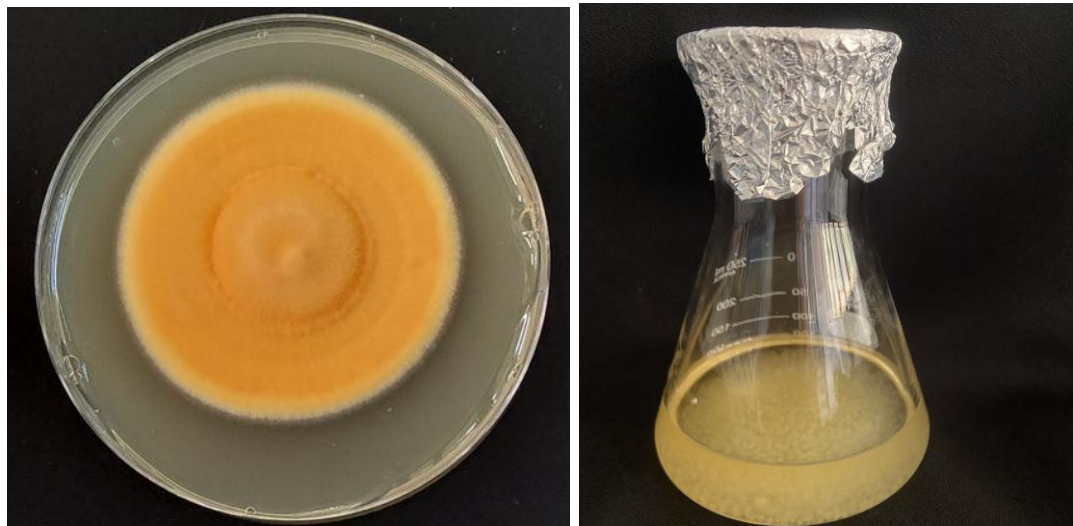
Kết quả ở **Bảng 3.1** cho thấy, ở các bào tử của chủng nấm *C. militaris* S1 chúng tôi ghi nhận sự có mặt sản phẩm khuếch đại của gen MAT 1-1 bao gồm hai gen *MAT1-1-1* và *MAT1-1-2*. Trong đó, số bào tử mang gen *MAT1-1-1* chiếm 6,25% và tỷ lệ bào tử mang gen *MAT1-1-2* là 62,5%. Tuy nhiên, chúng tôi không ghi nhận sự có mặt của gen *MAT 1-2-1* trên các dòng bào tử của chủng nấm nghiên cứu. Tính trên tổng số bào tử được phân tích, tỷ lệ gen MAT có được trong chủng S1 đạt 68,75%.

Trong nghiên cứu của Vũ Xuân Tạo và cộng sự (2022) [66], 3/8 chủng nấm nhộng trùng thảo của Việt Nam được phân tích chỉ mang gen *MAT1-1-1*,

các chủng này đều có khả năng sinh trưởng và tạo quả thể tốt. Ở nghiên cứu này của chúng tôi, chủng *C. militaris* S1 mang cả 2 gen thuộc nhóm MAT1-1 (*MAT1-1-1* và *MAT1-1-2*). Cùng với kết quả nghiên cứu trước đây, kết quả của chúng tôi tiếp tục cho thấy sự biến động về thành phần gen MAT trong các chủng nấm nhộng trùng thảo ở Việt Nam. Sự có mặt của nhóm gen MAT1-1 là cơ sở để chúng tôi tiến hành phân tích sinh trưởng và đặc điểm hình thái của chủng nấm S1 ở các nội dung nghiên cứu tiếp theo.

### 3.1.2. Sự sinh trưởng hệ sợi của chủng nấm *Cordyceps militaris* S1 trong giai đoạn ủ tối

Chủng giống gốc *C. militaris* S1 được bảo quản và lưu giữ ở 4°C trên môi trường giữ giống sau đó được nuôi cấy lên đĩa môi trường nhân giống cấp 1. Đĩa nuôi giống cấp 1 được đặt trong điều kiện tối ở nhiệt độ 20 - 22°C trong 7 ngày, sau đó được chuyển ra điều kiện ánh sáng liên tục trong 15 ngày (**Hình 3.3A**). Phân mảnh môi trường (kích thước 0,5 cm x 0,5 cm) với hệ sợi nấm đang sinh trưởng mạnh được cắt từ đĩa nuôi giống cấp 1 và chuyển sang môi trường nuôi lỏng tăng sinh khối (nhân giống cấp 2) (**Hình 3.3 B**). Dung dịch giống cấp 2 sau 5-7 ngày nuôi cấy được sử dụng làm nguyên liệu cho cấy giống trên môi trường cơ chất để hình thành mầm và phát triển quả thể.

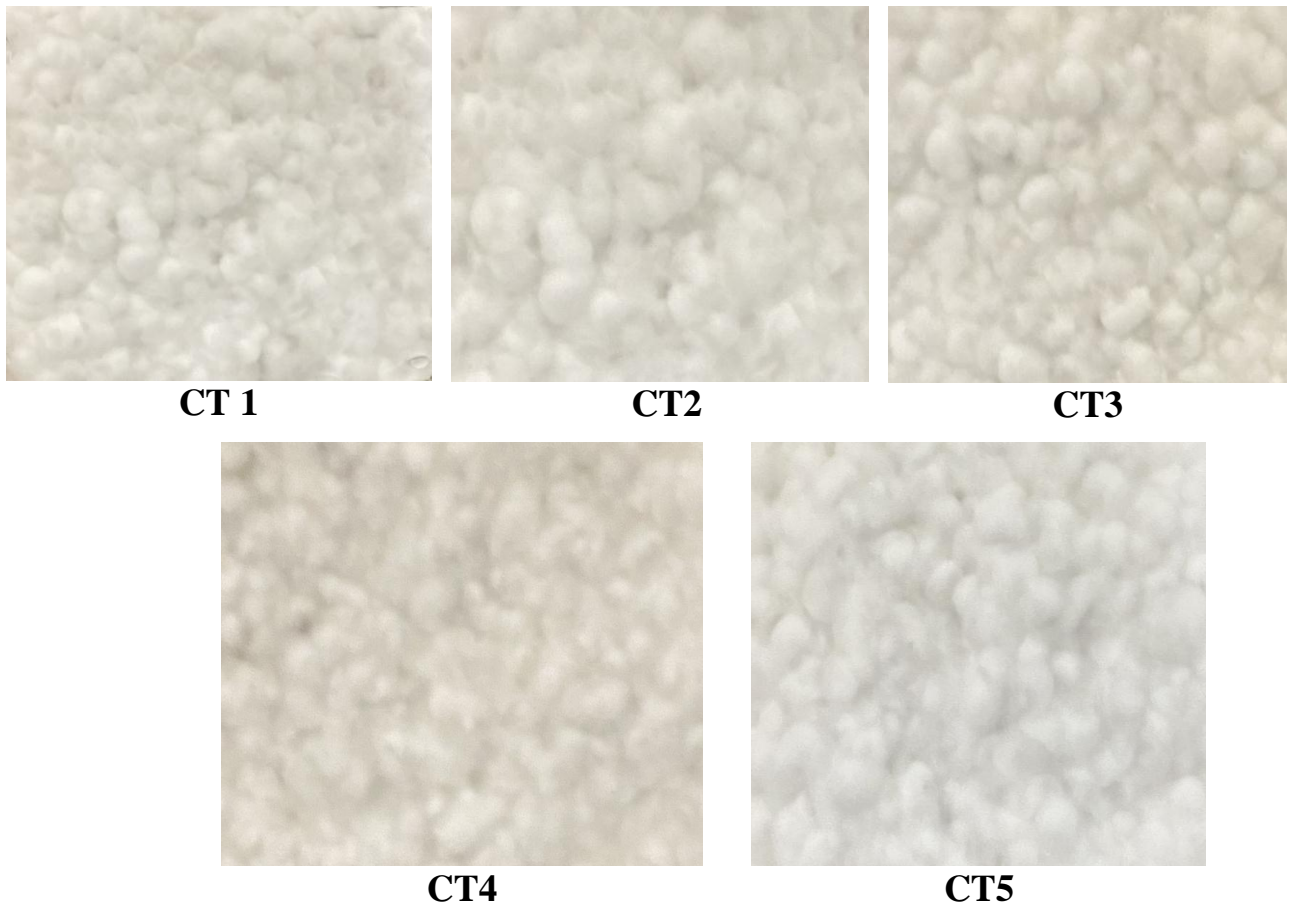


**A**

**B**

**Hình 3.3.** Nhân giống dịch thể cấp 2 chủng nấm *C. militaris* S1

**A.** Hệ sợi nấm nhộng trùng thảo trên môi trường nhân giống cấp 1 sau 15 ngày nuôi cấy; **B.** dung dịch giống cấp 2 sau 7 ngày nuôi cấy.



**Hình 3.4.** Hình thái hệ sợi chủng nấm *Cordyceps militaris* S1 trên môi trường cơ chất;  
**CT1:** Công thức 1- bổ sung nguồn khoáng vô cơ  $KH_2PO_4$ ,  $MgSO_4$  ở nồng độ 1g/L;  
**CT2:** Công thức 2 - bổ sung nguồn khoáng vô cơ  $KH_2PO_4$ ,  $MgSO_4$  ở nồng độ 0.5g/L;  
**CT3:** Công thức 3 - bổ sung nguồn khoáng vô cơ  $KH_2PO_4$ ,  $MgSO_4$  ở nồng độ 0.25g/L;  
**CT4:** Công thức 4 – không bổ sung nguồn khoáng vô cơ  $KH_2PO_4$ ,  $MgSO_4$ ; **CT5:** Công  
 thức 5 - bổ sung nguồn nguyên liệu hữu cơ chuối và đậu xanh ở nồng độ 50g/L.

Để đánh giá tác động của thành phần khoáng vô cơ và hữu cơ lên sinh trưởng của chủng nấm S1 trong giai đoạn phát triển hệ sợi, dịch nấm nuôi lác sau 5-7 ngày được sử dụng làm nguyên liệu cho nuôi tạo quả thể trên môi trường cơ chất với các công thức khoáng bổ sung khác nhau. Quá trình ủ tối và ươm sợi được kéo dài 7 - 9 ngày trong điều kiện nhiệt độ từ 20°C - 22°C. Kết quả thu được trên **Hình 3.4** và **Bảng 3.2**.

**Bảng 3.2.** Đặc điểm hình thái, sinh trưởng và phát triển hệ sợi của chủng *Cordyceps militaris* S1 trong giai đoạn ủ tối

Công thức thí nghiệm (CTTN)	Thời gian hệ sợi mọc kín cơ chất (ngày)	Đặc điểm sinh trưởng và phát triển
Công thức 1 (CT1)	6,00 ± 1,00 <sup>a</sup>	Hệ sợi mịn, tạo rãnh hệ sợi bông xốp, ăn lan xuống môi trường cơ chất.
Công thức 2 (CT2)	6,17 ± 0,29 <sup>a</sup>	Hệ sợi mịn bông xốp, tạo rãnh, hệ sợi ăn lan xuống môi trường cơ chất
Công thức 3 (CT3)	7,00 ± 1,00 <sup>a</sup>	Hệ sợi mịn, tạo rãnh hệ sợi bông xốp, ăn lan xuống môi trường cơ chất.
Công thức 4 (CT4)	6,17 ± 0,29 <sup>a</sup>	Hệ sợi mịn, tạo rãnh, hệ sợi bông xốp, ăn lan xuống môi trường cơ chất.
Công thức 5 (CT5)	6,67 ± 0,58 <sup>a</sup>	Hệ sợi mịn, tạo rãnh, hệ sợi bông xốp, ăn lan xuống môi trường cơ chất.

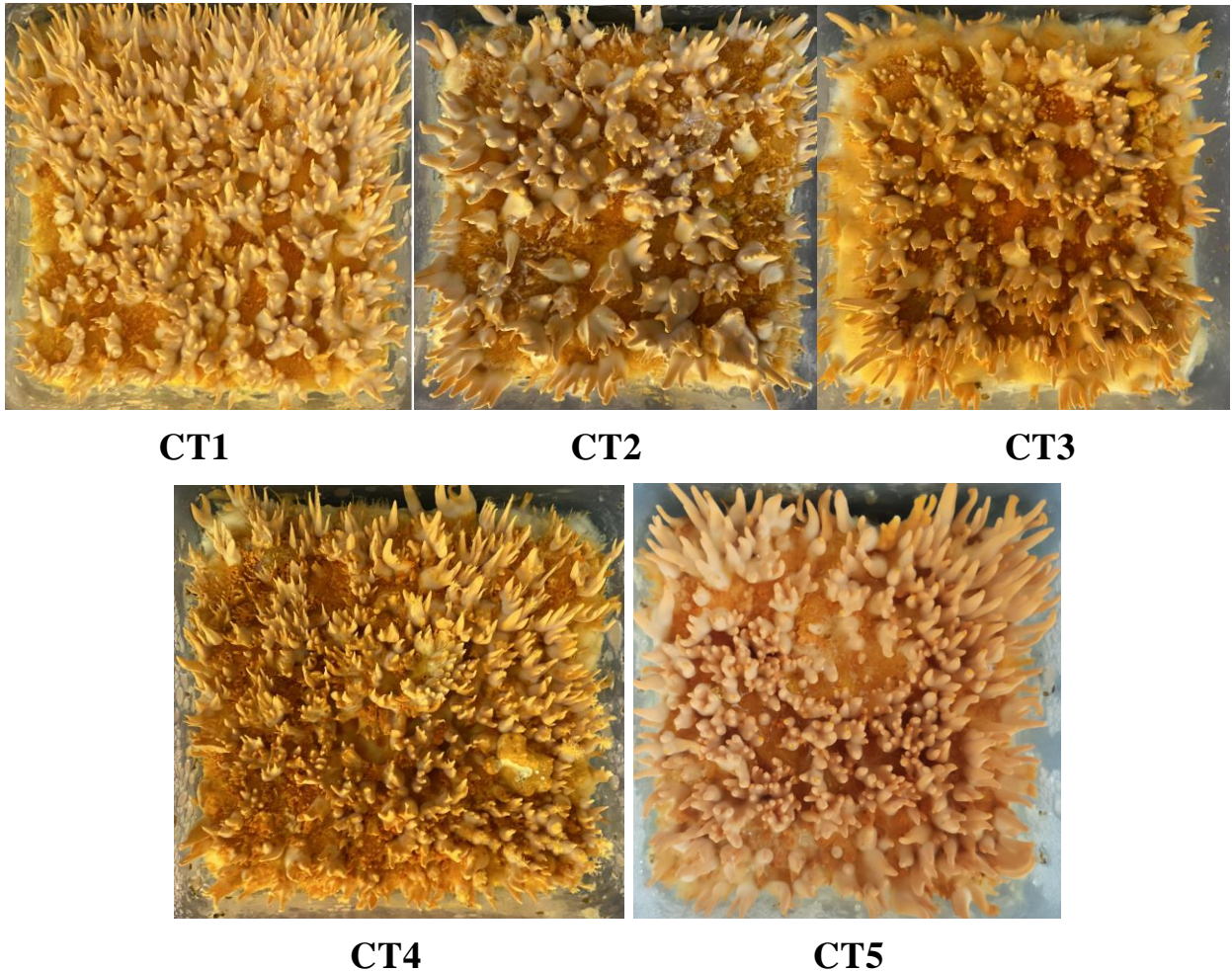
(các chữ cái khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa ở  $P < 0,05$ )

**Hình 3.4** và **Bảng 3.2** cho thấy trong giai đoạn ủ tối, hệ sợi sinh trưởng trên các công thức thí nghiệm không có sự khác biệt lớn. Hệ sợi nấm mọc ăn kín môi trường nuôi cấy trong thời gian là 6 -7 ngày nuôi, tốc độ sinh trưởng không có sự khác biệt, đặc điểm hình thái hệ sợi bông xốp và tạo rãnh, ở các công thức thí nghiệm là tương đương nhau.

Trong nghiên cứu của Nguyễn Thị Bích Hằng và cộng sự 2022 [72] về đặc điểm nuôi trồng nấm Nhộng trùng thảo trên cơ chất là bã đậu nành, thời gian phát triển hệ sợi mọc kín môi trường cơ chất trung bình là 10,30 ngày khi có bổ sung khoáng sớm hơn so với môi trường không bổ sung khoáng thời gian (11,30 ngày). Tuy nhiên, trong nghiên cứu của chúng tôi, thời gian mọc kín cơ chất ngắn hơn (từ 6-7 ngày), các công thức với tỷ lệ khoáng khác nhau không cho thấy sự khác biệt về khả năng sinh trưởng của hệ sợi trên môi trường cơ chất. Kết quả này có thể lý giải do sự khác biệt về chủng nấm nhộng trùng thảo trong nghiên cứu của hai nhóm.

Như vậy, ở giai đoạn phát triển hệ sợi, tỷ lệ khoáng bổ sung vào môi trường không cho thấy tác động rõ rệt đến tốc độ sinh trưởng chủng nấm *Cordyceps militaris* S1.

### 3.1.3. Sự sinh trưởng và tạo mầm quả thể của chủng nấm *Cordyceps militaris* S1 trong giai đoạn chiếu sáng



**Hình 3.5.** Đặc điểm hình thái mầm quả thể chủng nấm *Cordyceps militaris* S1

- CT1:** Công thức 1- bổ sung nguồn khoáng vô cơ  $KH_2PO_4$ ,  $MgSO_4$  ở nồng độ 1g/L;  
**CT2:** Công thức 2 - bổ sung nguồn khoáng vô cơ  $KH_2PO_4$ ,  $MgSO_4$  ở nồng độ 0,5g/L;  
**CT3:** Công thức 3 - bổ sung nguồn khoáng vô cơ  $KH_2PO_4$ ,  $MgSO_4$  ở nồng độ 0,25g/L;  
**CT4:** Công thức 4 – không bổ sung nguồn khoáng vô cơ  $KH_2PO_4$ ,  $MgSO_4$ ; **CT5:** Công thức 5 - bổ sung nguồn nguyên liệu hữu cơ chuối và đậu xanh ở nồng độ 50g/L.

Nhằm đánh giá tác động của thành phần môi trường khoáng tới sinh trưởng và khả năng tạo quả thể của chủng nấm *cordyceps militaris* S1, khi hệ sợi mọc phủ kín bề mặt cơ chất và ăn sâu xuống đáy hộp nuôi cấy, sau đó hộp nuôi cấy sẽ được mang ra nuôi trong điều kiện chiếu sáng để kích thích tạo mầm quả thể, thời gian nuôi cấy quả thể kéo dài 45 - 60 ngày, ở nhiệt độ 20°C - 22°C, độ ẩm từ 75% - 80%, thời gian chiếu sáng 14/10h (sáng/tối), cường độ ánh sáng từ 900 - 1200 lux. Kết quả ghi nhận trên **Hình 3.5** và **Bảng 3.3**.

**Bảng 3.3.** Đặc điểm hình thái, sinh trưởng và tạo mầm quả thể của chủng*Cordyceps militaris* S1

CTTN	Thời gian tạo mầm (ngày)	Số lượng mầm quả thể/hộp	Đặc điểm hình thái
CT1	11,83 ± 1,26 <sup>a</sup>	123,86±4,38 <sup>c</sup>	Mầm quả thể hình thành sau 10 -13 ngày đặt dưới điều chiếu sáng, mầm quả thể mọc thành cụm, đều và to, hướng quang mạnh.
CT2	14,33 ± 0,58 <sup>b</sup>	83,57±4,42 <sup>a</sup>	Mầm quả thể hình thành sau 13 -15 ngày nuôi cấy dưới điều kiện chiếu sáng, mầm mọc thành cụm, thưa, đều và to, hướng quang mạnh.
CT3	14,67 ± 0,58 <sup>b</sup>	97,1±7,43 <sup>b</sup>	Mầm quả thể hình thành sau 14 -15 ngày nuôi cấy dưới điều kiện chiếu sáng, mầm mọc thành cụm, dày, dưới chân cụm mầm có 1 lớp bông xốp và hướng quang mạnh.
CT4	15,17 ± 0,76 <sup>b</sup>	85,71±5,76 <sup>a</sup>	Mầm quả thể hình thành sau 14 -16 ngày nuôi cấy dưới điều kiện chiếu sáng, mầm mọc thành cụm, thưa, đều, xung quanh 4 bên có hệ sợi bông mịn và to, hướng quang mạnh.
CT5	14,33 ± 0,58 <sup>b</sup>	84,43±3,84 <sup>a</sup>	Mầm quả thể mọc rõ sau 12 -14 ngày nuôi cấy dưới điều kiện chiếu sáng, mầm mọc thành cụm, thưa, đều và to, hướng quang mạnh.

(các chữ cái khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa ở  $P < 0,05$ )

Theo kết quả ở **Hình 3.5**, **Bảng 3.3** và quan sát thực tế, khi đưa bình nuôi cấy từ giai đoạn ủ tối sang giai đoạn chiếu sáng, hệ sợi được chuyển từ màu trắng sang màu vàng cam sau 2 ngày và mầm quả thể bắt đầu xuất hiện rõ rệt ở ngày thứ 11. Mầm quả thể ở các công thức thí nghiệm mọc đều và hướng quang mạnh. Mầm quả thể ở công thức CT1 xuất hiện sớm nhất là 11 ngày, ở các công thức khác mầm quả thể cũng xuất hiện rõ ràng sau 15 ngày nuôi cấy. Mầm quả thể ở công thức CT2 và công thức CT4 to và mập hơn ở các công thức CT1, CT3. Nhưng ở công thức CT1 và CT3 thì số lượng mầm quả thể mọc dày hơn.



Số lượng mầm quả thể ở công thức CT1 nhiều nhất là 123,86 mầm/hộp. Kích thước mầm quả thể từ 0,2 – 0,4 cm. Tỷ lệ tạo mầm ở công thức CT1 là 100%, ở công thức CT2 là 90%, ở công thức CT3 là 80%, ở công thức CT4 là 75% và ở công thức CT5 là 90%.

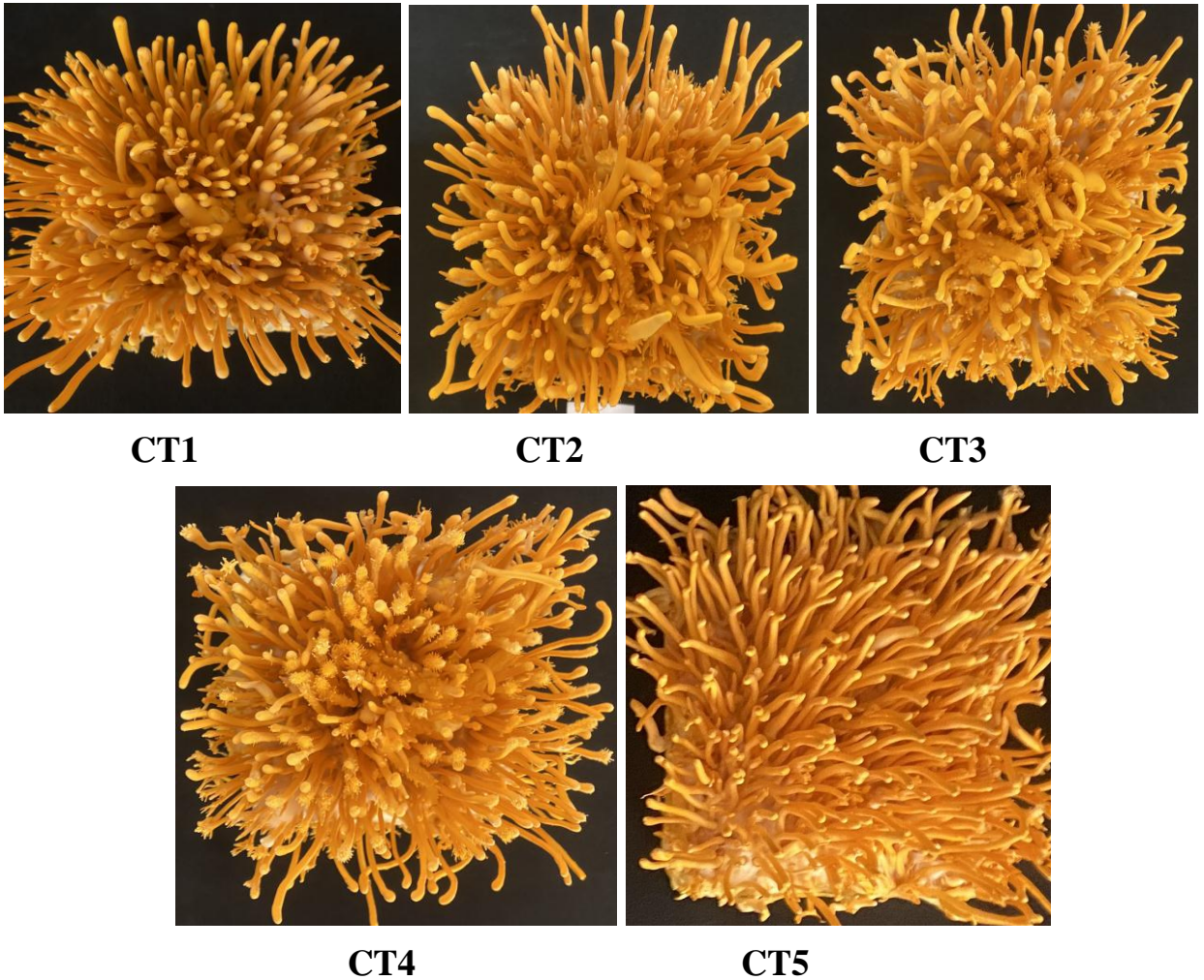
Như vậy, tỷ lệ khoáng trong môi trường nuôi cấy ở các công thức thí nghiệm có ảnh hưởng đến tốc độ nảy mầm của chủng *C. militaris* S1. Ở nồng độ khoáng cao công thức (CT1), mầm quả thể xuất hiện sớm nhất (11,83 ngày). Thời gian nảy mầm tăng lên khi nồng độ khoáng vô cơ giảm xuống ở trường cơ chất. Ở công thức CT5 nguồn khoáng vô cơ được thay thế bằng nguồn nguyên liệu hữu cơ, thời gian tạo mầm quả thể tương đương với công thức sử dụng ½ nồng độ khoáng nhưng chậm hơn so với công thức CT1. Bên cạnh đó số lượng mầm quả thể ở công thức có nồng độ khoáng vô cơ cao (CT1) cho thấy cũng cao hơn ở các công thức môi trường còn lại. Ở công thức thay thế khoáng vô cơ bằng nguồn nguyên liệu hữu cơ (CT5), số lượng mầm quả thể có thấp hơn hai công thức CT1 và CT3 nhưng tương đương với công thức CT2 (1/2 khoáng vô cơ).

Như vậy, tỷ lệ khoáng vô cơ có ảnh hưởng tới khả năng hình thành và phát triển của quả thể nấm nhộng trùng thảo trên môi trường cơ chất. Tuy nhiên, mối tương quan giữa tỷ lệ khoáng vô cơ bổ sung vào môi trường nuôi cấy và số lượng quả thể tạo được còn chưa rõ rệt.

Ngoài ra, kết quả nghiên cứu bước đầu cho thấy có thể sử dụng hoàn toàn nguồn nguyên liệu hữu cơ thay thế khoáng vô cơ trong nuôi cấy tạo mầm quả thể chủng nấm *Cordyceps militaris* S1.

#### **3.1.4. Sự sinh trưởng và phát triển của chủng nấm *Cordyceps militaris* S1 trong giai đoạn tạo quả thể**

Nhằm đánh giá ảnh hưởng của thành phần khoáng vô cơ trong môi trường giá thể tới hiệu quả nuôi cấy nấm nhộng trùng thảo, hình thái, kích thước và khối lượng quả thể được theo dõi và đánh giá ở giai đoạn 7 - 9 tuần tiếp theo kể từ khi mầm quả thể xuất hiện. Kết quả thu được thể hiện trên **Hình 3.6** và **Bảng 3.4**.



**Hình 3.6.** Hình thái quả thể chủng nấm *Cordyceps militaris* S1 sau 60 ngày nuôi cấy;  
**CT1:** Công thức 1- bổ sung nguồn khoáng vô cơ  $KH_2PO_4$ ,  $MgSO_4$  ở nồng độ  $1g/L$ ;  
**CT2:** Công thức 2 - bổ sung nguồn khoáng vô cơ  $KH_2PO_4$ ,  $MgSO_4$  ở nồng độ  $0,5g/L$ ;  
**CT3:** Công thức 3 - bổ sung nguồn khoáng vô cơ  $KH_2PO_4$ ,  $MgSO_4$  ở nồng độ  $0,25g/L$ ;  
**CT4:** Công thức 4 - không bổ sung nguồn khoáng vô cơ  $KH_2PO_4$ ,  $MgSO_4$ ; **CT5:** Công  
 thức 5 - bổ sung nguồn nguyên liệu hữu cơ chuối và đậu xanh ở nồng độ  $50g/L$ .

Theo kết quả thu được ở **Bảng 3.4** và **Hình 3.6**, chiều dài quả thể nấm nhộng trùng thảo của hai công thức CT1 và CT2 không có sự khác biệt. Tuy nhiên, chỉ tiêu này giảm xuống ở 2 công thức có hàm lượng khoáng vô cơ thấp hơn là CT3 (0,25X) và CT4 (0X). Một điểm đáng chú ý là chiều dài quả thể ở công thức CT5 (khoáng vô cơ được thay thế hoàn toàn bằng nguyên liệu hữu cơ) không có sự khác biệt so với công thức sử dụng đầy đủ khoáng vô cơ CT1 (1X). Tuy nhiên, chúng tôi không ghi nhận sự tương quan giữa tổng khối lượng quả thể thu được trên một đơn vị cơ chất (1 hộp) với tỷ lệ thành phần khoáng vô cơ trong môi trường nuôi cấy. Cụ thể, tổng khối lượng quả thể lớn nhất

(33,31g/hộp) ghi nhận ở công thức CT1 (1X) và thấp nhất (25,13g/ hộp) ở công thức CT4 (0X). Tổng khối lượng tươi thu được trong nghiên cứu này cũng tương đồng với kết quả nghiên cứu của một số nhóm đã công bố tại Việt Nam trước đây [73].

**Bảng 3.4 :** Đặc điểm hình thái, sinh trưởng và phát triển quả thể của chủng *Cordyceps militaris* S1

CTTD CTTN	Chiều dài quả thể (cm)	Tổng khối lượng quả thể g/hộp	Đặc điểm hình thái, sinh trưởng và phát triển
CT1	5,53 ± 0,66 <sup>b</sup>	33,31 ± 3,94 <sup>bc</sup>	Đỉnh quả thể nấm tròn dài, hướng quang mạnh, màu vàng cam đậm.
CT2	5,71 ± 0,55 <sup>b</sup>	31,63 ± 5,66 <sup>c</sup>	Đỉnh quả thể nấm tròn, hướng quang mạnh, màu vàng cam nhạt.
CT3	4,25 ± 0,95 <sup>a</sup>	26,5 ± 6,24 <sup>a</sup>	Đỉnh quả thể nấm tròn, xuất hiện đầu thùy xẻ răng cưa, quả thể màu vàng cam nhạt,
CT4	4,18 ± 0,63 <sup>a</sup>	25,13 ± 5,82 <sup>bc</sup>	Đỉnh quả thể hình răng cưa, xẻ thùy nhiều
CT5	5,98 ± 0,59 <sup>b</sup>	31,81 ± 3,64 <sup>ab</sup>	Đỉnh quả thể tròn, hướng quang mạnh, màu vàng cam đậm

(các chữ cái khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa ở  $P < 0,05$ )

Mặc dù không có sự khác biệt lớn về kích thước quả thể và tổng khối lượng thu được trên một đơn vị nuôi cấy của mỗi công thức thí nghiệm nhưng chúng tôi nhận thấy có sự khác biệt về đặc điểm hình thái của quả thể thu được trên các môi trường nuôi cấy khác nhau. Cụ thể, quả thể nấm của hai công thức CT1 và CT2 có đỉnh tròn dài và màu sắc vàng đậm, trong khi ở nồng độ khoáng vô cơ thấp (CT3 và CT4) đầu quả thể bắt đầu có hiện tượng dị dạng, phân thùy. Mặc dù vậy, CT5 có bổ sung nguồn nguyên liệu hữu cơ cho các quả thể tương tự ở công thức CT1 và CT2, đồng thời không ghi nhận hiện tượng dị dạng của đỉnh quả thể.

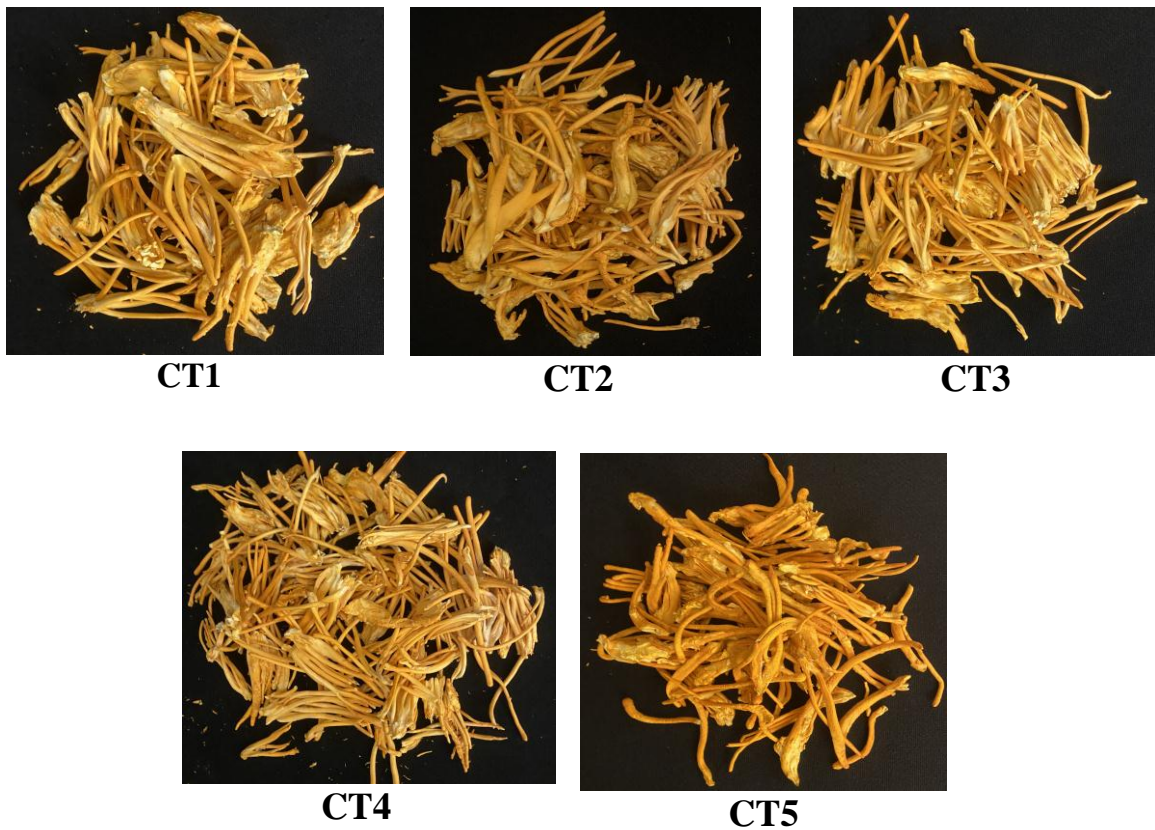
Như vậy, nồng độ khoáng vô cơ trong môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng đến sự phát triển, chiều dài và hình dạng quả thể chủng nấm *Cordyceps militaris*

S1. Ngoài ra, nguồn khoáng vô cơ có thể thay thế bằng nguyên liệu hữu cơ mà không ảnh hưởng tới sinh trưởng và hình thái quả thể nấm nhộng trùng thảo.

### 3.1.5. Sinh khối và chất lượng chủng nấm *Cordyceps militaris* S1

#### 3.1.5.1. Ảnh hưởng của các nồng độ khoáng đến sinh khối quả thể chủng nấm *Cordyceps militaris* S1

Mẫu quả thể nấm nhộng trùng thảo *Cordyceps militaris* S1 tươi sau khi nuôi cấy 60 ngày tiến hành thu từ các công thức thí nghiệm, sau đó được cân đo để xác định trọng lượng tươi, sau đó được sấy thăng hoa để xác định trọng lượng khô, tỷ lệ gãy vụn. Kết quả thu được ở **Hình 3.7** và **Bảng 3.5**.



**Hình 3.7.** Hình thái quả thể nấm *C. militaris* S1 sấy thăng hoa thu từ các công thức thí nghiệm; **CT1:** Công thức 1- bổ sung nguồn khoáng vô cơ  $KH_2PO_4$ ,  $MgSO_4$  ở nồng độ 1g/L; **CT2:** Công thức 2 - bổ sung nguồn khoáng vô cơ  $KH_2PO_4$ ,  $MgSO_4$  ở nồng độ 0,5g/L; **CT3:** Công thức 3 - bổ sung nguồn khoáng vô cơ  $KH_2PO_4$ ,  $MgSO_4$  là 0,25g/L; **CT4:** Công thức 4 – không bổ sung nguồn khoáng vô cơ  $KH_2PO_4$ ,  $MgSO_4$ ; **CT5:** Công thức 5 - bổ sung nguồn nguyên liệu hữu cơ chuối và đậu xanh ở nồng độ 50g/L.

Kết quả thu được ở **Hình 3.7** và **Bảng 3.5** cho thấy, đặc điểm hình thái quả thể nấm sau sấy thăng hoa ở các công thức thí nghiệm CT1 (1X), CT2 (0,5X), CT5 (khoáng vô cơ được thay thế hoàn toàn bằng nguyên liệu hữu cơ) có màu cam hoặc vàng đậm, sợi nấm dài, đều, đầu tròn hoặc nhọn. Trong khi ở hai công thức có nồng độ khoáng vô cơ thấp CT3 (0,25X) và CT4 (0X), quả thể nấm mảnh, có màu sắc nhạt hơn, phía đỉnh bị xẻ thùy. Tương tự như số liệu phân tích của từng hộp nuôi đơn lẻ (Bảng 3.5), tổng khối lượng tươi và khô thu được ở các mẻ nuôi (30 hộp/ mẻ) cao nhất thu được ở công thức CT1. Trong khi đó, hai công thức CT3 và CT4 có khối lượng nấm sau sấy giảm trên 50% so với công thức CT1. Việc sụt giảm sinh khối khô và tươi cũng ghi nhận ở công thức CT2. Tuy nhiên, ở công thức CT5, chúng tôi không ghi nhận sự khác biệt về khối lượng nấm sau sấy so với công thức CT1.

**Bảng 3.5.** Khối lượng quả thể của chủng *Cordyceps militaris* S1 trên các công thức môi trường thí nghiệm

CTTN	Khối lượng tươi (g)	Khối lượng sấy khô (g)	Tỷ lệ gãy vụn (%)		Đặc điểm hình thái
			Nguyên sợi	Gãy vụn	
CT1	973,33±20,82 <sup>c</sup>	121,67±2,89 <sup>c</sup>	60 ±0,05 <sup>bc</sup>	40 ±0,05 <sup>ab</sup>	Sợi nấm dài, đều, đầu tròn, màu cam
CT2	926,67±15,28 <sup>b</sup>	103,33±5,77 <sup>b</sup>	68 ±0,05 <sup>c</sup>	32 ±0,05 <sup>a</sup>	Sợi nấm dài, đầu tròn, thân to, màu cam
CT3	773,33±30,55 <sup>a</sup>	57,67±6,43 <sup>a</sup>	47 ±0,04 <sup>ab</sup>	53 ±0,04 <sup>bc</sup>	Sợi nấm mảnh, nhỏ xốp, xuất hiện quả thể đầu xẻ thùy, màu cam nhạt
CT4	743,33±20,82 <sup>a</sup>	50,67±1,53 <sup>a</sup>	44 ±0,02 <sup>a</sup>	56 ±0,02 <sup>c</sup>	Sợi nấm mảnh nhỏ, xốp, xuất hiện quả thể đầu xẻ thùy, màu cam nhạt
CT5	923±6,08 <sup>b</sup>	118,33±7,64 <sup>c</sup>	63 ±0,05 <sup>c</sup>	37 ±0,05 <sup>a</sup>	Sợi nấm dài, đầu nhọn, màu cam đậm, phần gốc sợi nấm có màng bông xốp

(Khối lượng cân được tính trên 30 hộp nấm cho mỗi công thức với lặp lại 3 lần liên tiếp; các chữ cái khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa ở  $P < 0,05$ )

Tỷ lệ nấm gãy vụn là một chỉ tiêu quan trọng ảnh hưởng tới chất lượng thương mại khóa sản phẩm nấm trùng thảo. Kết quả trên bảng 3.5 cho thấy, tỷ lệ nấm gãy vụn tăng mạnh và chiếm trên 50% ở hai công thức CT3 (53%) và CT4 (56%). Tuy nhiên, tiêu chí này không có sự khác biệt ở 2 công thức CT1 (40%) và CT2 (32%) so với công thức CT5 (37%). Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Li và cộng sự 2004 và Dong và cộng sự 2012 [74,75] cho thấy việc bổ sung các khoáng chất như  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  vào môi trường nuôi cấy tăng năng suất và chất lượng của nấm nấm *Cordyceps militaris*.

Như vậy, hàm lượng khoáng vô cơ có ảnh hưởng lớn tới sinh trưởng, sinh khối, hình thái, năng suất khô cũng như chất lượng cảm quan của nấm trùng thảo nuôi cấy trên môi trường nhân tạo. Việc bổ sung nguồn khoáng từ nguyên liệu hữu cơ có thể hạn chế sự thiếu hụt của khoáng vô cơ trong môi trường nuôi cấy.

### **3.1.5.2. Ảnh hưởng của các nồng độ khoáng đến hoạt chất chính trong quả thể chủng nấm *Cordyceps militaris* S1**

Quả thể nấm thu từ các công thức thí nghiệm sau khi sấy thăng hoa được đem đi phân tích hàm lượng hai hoạt chất chính là adenosine và cordycepin, kết quả thu được trên bảng 3.6.

Dựa vào kết quả phân tích ở **Bảng 3.6**, chúng tôi nhận thấy hàm lượng adenosine có sự sụt giảm ở công thức có thành phần khoáng vô cơ thấp hơn (CT2, CT3 và CT4) so với công thức CT1 (274 mg). Tuy nhiên, hàm lượng adenosine được ghi nhận tăng lên (293 mg) ở công thức CT5 (khoáng vô cơ được thay thế bằng nguồn nguyên liệu hữu cơ). Tương tự như vậy, hàm lượng cordycepin cũng giảm xuống ở các công thức với nồng độ khoáng vô cơ bổ sung vào môi trường giảm (CT2, CT3 và CT4). Mặc dù vậy, hàm lượng hoạt chất này không có sự thay đổi ở công thức CT5 (276 mg) so với công thức CT1 (285 mg).

Như vậy, hàm lượng khoáng trong môi trường cơ chất nuôi cấy nấm trùng thảo có ảnh hưởng trực tiếp tới hàm lượng hai hoạt chất chính là adenosine và cordycepin trong quả thể nấm sau sấy thăng hoa.

**Bảng 3.6.** Chất lượng quả thể của chủng *Cordyceps militaris* S1 trên các công thức thí nghiệm

Tên Công Thức	Tên chỉ tiêu	
	Hàm lượng Andenosine (mg/100g nấm khô)	Hàm lượng Cordycepin (mg/100g nấm khô)
<b>CT1</b>	274,00±5,29 <sup>b</sup>	285,00±3,61 <sup>d</sup>
<b>CT2</b>	254,00±5,29 <sup>a</sup>	197,00±8,19 <sup>c</sup>
<b>CT3</b>	244,67±3,21 <sup>a</sup>	141,00±4,00 <sup>b</sup>
<b>CT4</b>	245,00±4,00 <sup>a</sup>	108,00±4,58 <sup>a</sup>
<b>CT5</b>	293,67±6,81 <sup>c</sup>	276,67±6,66 <sup>d</sup>

*Phương pháp thử NIFC.0.5.M.163 (HPLC); Đơn vị: mg/100g*

*(các chữ cái khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa ở  $P < 0,05$ )*

Trong nghiên cứu của tác giả Đỗ Tuấn Bách và cộng sự 2017 [76] hàm lượng cordycepin trong điều kiện nuôi cấy tối ưu đạt 433 mg/100 g quả thể khô, nhưng không đề cập tới hàm lượng adenosin. Ở nghiên cứu của Hur và đồng tác giả 2008, hàm lượng adenosin trong quả thể đạt 180 mg/100 g và trong hệ sợi đạt 60 mg/100 g, trong khi đó hàm lượng cordycepin trong quả thể đạt 970 mg/100 g và trong hệ sợi nấm là 360 mg/100 g [26]. Trong nghiên cứu của Lo và nhóm nghiên cứu 2013, hàm lượng adenosin trong quả thể đạt 245 mg/100 g và hàm lượng cordycepin là 265 mg/100 g [77]. Như vậy, hàm lượng 2 hoạt chất chính này có sự khác biệt giữa các nghiên cứu, điều này có thể do việc sử dụng các chủng giống và quy trình nuôi cấy khác nhau. Ngoài ra, adenosin còn là dẫn suất và có thể được chuyển hóa thành cordycepin trong quá trình phát triển của nấm nhộng trùng thảo. Do vậy, thời điểm thu hoạch cũng ảnh hưởng tới hàm lượng và tỷ lệ của hai hoạt chất này trong sản phẩm nấm nhộng trùng thảo. Trong nghiên cứu của chúng tôi, ở cả hai công thức khoáng vô cơ đầy đủ (CT1) và khoáng vô cơ được thay thế bằng nguyên liệu hữu cơ (CT5), thành phần và tỷ lệ hai hoạt chất này trong quả thể nấm sau sấy thăng hoa là tương đương nhau. Đây cũng là một cơ sở quan trọng để tiến tới xây dựng hệ thống nuôi cấy nhộng trùng thảo không sử dụng nguồn khoáng vô cơ.

### 3.2. ẢNH HƯỞNG HÀM LƯỢNG KHOÁNG TRONG MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY TỚI KHẢ NĂNG THOÁI HÓA CHỨNG NẤM *CORDYCEPS MILITARIS* S1

#### 3.2.1. Đặc điểm hình thái và sinh trưởng của hệ sợi các dòng đơn bào tử sau 7 ngày nuôi trong tối

Quả thể nấm ở các công thức sau 60 ngày nuôi cấy, được sử dụng làm nguyên liệu cho việc phân lập bào tử đơn theo phương pháp của Kang và cộng sự 2017. Các bào tử đơn tách rời được cấy chuyển sang môi trường mới để tiếp tục theo dõi sự sinh trưởng và phát triển của hệ sợi cũng như tiến hành các phân tích tiếp theo.

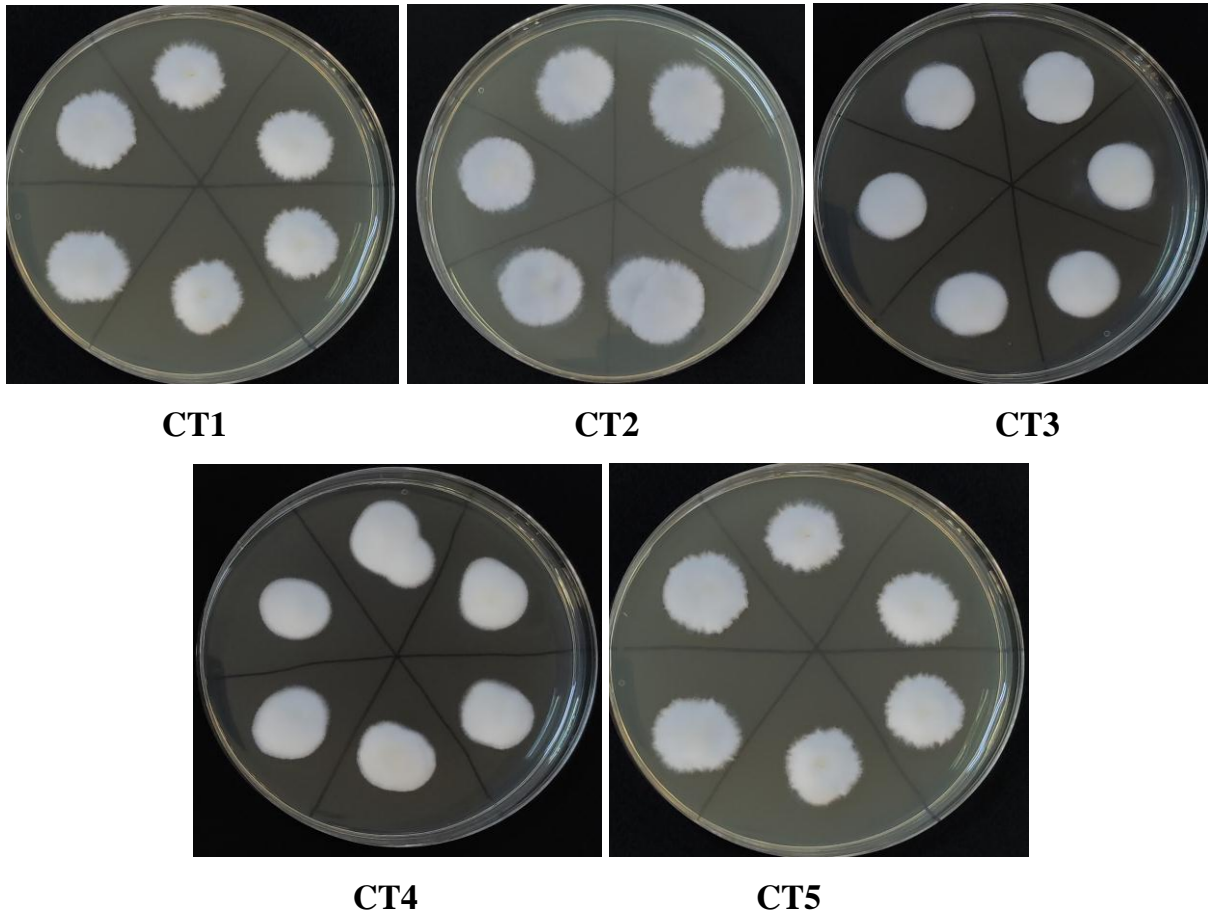


**Hình 3.8.** Các bào tử đơn được phân lập từ quả thể sau 5 ngày trên môi trường nuôi cấy

Hệ sợi phát triển từ các bào tử đơn được theo dõi và thu các kết quả về đặc điểm hình thái và sinh trưởng sau 7 ngày nuôi trong điều kiện tối nhiệt độ 20°C - 22°C. Theo kết quả ở **Hình 3.9** và **Bảng 3.7**, hệ sợi nấm ở tất cả các công thức đều sinh trưởng mạnh, hình thái sinh trưởng hệ sợi ở các công thức CT1, CT2 và CT5 đều có màu trắng đồng nhất, bông xốp, mép có viền răng cưa. Tuy nhiên, ở các công thức CT3 và CT4 hệ sợi phát triển dạng bông mịn viền không tạo răng cưa. Về kích thước, hệ sợi từ bào tử của công thức CT1 có kích thước lớn nhất là  $2 \pm 0,19$  cm, các công thức khác không ghi nhận sự khác biệt.



Về màu sắc, hệ sợi của các bào tử thu được từ các công thức CT1, CT2 và CT5 đã bắt đầu có sự chuyển màu sang dạng vàng nhạt ở phần trung tâm. Tuy nhiên, ở hai công thức CT3 và CT4, hệ sợi dạng trắng mịn và chưa cho thấy sự chuyển màu vàng.



**Hình 3.9.** Hệ sợi phát triển từ các dòng đơn bào tử sau 7 ngày nuôi trong tối; **CT1:** Công thức 1 - bổ sung nguồn khoáng vô cơ  $KH_2PO_4$ ,  $MgSO_4$  ở nồng độ 1g/L; **CT2:** Công thức 2 - bổ sung nguồn khoáng vô cơ  $KH_2PO_4$ ,  $MgSO_4$  ở nồng độ 0,5g/L; **CT3:** Công thức 3 - bổ sung nguồn khoáng vô cơ  $KH_2PO_4$ ,  $MgSO_4$  ở nồng độ 0,25g/L; **CT4:** Công thức 4 – không bổ sung nguồn khoáng vô cơ  $KH_2PO_4$ ,  $MgSO_4$ ; **CT5:** Công thức 5 - bổ sung nguồn nguyên liệu hữu cơ chuối và đậu xanh ở nồng độ 50g/L.

**Bảng 3.7.** Đặc điểm hình thái, sinh trưởng hệ sợi của các dòng đơn bào tử sau 7 ngày nuôi trong tối.

CTTN	Kích thước hệ sợi(cm)	Đặc điểm hệ sợi
CT1	$2,00 \pm 0,19^d$	Bào tử hình dạng tròn đều, hệ sợi màu trắng, bông xốp, có viền răng cưa, tâm có chóp nấm.
CT2	$1,76 \pm 0,17^c$	Bào tử có hình tròn đều, hệ sợi màu trắng bông xốp, có viền răng cưa, tâm có chóp nấm.
CT3	$1,56 \pm 0,12^b$	Bào tử hình tròn đều, hệ sợi màu trắng, bông mịn.
CT4	$1,35 \pm 0,16^a$	Bào tử hình tròn đều, có hệ sợi bông mịn.
CT5	$1,54 \pm 0,16^b$	Bào tử có hình tròn đều, hệ sợi màu trắng, bông xốp, có viền răng cưa, tâm có chóp nấm.

(các chữ cái khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa ở  $P < 0,05$ )

Như vậy, thành phần và hàm lượng khoáng trong môi trường nuôi cấy không chỉ ảnh hưởng tới sinh trưởng, phát triển, thành phần hoạt chất chính của chủng nấm *Cordyceps militaris* S1 mà còn ảnh hưởng tới khả năng phát triển của các bào tử ở thế hệ kế tiếp.

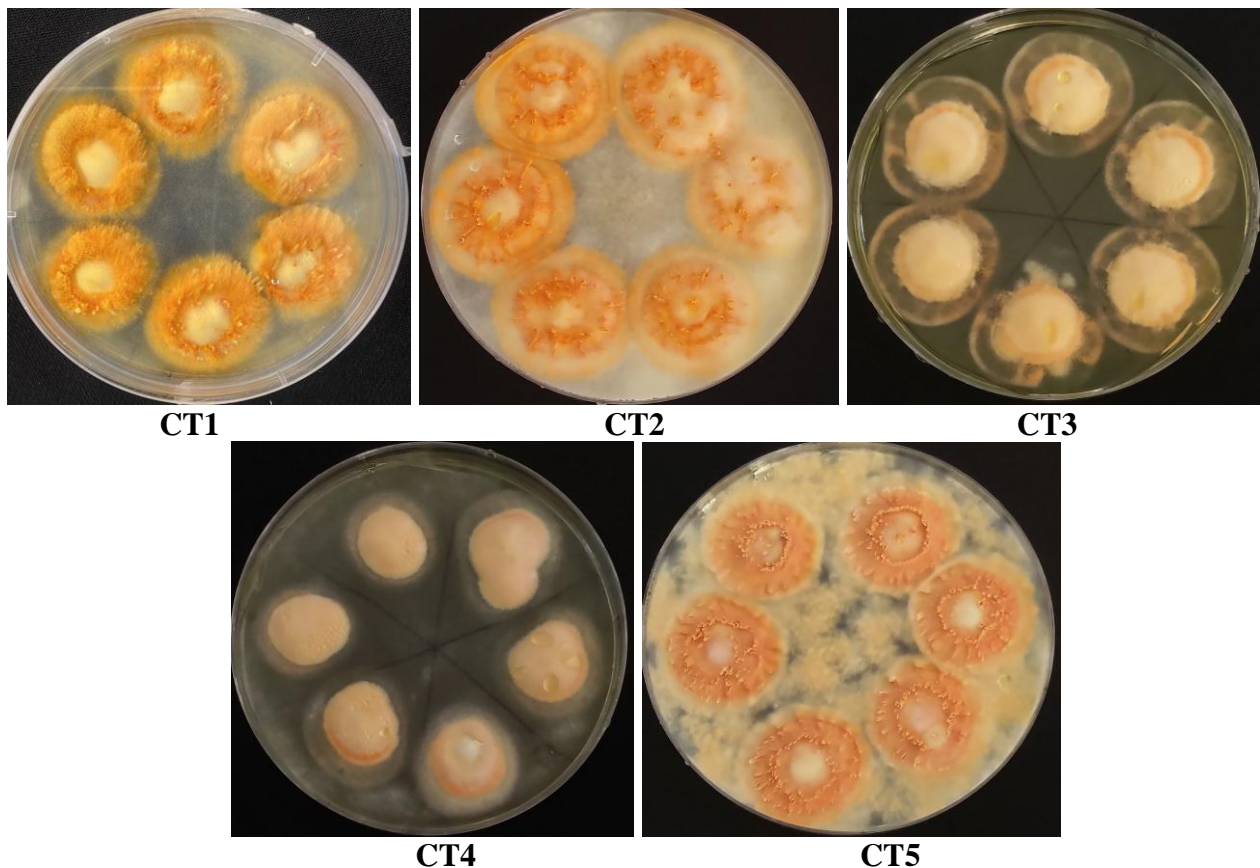
### 3.2.2. Đặc điểm hình thái và sinh trưởng phát triển của các dòng đơn bào tử sau 15 ngày nuôi chiếu sáng

Tiếp tục đánh giá các giai đoạn phát triển của chủng nấm *Cordyceps militaris* S1, ở các công thức thí nghiệm hệ sợi nấm sau thời gian 7 ngày nuôi trong tối được chuyển sang điều kiện nuôi chiếu sáng để thu các chỉ tiêu về màu sắc và hình dạng (**Hình 3.10** và **Bảng 3.8**).

Sau thời gian từ 2 - 3 ngày chuyển ra điều kiện chiếu sáng, màu sắc của hệ sợi thay đổi từ màu trắng đến màu vàng hoặc màu vàng cam.

Sau thời gian 15 ngày chuyển ra điều kiện nuôi chiếu sáng, hệ sợi nấm ở các công thức thí nghiệm tiếp tục phát triển tốt, tuy nhiên chúng tôi nhận thấy

kết quả có sự khác biệt rõ rệt về màu sắc và hình thái hệ sợi phát triển từ các đơn bào tử ở các công thức thí nghiệm. Ở các công thức môi trường CT1, CT2 và CT5 (nguồn khoáng vô cơ được thay thế hoàn toàn bằng nguồn nguyên liệu hữu cơ), hệ sợi có màu vàng cam, xé rãnh ăn sâu vào môi trường cơ chất và có nhiều mầm quả thể bắt đầu xuất hiện. Còn ở các công thức môi trường CT3 và CT4 hệ sợi có màu vàng nhạt phát triển chậm hơn và không thấy sự xuất hiện của mầm quả thể.



**Hình 3.10.** Các dòng bào tử đơn sau 15 ngày chiếu sáng; **CT1:** Công thức 1- bổ sung nguồn khoáng vô cơ  $KH_2PO_4$ ,  $MgSO_4$  ở nồng độ 1g/L; **CT2:** Công thức 2 - bổ sung nguồn khoáng vô cơ  $KH_2PO_4$ ,  $MgSO_4$  ở nồng độ 0,5g/L; **CT3:** Công thức 3 - bổ sung nguồn khoáng vô cơ  $KH_2PO_4$ ,  $MgSO_4$  ở nồng độ 0,25g/L; **CT4:** Công thức 4 – không bổ sung nguồn khoáng vô cơ  $KH_2PO_4$ ,  $MgSO_4$ ; **CT5:** Công thức 5 - bổ sung nguồn nguyên liệu hữu cơ chuối và đậu xanh ở nồng độ 50g/L.

**Bảng 3.8.** Đặc điểm hình thái, sinh trưởng và phát triển của các dòng bào tử đơn sau 15 ngày nuôi dưới điều kiện sáng

CTTN	Kích thước hệ sợi (cm)	Đặc điểm hệ sợi
CT1	$3,02 \pm 0,26^c$	Bào tử hình tròn đều màu vàng cam, hệ sợi mịn bông, có xuất hiện quả thể nhỏ .
CT2	$3,53 \pm 0,26^d$	Bào tử hình tròn đều màu vàng cam, hệ sợi bông mịn, có xuất hiện quả thể nhỏ.
CT3	$2,87 \pm 0,29^{bc}$	Bào tử hình tròn đều màu vàng nhạt, hệ sợi bông mịn có 2 vòng tròn đồng tâm, vòng ngoài màu trong suốt, không xuất hiện quả thể.
CT4	$1,88 \pm 0,20^a$	Bào tử hình tròn đều màu vàng nhạt, hệ sợi bông mịn có 2 vòng tròn đồng tâm, vòng ngoài màu trong suốt, không xuất hiện quả thể.
CT5	$2,67 \pm 0,26^b$	Bào tử hình tròn đều màu vàng cam, hệ sợi bông mịn, có xuất hiện quả thể nhỏ.

(các chữ cái khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa ở  $P < 0,05$ )

Như vậy, việc giảm hàm lượng khoáng trong môi trường cơ chất có ảnh hưởng xấu đến hình thái, sự phát triển hệ sợi cũng như khả năng hình thành quả thể từ các bào tử đơn tạo được trên các môi trường nghiên cứu. Ngoài ra, việc bổ sung nguồn khoáng từ nguyên liệu hữu cơ vào môi trường nuôi cấy có thể hạn chế ảnh hưởng của sự thiếu hụt nguồn khoáng vô cơ trong giai đoạn nuôi quả thể nhộng trùng thảo.

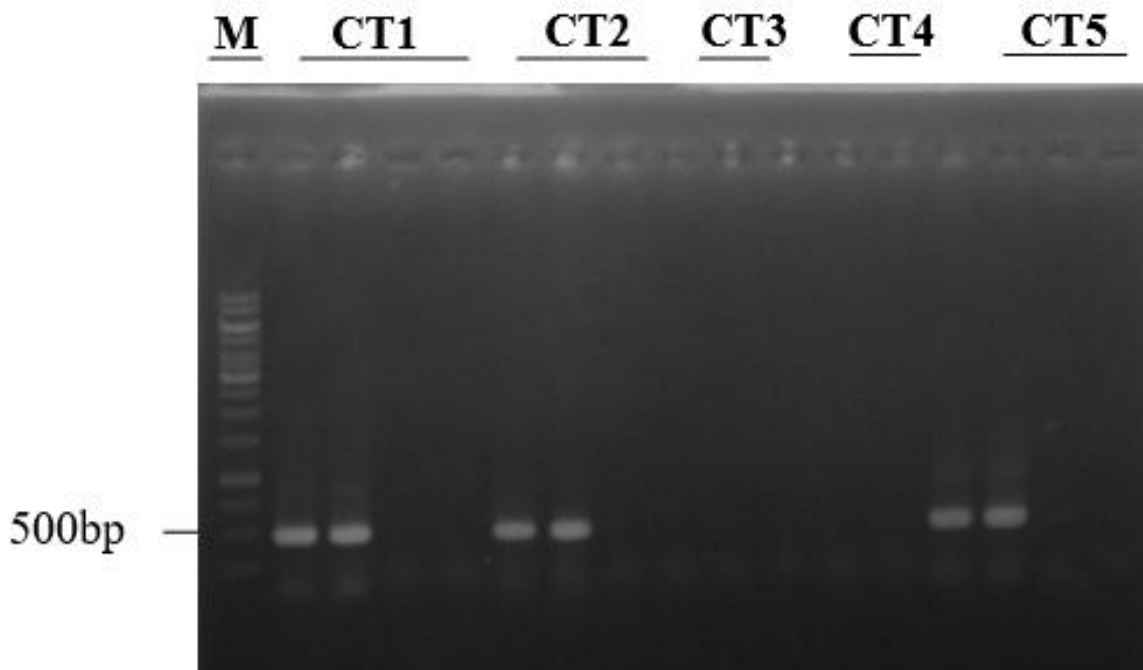
Hiện tượng thoái hóa giống làm cho số lượng và chất lượng quả thể bị giảm sút, sẽ gây thiệt hại lớn về kinh tế cho người sản xuất. Vì vậy việc phát hiện chủng nấm bị thoái hóa có ý nghĩa rất quan trọng. Các nghiên cứu trước đây cũng đã chỉ ra một số đặc điểm để nhận dạng chủng nấm bị thoái hóa, như màu sắc của chủng nấm có màu sáng hơn chủng nấm bình thường, ở chủng nấm thoái hóa không còn khả năng hình thành quả thể [57,58]. Điều này cũng cho thấy trong nghiên cứu của chúng tôi ở công thức bổ sung nồng độ khoáng thấp CT3 và không bổ sung nguồn khoáng CT4 không còn khả năng hình thành quả

thể ngay trên môi trường phân lập bào tử đơn và màu sắc cũng nhạt hơn.

### 3.2.3. Đặc điểm về thành phần và tỷ lệ gen MAT

Ở thí nghiệm này các bào tử đơn phân lập từ các công thức thí nghiệm được nuôi trên môi trường nhân giống cấp 1, sau 5 ngày hệ sợi được nuôi cấy trong môi trường nhân giống cấp 2 và được sử dụng làm nguyên liệu cho tách chiết DNA để kiểm tra gen MAT. DNA tổng số được tách chiết và dùng cho nhân bản các gen MAT (**Hình 3.11**). Tổng số bào tử đơn đã được phân lập từ các công thức thí nghiệm thu được là 30 bào tử sau 3 lần lặp.

Sau khi thu được DNA tổng số từ các mẫu đơn bào tử và được sử dụng để làm khuôn cho phản ứng PCR nhân bản gen MAT



**Hình 3.11.** Kết quả kiểm tra tỷ lệ và thành phần gen MAT trong các công thức thí nghiệm; sản phẩm PCR khuếch đại với môi MAT 1-1-2; **CT1:** Công thức 1- bổ sung nguồn khoáng vô cơ  $KH_2PO_4$ ,  $MgSO_4$  ở nồng độ 1g/L; **CT2:** Công thức 2 - bổ sung nguồn khoáng vô cơ  $KH_2PO_4$ ,  $MgSO_4$  ở nồng độ 0,5g/L; **CT3:** Công thức 3 - bổ sung nguồn khoáng vô cơ  $KH_2PO_4$ ,  $MgSO_4$  ở nồng độ 0,25g/L; **CT4:** Công thức 4 – không bổ sung nguồn khoáng vô cơ  $KH_2PO_4$ ,  $MgSO_4$ ; **CT5:** Công thức 5 - bổ sung nguồn nguyên liệu hữu cơ chuối và đậu xanh ở nồng độ 50g/L.

**Bảng 3.9.** Tỷ lệ và thành phần gen MAT từ các công thức thí nghiệm

CTTN (số bào tử)	Bào tử mang gen MAT 1-1-1	Bào tử mang gen MAT 1-1-2	Bào tử mang gen MAT 1-2-1	Tỷ lệ bào tử mang gen (%)
CT1 (30)	0,00	9,67 ± 0,71 <sup>b</sup>	0,00	30,00 ± 2,31 <sup>a</sup>
CT2 (30)	0,00	7,00 ± 1,22 <sup>ab</sup>	0,00	23,33 ± 3,58 <sup>ab</sup>
CT3 (30)	0,00	0,00	0,00	0,00
CT4 (30)	0,00	0,00	0,00	0,00
CT5 (30)	0,00	7,00 ± 0,71 <sup>ab</sup>	0,00	23,33 ± 6,53 <sup>ab</sup>

Kết quả nghiên cứu ở **Bảng 3.9** của chúng tôi cho thấy ở cả 5 công thức thí nghiệm đều không ghi nhận sự có mặt sản phẩm khuếch đại của gen *MAT 1-1-1* và *MAT 1-2-1*. Trong khi đó, sản phẩm PCR của gen *MAT 1-1-2* được phát hiện ở các công thức thí nghiệm CT1, CT2 và CT5 (nguồn khoáng vô cơ được thay thế hoàn toàn bằng nguồn nguyên liệu hữu cơ). Ngoài ra, ở công thức CT3 và CT4 đều không ghi nhận sự có mặt sản phẩm PCR của gen MAT.

Tính trên tổng số đơn bào tử được phân tích, ở công thức CT1 30% bào tử có mang gen MAT, các bào tử đơn mang gen *MAT 1-1-2*. Trong khi, CT2 và CT5, tỷ lệ bào tử đơn mang gen MAT giảm xuống còn 23,33%. So với thể hệ đầu tiên, gen *MAT1-1-1* không còn được phát hiện trong các dòng bào tử đơn được phân tích. Ngoài ra, tỷ lệ bào tử mang gen MAT cũng giảm đáng kể so với thể hệ ban đầu (30% so với 68,75%). Như vậy, thể hệ nuôi cấy và thành phần khoáng có ảnh hưởng trực tiếp tới việc duy trì thành phần và tỷ lệ gen MAT qua các thể hệ nuôi cấy.

*Cordyceps militaris* là một loại nấm dị thể hay dị sản (heterothallic) có quá trình sinh sản hữu tính, được kiểm soát bởi các gen quy định kiểu bắt cặp MAT. Một số nghiên cứu ghi nhận, các chủng chứa cả hai kiểu gen giao phối đối lập là MAT 1-1 (*MAT1-1-1* và *MAT1-1-2*) và MAT 1-2 (*MAT1-2-1*) có thể tạo ra quả thể hoàn chỉnh, trong khi các chủng chỉ mang gen giới tính đơn là MAT 1-1 hoặc MAT 1-2 không có khả năng hình thành quả thể hoặc hình thành quả thể dị dạng, bất thường [78]. Tuy nhiên, một số nghiên cứu khác lại cho

biết, nấm nhộng trùng thảo chỉ chứa một gen kiểu giao phối cũng có thể tạo ra quả thể và ngược lại chứa cả hai kiểu gen giao phối lại không tạo ra quả thể [79]. Trong nghiên cứu này của chúng tôi, chủng nấm S1 chỉ mang gen MAT1-1 (*MAT1-1-1* và *MAT1-1-2*) vẫn có khả năng hình thành và phát triển ở thể hệ sau. Cùng với kết quả ghi nhận trong nghiên cứu của của Vũ Xuân Tạo và cộng sự 2022 [66], nghiên cứu của chúng tôi cho thấy cần có thêm các phân tích sâu hơn về mối quan hệ của tỷ lệ và thành phần gen MAT với khả năng hình thành quả thể và năng suất nấm nhộng trùng thảo nuôi cấy trên môi trường nhân tạo.

## CHƯƠNG 4: KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

### KẾT LUẬN

1. Đã đánh giá được ảnh hưởng của nồng độ khoáng bổ sung vào môi trường cơ chất đến hình thái, sinh trưởng và phát triển của chủng nấm *Cordyceps militaris S1*.
  - Nồng độ khoáng vô cơ thấp không ảnh hưởng rõ rệt tới sự phát triển hệ sợi nhưng kéo dài thời gian tạo mầm quả thể, làm giảm chiều dài và gây dị dạng, phân thùy đỉnh quả thể.
  - Nồng độ khoáng vô cơ thấp làm giảm sinh khối, năng suất, chất lượng cảm quan và thành phần hoạt chất chính trong nấm nhộng trùng thảo
  - Nguồn khoáng từ nguyên liệu hữu cơ có thể dùng thay thế sự thiếu hụt nguồn khoáng vô cơ trong môi trường nuôi cấy nấm nhộng trùng thảo và hạn chế được tác động tới sinh trưởng, năng suất và chất lượng nấm nhộng trùng thảo.
2. Đã đánh giá được tác động của hàm lượng khoáng vô cơ trong môi trường nuôi cấy tới khả năng thoái hóa của chủng nấm *Cordyceps militaris S1*
  - Việc thiếu hụt thành phần khoáng trong môi trường cơ chất ảnh hưởng xấu tới chất lượng bào tử thu được từ đó làm giảm khả năng sinh trưởng của thể sợi và khả năng hình thành quả thể ở thể hệ sau.
  - Thiếu hụt thành phần khoáng trong môi trường nuôi cấy làm giảm tỷ lệ cũng như thay đổi thành phần gen MAT trong các bào tử đơn thu được ở thể hệ kế tiếp. Khi nồng độ khoáng giảm, tỷ lệ gen MAT trong các dòng bào tử giảm. Ở ngưỡng khoáng thấp (0,5X ) hoặc không bổ sung khoáng, các gen MAT không được ghi nhận ở các dòng bào tử phân tích.
  - Tác động thoái hóa nấm nhộng trùng thảo do thiếu hụt khoáng vô cơ trong môi trường nuôi cấy có thể hạn chế bằng việc bổ sung từ nguồn nguyên liệu hữu cơ.



**KIẾN NGHỊ**

Tiếp tục đánh giá ảnh hưởng của thành phần khoáng trong môi trường nuôi cấy tới sinh trưởng, phát triển, khả năng hình thành quả thể, năng suất và chất lượng quả thể ở giai đoạn nuôi cấy trên cơ chất. Tối ưu thành phần và hàm lượng nguyên liệu hữu cơ nhằm thay thế hoàn toàn nguồn khoáng vô cơ trong một số mô hình nuôi cấy nhộng trùng thảo định hướng sản xuất.

**DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ**

Tạ Thị Đông, Nguyễn Thị Hồng Hà, Bùi Ngọc Ánh, Phan Thị Lan Anh, Đỗ Thị Gấm, Nguyễn Văn Phương, Đỗ Tiến Phát. *Phân tích đặc điểm phân tử và hình thái liên quan tới khả năng thoái hóa của một số chủng nấm nhộng trùng thảo (*Cordyceps militaris*)*. Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Thái Nguyên.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Zhang H., Wang J. W., Dong S. Z., Xu F. X., Wang S. H., 2012, “The optimization of extraction of cordycepin from fruiting body of *Cordyceps militaris* (L.) link”, *In Advanced Materials Research 393*, pp. 1024-1028. Trans Tech Publications.
2. Yang, S., Jin, L., Ren, X., Lu, J., Meng, Q., 2014, Optimization of fermentation process of *Cordyceps militaris* and antitumor activities of polysaccharides in vitro, *Journal of Food and Drug Analysis*, 22: 468-476.
3. Shonkor KD., Mina M., Akihiko S., Mikio S., 2010, Medicinal uses of the mushroom *Cordyceps militaris*: current state and prospects, *Fitoterapia*. 81: 961-968.
4. Fengyao Wu., Hui Yan., Xiaoning Ma., Junqing Jia., Guozheng Zhang., Xijie Guo and Zhongzheng Gui (2011). Structural characterization and antioxidant activity of purified polysaccharide from cultured *Cordyceps militaris*, *African Journal of Microbiology Research*. 5(18): 2743-2751.
5. Rao, Y.K., Fang, S.H., Wu, W.S., Tzeng, Y.M., 2010, Constituents isolated from *Cordyceps militaris* suppress enhanced inflammatory mediator's production and human cancer cell proliferation, *Journal of Ethnopharmacology*, 131(2): 363–367.
6. Reis F.S., Barros L., Calhella R.C., Ćirić A., van Griensven L., Soković, M. and Ferreira I., 2013, The methanolic extract of *Cordyceps militaris* (L.) Link fruiting body shows antioxidant, antibacterial, antifungal and antihuman tumor cell lines properties, *Food and Chemical Toxicology*, 62: 91–98.
7. Xiong C., Xia Y., Zheng P., and Wang C., 2013, Increasing oxidative stress tolerance and subculturing stability of *Cordyceps militaris* by overexpression of a glutathione peroxidase gene, *Applied microbiology and biotechnology*, 97, 2009-2015.

8. He L., Han C., Li P., Chen Y., Liu D., and Geng L., 2009, Effect of mineral elements on colony types of *Cordyceps militaris* in subculturing, *Journal of Shenyang Agricultural University*, 40, 672-677.
9. Đái Duy Ban, Lưu Tham Mưu, 2018, *Đông trùng hạ thảo một dược liệu quý hỗ trợ điều trị các bệnh virus, ung thư, HIV/AIDS, đái tháo đường, suy giảm tình dục... và nghiên cứu phát hiện loài đông trùng hạ thảo mới ở Việt Nam*. Nhà xuất bản Y học Hà Nội.
10. Kobayasi Y., 1982. Keys to the taxa of the genera *Cordyceps* and *Torrubiella*, *Transactions of the Mycological Society of Japa, Herbal, New York*, 23:329–364
11. Stensrud Ø., Hywel-Jones- N.L., Schumacher T., 2005, Towards a phylogenetic classification of *Cordyceps*: ITS nrDNA sequence data confirm divergent lineages and paraphyly. *Mycological Research*. 109: 41-56.
12. Paul M. K., Paul F. C., David W. M. and Stalpers J. A. (2008) *Dictionary of the Fungi*, CABI.
13. Phull, Abdul-Rehman et al. “*Cordyceps militaris* as a Bio Functional Food Source: Pharmacological Potential, Anti-Inflammatory Actions and Related Molecular Mechanisms.” *Microorganisms* vol. 10,2 405. 10 Feb. 2022.
14. Kamble V.R. and Agre D.G., 2012, Reinvestigation of insect parasite fungus *Cordyceps militaris* from Maharashtra, *Bionano Frontier* 5(2):224-225.
15. Zheng P., Xia Y.L., Xiao Ch.H., 2011, Genome sequence of the insect pathogenic fungus *Cordyceps militaris*, a valued traditional Chinese medicine, *Genome Biology*. 23; 12.
16. Lou H-W., Ye Z-W., Yu Y-H., Lin J-F., Guo L.-Q., Chen B.-X., 2019, The efficient genetic transformation of *Cordyceps militaris* by using mononuclear protoplasts, *Scientia Horticulturae*, 243, 307-313.

17. Shrestha B, Kim H-K, Sung G-H, Spatafora J.W, and Sung J-M, 2004, Bipolar heterothallism, a principal mating system of *Cordyceps militaris in vitro*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 9, 440-446.
18. Zheng P, Xia Y, Xiao G, Xiong C, Hu- X, Zhang S, 2012, Genome sequence of the insect pathogenic fungus *Cordyceps militaris*, a valued traditional Chinese medicine, *Genome biology*, 12, 1-22.
19. Ait Benkhali J., Coppin E., Brun S., Peraza-Reyes L., Martin T., Dixelius, C., et al., (2013) A network of HMG-box transcription factors regulates sexual cycle in the fungus *Podospora anserina*, *PLoS genetics*, 9, e1003642.
20. Wang H., Wei J., Lin N., Feng A., Chen M., and Bao D., 2010, Distribution of mating-type genes in fruiting and non-fruiting forms of *Cordyceps militaris*. *Acta Edulis Fungi*, 17, 1-4.
21. Jones Jr SK and Bennett RJ, 2011, Fungal mating pheromones: choreographing the dating game. *Fungal Genetics and Biology*, 48, 668-676.
22. Jannie Siew Lee Chan, Gayane S Barseghyan, Mikheil D Asatiani, Solomon P Wasser , 2015, Chemical composition and medicinal value of fruiting bodies and submerged cultured mycelia of caterpillar medicinal fungus *Cordyceps militaris* CBS-132098 (Ascomycetes). *Int J Med Mushrooms*. 17(7): 649-659.
23. Li SP., Yang FQ., Tsim KW., 2006, Quality control of *Cordyceps sinensis*, a valued traditional Chinese medicine. *J, Pharm Biomed Anal*, 41:1571-1584.
24. Nachshol Cohen Jacob Cohen Mikheil D Asatiani Vinay K Varshney Hui Tzu Yu- Yi-Chi Yang - Yu-Hsuan Li - Jeng-Leun Mau .Solomon P Wasser, 2014, Chemical composition and nutritional and medicinal value of fruit bodies and submerged cultured mycelia of culinary-medicinal higher Basidiomycetes mushrooms. *Int J Med Mushrooms*. 16(3): 273-291.
25. Das SK., Masuda M., Mikio S, 2010, Medicinal uses of the mushroom *Cordyceps militaris*: current state and prospects, *Fitoterapia*, 81:961-968.

26. Huang Lei, Li Qizhang, Chen Yiyuan, Wang Xuefei, Zhou Xuanwei, 2009, Determination and analysis of cordycepin and adenosine in the products of *Cordyceps* spp. *African Journal of Microbiology Research*, 3. 957-961.
27. Hyun Hur (2008) *Chemical Ingredients of Cordyceps militaris*, *Mycobiology*, 36:4, 233-235, DOI: 10.4489/MYCO.2008.36.4.233.
28. Yongliang Xia, Feifei Luo, Yanfang Shang, Peilin Chen, Yuzhen Lu, Chengshu Wang, 2017, Fungal cordycepin biosynthesis is coupled with the production of the safeguard molecule pentostatin, *Cell Chem. Biol.* 24, 1479-1489.e4.
29. Lim L, Lee C, Chang E, 2012, Optimization of solid state culture conditions for the production of adenosine, cordycepin, and D-mannitol in fruiting bodies of medicinal caterpillar fungus *Cordyceps militaris* (L.:Fr.) Link (Ascomycetes), *Int J Med Mushrooms*, 14(2):181-7. doi: 10.1615/intjmedmushr.v14.i2.60. PMID: 22506578.
30. Friedman M, 2016, Mushroom Polysaccharides: Chemistry and Antiobesity, Antidiabetes, Anticancer, and Antibiotic Properties in Cells, Rodents, and Humans, *Foods* (Basel, Switzerland), 5(4), 80.
31. Hui Yan, Dongjie Zhu, Dabao Xu, Jie Wu, Xuyun Bian, 2008, A study on *Cordyceps militaris* polysaccharide purification, composition and activity analysis. *African Journal of Biotechnology Vol. 7* (22), pp. 4004-4009.
32. Chang HL, Chao GR, Chen CC, Mau JL. 2001. Nonvolatile taste components of agaricus blazei, antrodia camphorata and *Cordyceps militaris* mycelia. *Food Chemistry* 74, 203–207.
33. Shrestha B., Han S-K., Sung J-M., and Sung G-H, 2012, Fruiting body formation of *Cordyceps militaris* from multi-ascospore isolates and their single ascospore progeny strains. *Mycobiology*, 40, 100-106.
34. 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.
35. Li CB, Tong XD, Bai J, 2004, Artificial stromata production of *Cordyceps militaris*, *J Dalian Natl Univ*, 6(5): 29 -31.

36. Zhao CY, Li H, Zhang M ,2006, Optimization on conditions of artificial cultivation of *Cordyceps militaris*, *J Shenyang Agric Univ*, 37: 209 -212.
37. Trịnh Tam Kiệt, 1996, *Danh mục nấm lớn Việt Nam*, Nhà xuất bản Nông nghiệp Hà nội.
38. Phạm Quang Thu, 2009, Điều tra phát hiện nấm Nhộng trùng hạ thảo *Cordyceps nutans* pat. Phân bố khu bảo tồn thiên nhiên Tây Yên Tử - Sơn Động – Bắc Giang, *Tạp chí nông nghiệp và phát triển nông thôn*, tr.91-94.
39. Phạm Thị Thùy, 2010, *Nghiên cứu phát triển các nguồn nấm Beauveria và Metarhizium để ứng dụng phòng trừ sâu hại cây trồng, cây rừng và phát hiện nguồn nấm Cordyceps sp làm thực phẩm chức năng cho người*, Báo cáo tại Hội thảo Quốc gia bệnh hại thực vật Việt Nam, Hà Nội, 39.
40. Phạm Quang Thu, Lê Thị Xuân và Nguyễn Mạnh Hà, 2012, Nghiên cứu đặc điểm sinh học hệ sợi trong nuôi cấy thuần khiết các chủng nấm Đông trùng hạ thảo *Cordyceps militaris* (L.:Fr Link). *Tạp chí Viện khoa học lâm nghiệp Việt Nam*, 5: 28-39.
41. Nguyễn Thị Liên Thương, Trịnh Diệp Phương Danh và Nguyễn Văn Hiệp, 2016, “Nấm đông trùng hạ thảo *Cordyceps militaris*: đặc điểm sinh học, giá trị dược liệu và các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình nuôi trồng nấm”, *Tạp chí khoa học đại học Cần Thơ, Phần : Nông nghiệp, Thủy sản và Công nghệ Sinh học* 44, tr. 9-22.
42. Kunhorm P., Chaicharoenaudomrung N., and Noisa P., 2019, Enrichment of cordycepin for cosmeceutical applications: culture systems and strategies, *Applied microbiology and biotechnology*, 103, 1681-1691.
43. Gao X.H., Wu W., and Qian G.C., 2000, Study on influences of abiotic factors on fruitbody differentiation of *Cordyceps militaris*, *Acta Agric Shanghai*, 16, 93-98.
44. Adnan M., Ashraf S.A., Khan S., Alshammari E., and Awadelkareem A.M, 2017, Effect of pH, temperature and incubation time on cordycepin production from *Cordyceps militaris* using solid-state fermentation on various substrates, *CyTA-Journal of food*, 15, 617-621.

45. Zhang J.Y., Wu K.L., Duan J., and QIAO A., 2010, Influence of air permeability on growth of *Cordyceps militaris*. *Guangdong Agric Sci*, 4, 45-47.
46. Leung P-H and Wu J-Y, 2007, Effects of ammonium feeding on the production of bioactive metabolites (cordycepin and exopolysaccharides) in mycelial culture of a *Cordyceps sinensis* fungus. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 1942-1949.
47. Tuli HS., Sharma AK., and Sandhu SS., 2014, Optimization of fermentation conditions for cordycepin production using *Cordyceps militaris* 3936, *J Biol Chem Sci*, 1, 35–4.
48. Mai Hải Châu và Đặng Thị Ngọc, 2022, Xác định môi trường nhân giống và nuôi tạo quả thể nấm Đông trùng hạ thảo *Cordyceps militaris* theo hướng hữu cơ, *Tạp chí Khoa học và công nghệ lâm nghiệp*, 2.
49. Wen T-C., Kang C., Meng Z-B., Qi Y-B., Hyde KD., and Kang J-C, 2016, Enhanced production of cordycepin by solid state fermentation of *Cordyceps militaris* using additives, *Chiang Mai J Sci*, 43, 972–84.
50. Lee SK., Lee, Ju Hun, Kim HR., Chun Y., Lee Ja Hyun, Yoo HY., *et al.*, 2019, Improved cordycepin production by *Cordyceps militaris* KYL05 using casein hydrolysate in submerged conditions, *Biomolecules*, 9, 461.
51. Chen B-X., Wei T., Xue L-N., Zheng Q-W., Ye Z-W., Zou Y., *et al*, 2020, Transcriptome analysis reveals the flexibility of cordycepin network in *Cordyceps militaris* activated by l-alanine addition, *Frontiers in microbiology*, 11, 577.
52. Wen T.C., Long FY., Kang C., Wang F., and Zeng W., 2017, Effects of additives and bioreactors on cordycepin production from *Cordyceps militaris* in liquid static culture, *Mycosphere*, 8, 886-898.
53. Gao XH., Wu W., and Qian GC, 2000, Study on influences of abiotic factors on fruitbody differentiation of *Cordyceps militaris*, *Acta Agric Shanghai*, 16, 93-98.



54. Kang, Hyun-Hee Lee, Inmyoung Park and Young-Su Seo, 2017, Development of high cordycepin-producing *Cordyceps militaris* strains, *Mycobiology* 45(1): 31-38.
55. Bunnag, S, 2021, Effects of carbon and nitrogen sources on fruiting body formation and cordycepin production of *Cordyceps militaris* (L.) Link. *วารสารแก่น เกษตร*, 49, 274–283.
56. Shrestha B., Han S.-K., Yoon K.-S., and Sung J-M., 2005, Morphological characteristics of conidiogenesis in *Cordyceps militaris*. *Mycobiology*, 33, 69-76.
57. Yin J., Xin X., Weng Y., and Gui Z., 2017, Transcriptome-wide analysis reveals the progress of *Cordyceps militaris* subculture degeneration, *PLoS One*, 12, e0186279.
58. Chen A, Wang Y, Shao Y, and Huang B, 2017, A novel technique for rejuvenation of degenerated caterpillar medicinal mushroom, *Cordyceps militaris* (Ascomycetes), a valued traditional chinese medicine, *International journal of medicinal mushrooms*, 19.
59. Li MN, Wu XJ, Li CY, 2003, Molecular analysis of degeneration of artificial planted *Cordyceps militaris*. *Mycosystema*, 22: 277 -282.
60. Lê Văn Vê, Trần Thu Hà, Nguyễn Thị Bích Thuý và Ngô Xuân Nghiêñ, 2015, Bước đầu nghiên cứu công nghệ nuôi trồng nhông trùng thảo (*Cordyceps 55 militaris* L.ex Fr.) Việt Nam. *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, tập 13, số 3: 445- 454.
61. Lou H., Lin J., Guo L., Wang X., Tian S., Liu C., *et al.*, 2019, Advances in research on *Cordyceps militaris* degeneration. *Applied microbiology and biotechnology*, 103, 7835–7841.
62. Wen TC., Li M., Kang J., and Lei B.X., 2009, A molecular genetic study on the fruiting-body formation of *Cordyceps militaris*, *The Korean Society of Mycology*, 76–95.
63. Xin X., Yin J., Zhang B., Li Z., Zhao S., and Gui Z., 2019, Genome-wide analysis of DNA methylation in subcultured *Cordyceps militaris*. *Archives of microbiology*, 201, 369–375.

64. Wang L., Zhang W.M., Hu B., 2008, Genetic variation of *Cordyceps militaris* and its allies based on phylogenetic analysis of rDNA ITS sequence data, *Fungal Divers* 31:147-155.
65. Yin -J, Xin XD, Weng YJ, Li SH, Jia, JQ, and Gui ZZ, 2018, Genotypic analysis of degenerative *Cordyceps militaris* cultured in the pupa of *Bombyx mori*, *Entomological Research*, 48, 137-144.
66. Vũ Xuân Tạo, Trần Bảo Trâm, Nguyễn Thị Mến, Trương Thị Chiên, Trần Bình Minh, Thái Hạnh Dung, Trần Văn Tuấn, Nguyễn Quang Huy, 2022, Nghiên cứu xác định gen giới tính MAT, năng suất và hàm lượng cordycepin của một số chủng nấm dược liệu *Cordyceps militaris* đang được nuôi trồng tại Việt Nam, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, 64(7),tr. 60 -64.
67. Lin LT, Lai YJ, Wu SC, Hsu WH, Tai CJ, 2018, “Optimal conditions for cordycepin production in surface liquid-cultured *Cordyceps militaris* treated with porcine liver extracts for suppression of oral cancer”, *Journal of Food and Drug Analysis*, 26, pp.135-144
68. Wen T.C., Li M.F., Kang J.C and He J., 2012, A molecular genetic study on fruiting body formation of *Cordyceps militaris*, *Afr. J. Microbiol. Res*, 6 (24): 5215-5221.
69. Thitiphon Chimsook, 2018, Effect of freeze drying and hot air drying methods on quality of cordycepin production. *MATEC Web Conf*, 192 03001.
70. Doyle JJ. 1991, DNA protocols for plants, pp. 283-293. *In Molecular techniques in taxonomy*. (Eds): G. Hewitt, A.W.B. Johnson, and J.P.W. Young. NATO ASI Series H. Cell Biology 57. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
71. TJ White, *et al.*, 1990, “Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics”, *PCR Protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), pp.315-322.

72. Nguyễn Thị Bích Hằng, Triệu Thy Hòa, Đoàn Chí Cường , 2023, Đặc điểm của nấm đông trùng hạ thảo *Cordyceps militaris* nuôi trồng trên cơ chất bã đậu, *Tạp chí Khoa học và công nghệ - Đại học Đà Nẵng* 21(1): 38-42.
73. Trịnh Thị Xuân và Lê Tuấn Anh, 2016, Nghiên cứu môi trường thích hợp cho sản xuất quả thể nấm dược liệu *Cordyceps militaris*. *Tạp chí khoa học trường Đại học Cần Thơ*. Số chuyên đề: Nông nghiệp (Tập 3): 88 – 92.
74. Li CB., Tong XD., Bai J., Fan SD., 2004, Artificial stromata production of *Cordyceps militaris*. *Journal of Dalian National University*, 6(5): 29-31.
75. Dong, J.Z., Lei, C., Ai, X.R., 2012. Selenium enrichment on *Cordyceps militaris* Link and analysis on its main active components. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166: 1215–1224.
76. Đỗ Tuấn Bách, Vũ Hoài Nam, Ma Thị Trang và ctv, 2017, Đánh giá ảnh hưởng của điều kiện nuôi trồng tới khả năng tạo quả thể của nấm đông trùng hạ thảo *Cordyceps militaris*. *Tạp chí Khoa học và công nghệ Đại học Thái Nguyên*, 161(01): 113 – 118.
77. HC Lo, H.Chienyan, Y.L.Fangand T.H.Hsu, 2023, “Asystematicreview ò the mysterious caterpillar fungus *ophiocordyceps sinensis* in DongChong XiaXao and Relates Bioactive ingredients”, *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 3(1), pp:16-33.
78. L Yue, *et al.*, 2005, “*Cordyceps militaris*: ascospore germination and cultural characteristics of progeny population”, *Mycosystema*, 24(4), pp.525-532.
79. J Yin, *et al.*, 2018, “Genotypic analysis of degenerative *Cordyceps militaris* cultured in the pupa of *Bombyx mori*”, *Entomological Research*, 48(3), pp.137-144.

**PHỤ LỤC****Phụ lục 1: Trình tự ITS chủng nấm *Cordyceps militaris* S1**

CATGATCCGAGGTCACG TTCAGAGTTGGGCGTTTTACGGCGTGGCCA  
CGTCGGGTTC CCGGTGCGAGTTGGAGTACTACGCAGAGGTCCGCGC  
GACGGGCCGCCACTTCATTTCCGGGGCGGCGGTGTGCTGCCGGTCCC  
CAACGCCGACATCCCCAGGGGACGTCGAGGGTTGAAATGACGCTC  
GAACAGGCATGCCCGCCAGAATGCTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCA  
AAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCAT  
TTCGCTGCGTTC TTCATCGATGCCAGAGCCAAGAGATCCGTTGTTGA  
AAGTTTTGATTCATTTGTTTTGCCTTGCGGCGGATTCAGAAAACTGG  
TAGATACAGTGTTTGGGGCCCCCGACGGCCGCCGCCAGGCCCGCGT  
CCAGGCGCTGGGCGAGTCCGCCGAAGCAACGATAGGTATGTTTACA  
AAGGGTTGGGAGTTGGAAA ACTCGTTAATGATCCCTCCGCAGGTCMA  
CCTACGGAA