

Nghiên cứu công nghệ nhân giống cấp I và dịch thể nấm Địa sâm *Coprinus comatus* (Co)

Phạm Thị Thu, Cồ Thị Thùy Vân, Trần Thu Hà, Nguyễn Duy Trình*

Trung tâm Nghiên cứu và phát triển nấm, Viện Di truyền nông nghiệp

Ngày nhận bài 26/4/2016, ngày chuyển phản biện 29/4/2016, ngày nhận phản biện 23/5/2016, ngày chấp nhận đăng 27/5/2016

Nấm Địa sâm - *Coprinus comatus* (O.F. Mull.) được biết đến nhiều trên thế giới nhờ có giá trị dược liệu và dinh dưỡng cao. Nhằm xác định những điều kiện phù hợp cho sợi nấm Địa sâm sinh trưởng trong môi trường nhân giống cấp I và dạng dịch thể, các tác giả đã tiến hành nghiên cứu và xác định được môi trường nuôi cấy phù hợp nhất là PDPYA và YEPD. Nhiệt độ, pH và thời gian chiếu sáng tối ưu cho sự sinh trưởng của nấm Địa sâm trong điều kiện nhân giống cấp I lần lượt là $25\pm 1^\circ\text{C}$, pH = 6-7 và 0 h. Trong môi trường nhân giống dịch thể nấm Địa sâm, pH, nhiệt độ, nguồn carbon và nitơ tối ưu lần lượt là pH = 7,0; $25\pm 1^\circ\text{C}$; sucrose và peptone, cao nấm men.

Từ khóa: Địa sâm, giống cấp I, giống dịch thể.

Chỉ số phân loại 4.1

Investigation on Propagation Technology of Master Spawn and Liquid Spawn of Shaggy Ink Cap (*Coprinus comatus* (Co))

Summary

Shaggy ink cap - *Coprinus comatus* (O.F. Mull.) has been known worldwide due to its great medicinal and nutritional values. The aim of this study was to acquire basic data regarding the suitable conditions for *C. comatus* mycelium growth in culture medium. The results of the study illustrated that PDPYA and YEPD were the most suitable culture media for cultivation of *C. comatus*. The optimal temperature, pH, and the length of lightening time for the mycelium growth of *C. comatus* master spawn were $25\pm 1^\circ\text{C}$, pH = 6-7, and 0 h, respectively. The pH, temperature, carbon and nitrogen sources for optimal growth of liquid spawn in submerged medium were pH = 7.0; $25\pm 1^\circ\text{C}$; sucrose and peptone, yeast extract, respectively.

Keywords: liquid spawn, master spawn, shaggy Ink Cap.

Classification number 4.1

Đặt vấn đề

Nấm Địa sâm (nằm trong chi *Coprinus*, họ Coprinaceae, ngành nấm đảm) có nhiều đặc tính dược liệu quý, được sử dụng để điều trị bệnh tiểu đường, tuần hoàn máu, rối loạn tiêu hóa, ức chế khối u [1].

Nhiều nghiên cứu về công nghệ nhân giống và nuôi trồng Địa sâm đã được công bố trên thế giới. Theo Dong và cs (2006) [2], môi trường nhân giống dịch thể phù hợp cho nấm Địa sâm là sucrose 3%, cám ngô 2%, cám mỳ 4%, KH_2PO_4 0,1% và $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05%, pH = 8,0. MYP (5% pepton, 3% cao nấm men, 3% malt extract, agar 20 g/l) là môi trường nhân giống gốc và cấp I phù hợp cho nấm Địa sâm sinh trưởng ở nhiệt độ $23-26^\circ\text{C}$ và pH = 6-8 [3]. Môi trường MEA (20 g/l dextrose, 1 g/l peptone, 20 g/l cao malt, 20 g/l agar) có thể được sử dụng làm môi trường nhân giống nấm Địa sâm [4]. Nguồn carbon và nitơ tối ưu cho sự sinh trưởng và phát triển của nấm Địa sâm là sucrose và tryptone [3]. Theo Chen (2000), Yang và Xue (2000), Shiyong và Zaipei (2007) [5-7], nấm Địa sâm sinh trưởng tốt trong môi trường có pH = 6,5-7,5. Trong khi đó, nghiên cứu của Kim (2000) [8] cho thấy, phạm vi nhiệt độ nuôi cấy tối ưu của nấm Địa sâm là $25-27^\circ\text{C}$, còn theo Yang và Xue (2000) [6] là $24-28^\circ\text{C}$ và Shiyong và Zaipei (2007) [7] là $22-28^\circ\text{C}$.

Mặc dù có nhiều giá trị dinh dưỡng và giá trị dược liệu nhưng nấm Địa sâm hiện vẫn là đối tượng mới mẻ, chưa nhận được sự quan tâm của ngành trồng nấm Việt Nam. Với mục tiêu đa dạng hóa nguồn gen sinh học, tạo cơ sở cho phát triển nấm Địa sâm, nâng cao năng suất và chất

*Tác giả liên hệ: Email: nguyenduytrinh2011@gmail.com

lượng, chúng tôi tiến hành đánh giá một số yếu tố ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của nấm Địa sâm trong cả 2 môi trường nhân giống cấp I và dạng dịch thể.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

Giống nấm Địa sâm *Coprinus comatus* (O.F. Mull.) ký hiệu Co được Trung tâm Nghiên cứu và phát triển nấm - Viện Di truyền nông nghiệp nhập nội từ Trung tâm Nghiên cứu nấm châu Á - Thái Bình Dương (Phúc Kiến - Trung Quốc).

Phương pháp nghiên cứu

Nhân giống cấp I:

Môi trường nhân giống: giống gốc nấm Địa sâm được cấy chuyển sang cấp I trên 4 môi trường khác nhau: PGA, PDPYA, GPA và YEPD (bảng 1).

Bảng 1: thành phần môi trường nhân giống cấp I nấm Địa sâm

Môi trường Thành phần (g/l)	PGA	PDPYA	GPA	YEPD
Glucose	20,0	-	10,0	20,0
Cao nấm men	-	0,5	-	10,0
Peptone	-	2,0	2,0	20,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	-	-	0,5	-
KH ₂ PO ₄	-	-	0,5	-
Khoai tây	200,0	100,0	-	-
Agar	15,0	15,0	15,0	15,0
pH	7,0	7,0	7,0	7,0

Ghi chú: - : không xác định

pH môi trường nhân giống: môi trường được sử dụng để làm môi trường nhân giống dựa theo kết quả của môi trường nhân giống. Đánh giá đặc điểm sinh trưởng hệ sợi giống nấm Địa sâm tại các ngưỡng pH môi trường là 5, 6, 7 và 8.

Nhiệt độ nhân giống: nhân giống cấp I nấm Địa sâm ở các ngưỡng nhiệt độ khác nhau: 10±1°C, 15±1°C, 20±1°C, 25±1°C, 30±1°C và 35±1°C.

Chế độ ánh sáng nhân giống: sử dụng 4 chế độ ánh sáng (thời gian chiếu sáng/ngày): 24 h, 12 h, 6 h và 0 h với cường độ ánh sáng đèn led 500 lux.

Đặc điểm sinh trưởng, phát triển hệ sợi giống cấp I nấm Địa sâm: chỉ tiêu đánh giá đặc điểm sinh trưởng hệ sợi gồm đường kính sinh trưởng hệ sợi và mật độ hệ sợi. Phương pháp đánh giá mật độ hệ sợi như sau: 1) Mật độ sợi rất mỏng; 2) Mật độ hệ sợi mỏng; 3) Mật độ sợi trung bình; 4) Mật độ sợi dày; 5) Mật độ hệ sợi

dày đặc.

Nhân giống dịch thể:

pH môi trường dịch thể: môi trường YMK (20 g/l glucose, 5 g/l cao nấm men, 1 g/l MgSO₄.7H₂O, 2 g/l KH₂PO₄) được sử dụng làm môi trường nhân giống. Đánh giá các ngưỡng pH môi trường: 5, 6, 7 và 8.

Nhiệt độ môi trường: giống nấm Địa sâm cấy trong 250 ml môi trường dịch thể có pH tối ưu và nuôi ở các ngưỡng nhiệt độ (15, 20, 25 và 30°C)±1°C trong 4 ngày, tốc độ lắc 150 vòng/phút.

Nguồn carbon trong môi trường nhân giống: nguồn carbon 2% (w/v), cao nấm men 5 g/l, MgSO₄.7H₂O 1 g/l và KH₂PO₄ 2 g/l. Nguồn carbon khảo sát gồm: fructose, galactose, glucose, lactose, maltose, mannose, sucrose.

Nguồn nitơ trong môi trường nhân giống: các nguồn nitrogen có nồng độ 5 g/l được đánh giá gồm: cao nấm men, peptone, natri nitrat (NaNO₃), amoni nitrat (NH₄NO₃).

Đánh giá sinh khối sợi: phương pháp đánh giá sinh khối sợi theo Park và cs (2001) [9].

Đánh giá mật độ khuẩn lạc cầu (KLC): mật độ KLC được xác định bằng số lượng KLC trong 10 ml dịch giống. Sử dụng kính Opitika Microscopes (Italia) có kết nối máy tính để đếm số lượng của KLC.

Phương pháp xử lý số liệu:

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

Kết quả và thảo luận

Ảnh hưởng của môi trường nhân giống, pH, nhiệt độ và ánh sáng đến sự sinh trưởng và phát triển của nấm Địa sâm trong giai đoạn nhân giống cấp I

Bốn loại môi trường đang được sử dụng phổ biến hiện nay trong nhân giống nấm gốc và cấp I là: PGA, PDPYA, YEPD, GPA. Căn cứ vào các chỉ tiêu theo dõi, kết quả ghi nhận 2 môi trường PDPYA và YEPD phù hợp cho nấm Địa sâm phát triển. Mật độ hệ sợi dày đặc, phát triển dạng tỏa tròn, đều. So với kết quả của một số nghiên cứu đã được công bố trên thế giới, kết quả trong nghiên cứu này có một số sự khác biệt.

Theo Myoung-Jun (2009) [3], môi trường phù

hợp cho nấm Địa sâm phát triển là môi trường MYP (peptone 5 g/l, cao malt 3 g/l, cao nấm men 3 g/l và agar 20 g/l), còn Chaiyama và cs (2007) [4] là môi trường MEA (20 g/l dextrose, 1 g/l peptone, 20 g/l cao malt và 20 g/l agar). Có sự khác biệt về kết quả giữa các nghiên cứu có thể do sự khác nhau về chủng giống được sử dụng làm đối tượng trong thí nghiệm.

Đối với kết quả nghiên cứu pH, 4 giá trị pH được đánh giá là 5, 6, 7 và 8. Kết quả thí nghiệm cho thấy, môi trường có pH = 6,0-7,0 hệ sợi sinh trưởng tốt, tốc độ phát triển nhanh, mật độ sợi dày đặc, ở pH = 5,0 hoặc pH = 8,0 tốc độ sinh trưởng của hệ sợi tương đối chậm, mật độ hệ sợi ở mức trung bình. Kết quả nghiên cứu này phù hợp với nghiên cứu của Myoung-Jun (2009) và Chaiyama (2007). Theo nghiên cứu của Chen (2000), Yang và Xue (2000), Shiyong và Zaipei (2007) [5-7] thì sợi nấm Địa sâm sinh trưởng tốt trong môi trường có pH = 6,5-7,5.

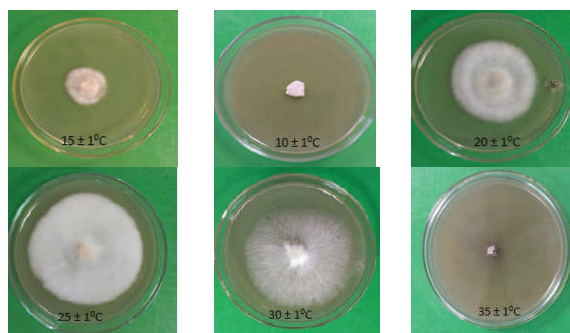
Với yếu tố nhiệt độ được quan sát ở các ngưỡng khác nhau ($10\pm 1^\circ\text{C}$, $15\pm 1^\circ\text{C}$, $20\pm 1^\circ\text{C}$, $25\pm 1^\circ\text{C}$, $30\pm 1^\circ\text{C}$ và $35\pm 1^\circ\text{C}$), kết quả cho thấy, ở $25\pm 1^\circ\text{C}$, hệ sợi màu trắng, phát triển nhanh dạng tỏa tròn đều, đường kính hệ sợi $67,83\pm 2,46$ mm; ở ngưỡng $10\pm 1^\circ\text{C}$, sợi nấm phát triển kém, hệ sợi rất mỏng; ở 30°C , hệ sợi phát triển nhanh nhưng mật độ hệ sợi thưa. Đặc biệt, sợi nấm Địa sâm không thể phát triển trên môi trường nhân giống cấp I trong điều kiện nhiệt độ 35°C . Do đó, ngưỡng $25\pm 1^\circ\text{C}$ là nhiệt độ thích hợp cho công tác nhân giống cấp I nấm Địa sâm. Kết quả này tương đồng với các nghiên cứu đã được công bố trước đó.

Bảng 2: ảnh hưởng của môi trường, pH, nhiệt độ và thời gian chiếu sáng đến đường kính sinh trưởng và mật độ hệ sợi nấm Địa sâm trên môi trường nhân giống cấp I

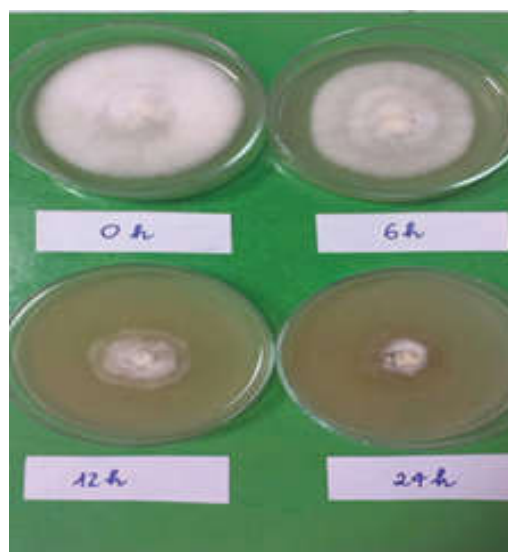
Chi tiêu		Đường kính (mm)	Mật độ
Nhân tố			
Môi trường	PGA	$51,90\pm 3,46^a$	5+
	PDPYA	$54,03\pm 2,42^b$	5+
	YEPD	$53,64\pm 2,56^b$	5+
	GPA	$49,39\pm 2,99^a$	3+
pH	5,0	$44,16\pm 1,77^a$	3+
	6,0	$55,45\pm 1,63^b$	5+
	7,0	$54,35\pm 1,62^b$	5+
	8,0	$49,35\pm 1,42^c$	3+
Nhiệt độ ($^\circ\text{C}$)	10 ± 1	$9,64\pm 1,83^a$	1+
	15 ± 1	$20,77\pm 2,34^b$	2+
	20 ± 1	$52,37\pm 1,73^c$	5+
	25 ± 1	$67,83\pm 2,46^d$	5+
	30 ± 1	$65,47\pm 1,17^d$	2+
	35 ± 1	-	-
Thời gian chiếu sáng (h/ngày)	0	$67,25\pm 2,08^a$	5+
	6	$53,32\pm 2,00^b$	3+
	12	$26,51\pm 2,28^c$	2+
	24	$9,67\pm 1,81^d$	1+

Ghi chú: trong phạm vi cùng một cột, cùng một nhân tố thí nghiệm, các giá trị mang các chữ cái khác nhau chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức $p < 0,05$

Kết quả bảng 2 cho thấy, ánh sáng ảnh hưởng rõ rệt đến sự phát triển của hệ sợi nấm Địa sâm trong môi trường nhân giống cấp 1. Ở điều kiện tối hoàn toàn, hệ sợi phát triển nhanh, đường kính sinh trưởng đạt $67,25\pm 2,08$ mm, sợi màu trắng, bông xốp, phát triển tỏa đều trên bề mặt môi trường. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Miles (1993) [10]. Trong điều kiện chiếu sáng 24 giờ, sợi phát triển kém, đường kính sinh trưởng chỉ đạt $9,67\pm 1,81$ mm, sợi mảnh không nhìn rõ tua sợi. Thời gian chiếu sáng 6 và 12 h cũng ảnh hưởng nhất định đến tốc độ phát triển và đặc điểm hình thái của sợi. Sợi nấm Địa sâm phát triển không cân đối trên bề mặt môi trường, có nhiều vòng tròn đồng tâm, màu trắng vàng nhạt khi được chiếu sáng 6 h/ngày. Mật độ hệ sợi có sự thay đổi rõ ràng khi được chiếu sáng 12 h/ngày. Mật độ hệ sợi mỏng, màu trắng vàng, sợi mảnh. Đường kính sinh trưởng hệ sợi chỉ đạt $26,51\pm 2,28$ mm.



Hình 1: ảnh hưởng của nhiệt độ đến nấm Địa sâm trên môi trường nhân giống cấp 1



Hình 2: ảnh hưởng của thời gian chiếu sáng đến sự phát triển và đặc điểm hình thái của nấm Địa sâm trên môi trường nhân giống cấp 1

Ảnh hưởng của pH, nhiệt độ, nguồn carbon, nito đến sự hình thành và phát triển KLC của nấm Địa sâm trong môi trường nhân giống dịch thể

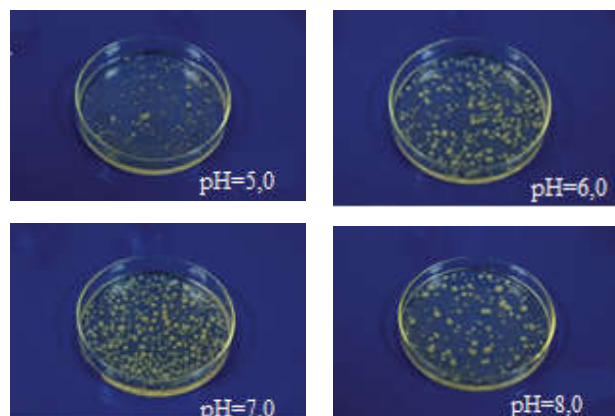
pH là nhân tố ảnh hưởng đến sinh khối, khả năng hấp phụ chất dinh dưỡng, hình thái và cấu trúc tế bào, độ tan của muối và trạng thái ion của cơ chất, hoạt động của enzyme [11]. Nấm Địa sâm được nhân giống trên môi trường YMK với 4 ngưỡng pH khác nhau (5, 6, 7 và 8). Căn cứ vào sinh khối sợi và mật độ KLC (bảng 3) cho thấy, pH tối ưu là 7,0 với sinh khối khô $10,72 \pm 0,48$ g/l, mật độ KLC dày $68 \pm 1,35$ KLC/10 ml dịch giống.

Theo Vladimir (2012) [11], dải nhiệt từ 25 đến 28°C là phù hợp nhất để hầu hết các loài nấm nhân sinh khối. Để tìm ra nhiệt độ phù hợp cho sự hình thành và phát triển của KLC nấm Địa sâm, chúng tôi đã nghiên cứu đánh giá sự sinh trưởng hệ sợi nấm ở 5 ngưỡng nhiệt độ: $10 \pm 1^\circ\text{C}$, $15 \pm 1^\circ\text{C}$, $20 \pm 1^\circ\text{C}$, $25 \pm 1^\circ\text{C}$ và $30 \pm 1^\circ\text{C}$. Kết quả ghi nhận, nhiệt độ $25 \pm 1^\circ\text{C}$ phù hợp nhất cho nấm Địa sâm phát triển.

Carbon và nito là 2 nhân tố cơ bản cho sự sinh trưởng của vi sinh vật. Nguồn carbon ảnh hưởng đến quá trình sinh trưởng và chuyển hóa của vi sinh vật. Giống nấm Địa sâm được nhân giống trong môi trường chứa các nguồn carbon khác nhau (fructose, glucose, lactose, maltose, sucrose). Trong các nguồn carbon được khảo sát, sucrose cho năng suất sinh khối khô cao nhất ($11,11 \pm 1,25$) với mật độ KLC ($64 \pm 1,62$). Nhiều nghiên cứu trên thế giới đã thu được kết quả tương tự, sucrose là nguyên liệu phù hợp để cung cấp nguồn carbon cho nấm Địa sâm trong môi trường nhân giống dịch thể [2, 3]. Trong khi kết quả nghiên cứu của Chaiyama và cs (2007) [4] cho rằng, mannose và maltose mới là 2 nguồn nguyên liệu cung cấp carbon phù hợp hơn cho sự phát triển của nấm Địa sâm. Nito là nhân tố cần thiết trong tổng hợp enzyme trong cả quá trình chuyển hóa sơ cấp và thứ cấp. 4 nguồn nito đã được khảo sát gồm: cao nấm men, peptone, natri nitrat, amoni nitrat.

Bảng 3: ảnh hưởng của pH, nhiệt độ, nguồn carbon, nguồn nito đến sinh khối sợi và mật độ KLC nấm Địa sâm trong môi trường nhân giống dịch thể

Chỉ tiêu		Sinh khối sợi (g/l)	Mật độ KLC
Nhân tố			
pH	5,0	3,88±0,62 ^a	28±1,18
	6,0	9,14±0,56 ^b	52±1,28
	7,0	10,72±0,48 ^c	68±1,35
	8,0	5,14±0,88 ^d	35±0,99
Nhiệt độ (°C)	10±1	3,58±0,33 ^a	25±1,09
	15±1	4,52±0,55 ^b	35±1,15
	20±1	9,83±1,11 ^c	56±1,58
	25±1	11,38±1,10 ^d	70±2,56
	30±1	8,65±0,82 ^c	49±1,03
Nguồn carbon (2%)	Fructose	10,13±1,28 ^a	51±1,56
	Maltose	10,71±1,14 ^{a,c}	57±1,30
	Glucose	10,52±1,05 ^a	58±1,13
	Lactose	7,73±1,15 ^b	30±1,39
	Sucrose	11,11±1,25 ^c	64±1,62
Nguồn nito (0,5%)	Cao nấm men	11,60±2,44 ^a	67±1,57
	Peptone	11,69±1,85 ^a	64±0,93
	Natri nitrat	4,88±1,37 ^b	40±0,96
	Amoni nitrat	5,05±1,10 ^b	44±1,15



Hình 3: ảnh hưởng của pH môi trường đến hình thái và mật độ KLC nấm Địa sâm trong môi trường dịch thể

Kết quả ghi nhận có thể sử dụng cao nấm men hoặc peptone để cung cấp nguồn nitrogen cho nấm Địa sâm trong môi trường nhân giống dịch thể. Theo Myoung-Jun (2009) [3], nguồn nito hữu cơ cho hiệu quả nhân giống tốt hơn so với nguồn nito vô cơ (NaNO_3 , NH_4NO_3 và NH_4Cl).

Kết luận

Môi trường nhân giống cấp I phù hợp cho nấm Địa sâm là PDPYA hoặc YEPD. Nhiệt độ, pH và thời gian chiếu sáng tối ưu cho sự sinh trưởng của giống nấm Địa sâm cấp I lần lượt là $25 \pm 1^\circ\text{C}$, pH = 6-7 và 0 h. Giống nấm dịch thể Địa sâm phát triển tốt trong điều kiện pH, nhiệt độ, nguồn carbon và nito lần lượt là pH = 7,0; $25 \pm 1^\circ\text{C}$; sucrose và peptone, cao nấm men.

Tài liệu tham khảo

- [1] G.R. Renato, L.M.A.L. Lani, K. Kei, P.K. Sofronio, K. Tadahiro, E. Fumio (2009), “*Coprinus comatus*, a newly domesticated wild nutraceutical mushroom in the Philippines”, *Journal of Agricultural Technology*, **5**(2), pp.299-316.
- [2] Y.H. Dong, H.Q. Wang, L.Y. Qiu (2006), “Optimization of a liquid growth medium for *Copinus comatus*”, *Acta Edulis Fungi*, **13**, pp.29-31.
- [3] Myoung-Jun Jang, Yun-Hae Lee, Jun-Jie Liu, Young-Cheol Ju (2009), “Optimal Conditions for the Mycelial Growth of *Coprinus comatus* Strains”, *Mycobiology*, **37**(2), pp.103-108.
- [4] V. Chaiyama, V. Petcharat, P. Kritsaneepaiboon (2007), “Some morphological and physiological aspects and cultivation of *Copinus comatus* (O.F. Mull.) Gray. Songklanakarin”, *J. Sci. Technol*, **29**, pp.261-274.
- [5] M.M. Chen (2000), “Cultivation techniques for Dictyophora, Polyporus umbellata, *Copinus comatus*. Science and cultivation of edible fungi”, *Mushroom Science*, **2**, pp.543-548.
- [6] G.L. Yang, H.B. Xue (2000), “Specialized cultivation manual about edible and medicinal mushroom”, *China Agricultural Press*, pp.361-368.
- [7] J. Shiyong, J. Zaipei (2007), “Mushroom cultivation techniques”, *Chemical Industry Press*, pp.118-122.
- [8] Y.G. Kim (2000), “Studies on the morphology characteristics of *Coprinus* species and artificial cultivation of *C. comatus*. Master’s degree thesis”, *Chungnam National University*, Korea.
- [9] J.P. Park, S. Kim, H.J. Hwang, J.W. Yun (2001), “Optimization of submerged culture conditions for the mycelia growth and exo-biopolymer production by *Cordyceps militaris*”, *The Society for Applied Microbiology*, **33**, pp.76-81.
- [10] P.G. Miles (1993), “Biological background for mushroom breeding. In Genetics and breeding of Edible Mushroom”, *Gorden and Breach Science publishers*.
- [11] E. Vladimir (2012), “Submerged Cultivation of Medicinal Mushrooms: Bioprocesses and Products”, *International Journal of Medicinal Mushrooms*, **14**(3), pp.211-239.