

TỐI ƯU HÓA QUY TRÌNH NHÂN GIỐNG NẤM SỮA (*Calocybe indica*) DẠNG DỊCH THỂ

Nguyễn Trần Đức Duy^{1*}, Lương Thị Ngọc Hân¹, Đỗ Thị Như Thảo¹,
Nguyễn Phạm Trúc Phương¹, Lê Thành Hưng¹, Hoàng Đức Hiệt¹, Nguyễn Thị Loan¹

TÓM TẮT

Quy trình nuôi trồng nấm sữa sử dụng meo dạng dịch thể thay cho meo cọng và meo hạt khi nhân giống giúp rút ngắn đáng kể thời gian nuôi trồng, nâng cao hiệu quả kinh tế. Kết quả nghiên cứu cho thấy các thông số của quy trình nhân giống nấm sữa dạng dịch thể ở quy mô 1.000 mL như sau: nhiệt độ và pH thích hợp cho nuôi cấy hệ sợi trên môi trường lỏng lần lượt là 30°C và pH = 7,0; nguồn dinh dưỡng carbon và nitơ phù hợp cho sinh trưởng hệ sợi trên môi trường lỏng là glucose và cao đậu nành. Thành phần môi trường tối ưu cho quy trình nhân giống nấm sữa (*Calocybe indica*) dạng dịch thể gồm: glucose 24,764 g/L; cao đậu nành 8,437 g/L và thiamin 19,625 µg/L trong 1.000 mL môi trường nuôi cấy, khối lượng sinh khối khô thực tế đạt 376,25 mg.

Từ khóa: Nấm sữa (*Calocybe indica*), meo lỏng, lên men dịch thể

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nấm sữa thuộc ngành Basidiomycetes, bộ Agaricales, chi *Calocybe*, loài *Calocybe indica*, lần đầu tiên được xác định ở bang Tây Bengal ở Đông Ấn Độ (Balan *et al.*, 2015). Đây là một loại nấm mới, có giá trị kinh tế rất cao, được nhiều cơ sở đưa vào sản xuất đại trà (Alam *et al.*, 2008). Quả thể nấm có màu trắng đồng nhất, mũ có đường kính 10 đến 14 cm, các phiến màu trắng và thân hình trụ có chiều cao trên 10 cm không có vòng hoặc bao gốc, đế dưới lòng đất có chiều rộng 1,8 cm ở đỉnh, 3,5 cm ở giữa và 2,4 cm ở chân đế. Thịt nấm có hương thơm nhẹ, vết in bào tử có màu trắng và các bào tử hình oval dài 5,9 - 6,8 mm dài 4,2 - 5,1 mm (Balan *et al.*, 2015). Nấm sữa (*Calocybe indica*) là một loại nấm ăn có giá trị dinh dưỡng cao với protein chiếm 21,4 ± 1,86%, lipid 4,95 ± 0,40%, carbohydrate 48,5 ± 2,40%, chúng còn chứa các khoáng chất cần thiết như Ca, Fe, Zn, Mg, Mn, Se, As (Cổ Thị Thùy Vân và cs., 2019).

Mặc dù đã được sản xuất đại trà nhưng quy trình nhân giống nấm sữa vẫn còn nhiều vấn đề cần nghiên cứu hoàn thiện. Nhiều hộ nông dân và trang trại sản xuất vẫn gặp nhiều vấn đề trong giai đoạn nhân giống vì thời gian lan tơ của nấm sữa chậm, mất từ 15 đến 20 ngày đã làm tăng thời gian sản xuất, giảm hiệu quả kinh tế. Do đó, ứng dụng kỹ thuật nhân giống dạng dịch thể vào quy trình nuôi trồng nấm sữa là điều cần thiết vì kỹ thuật này sẽ giải quyết được các vấn đề về tính ổn định của quy trình nhân giống, thời gian sản xuất và giảm thiểu rủi ro trong khâu nuôi trồng.

Việc xây dựng quy trình nhân giống nấm sữa dạng dịch thể không chỉ góp phần giải quyết được các vấn đề về kỹ thuật nhân giống và nuôi trồng nấm sữa mà còn là cơ sở để tiến hành nghiên cứu hoặc ứng dụng quy trình nhân giống dạng dịch thể vào sản xuất các loại nấm ăn và nấm dược liệu khác ở nước ta. Nghiên cứu cũng bổ sung thông tin về phân loại, nguồn gốc xuất xứ, đặc điểm nông sinh học chính và thành phần dinh dưỡng, giá trị kinh tế của nấm sữa.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Giống nấm sữa (*Calocybe indica*) thuộc bộ giống nấm của Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Nông nghiệp Công nghệ cao. Đây là giống nấm sữa thương mại được Trung tâm thu thập năm 2014.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khảo sát các điều kiện môi trường ảnh hưởng đến nuôi sinh khối hệ sợi của giống nấm sữa (*Calocybe indica*)

Giống nấm sữa được nuôi cấy trên môi trường thạch đĩa PDA (dịch khoai tây 200 g; glucose 20 g; agar 20 g; nước cất 1.000 mL). Chọn những đĩa giống có tơ nấm khoẻ mạnh, chất lượng đồng đều nhất, dùng dụng cụ khoan những mẫu thạch với đường kính 5 mm, sau đó chuyển mẫu thạch này vào 9 nghiệm thức (NT1 - NT9) trong bình tam giác thể tích 100 mL có chứa 40 mL môi trường PDB (dịch khoai tây 200 g; glucose 20 g; nước cất 1.000 mL) để nuôi cấy với 3 mức pH khác nhau (pH= 6,0; 6,5; 7,0). Những bình tam giác này sẽ được ủ tối ở các nhiệt độ 20°C, 25°C, 30°C, nuôi cho đến khi có

¹ Phòng Thí nghiệm Bảo tồn Lai tạo và Phát triển giống Nấm, Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Nông nghiệp Công nghệ cao

* Tác giả liên hệ, email: duy.reus97@gmail.com

bình đầu tiên của nghiệm thức đó lan kín tơ. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần, mỗi lần 9 bình.

Chỉ tiêu theo dõi: Khối lượng sinh khối khô (mg). Dùng màng lọc để thu nhận sinh khối khô và mang đi sấy khô ở nhiệt độ 60°C đến khối lượng không đổi để xác định khối lượng.

2.2.2. Khảo sát nguồn dinh dưỡng ảnh hưởng đến sinh trưởng của hệ sợi nấm sữa (*Calocybe indica*) trên môi trường lỏng

Chọn 1 môi trường gốc (có thành phần dinh dưỡng gồm: 15 g glucose; 4,5 g cao nấm men; 0,5 g $MgSO_4$; 2 g K_2HPO_4 , 20 μg thiamin) để khảo sát ảnh hưởng của các nguồn dinh dưỡng như sau: Nguồn carbon: saccharose, glucose, mật rỉ đường.

Cố định các thành phần khác trong môi trường gốc, thay đổi yếu tố carbon để pha 1 lít môi trường nuôi cấy lỏng. Cấy chuyển những mẫu thạch môi trường PDA có tơ nấm khoẻ mạnh (đường kính 5 mm) vào 9 bình tam giác chứa 40 mL môi trường nuôi cấy.

Nguồn nitơ: cao thịt, cao nấm men, cao lúa mạch (cao malt), cao đậu nành.

Cố định các thành phần khác trong môi trường gốc, thay đổi yếu tố nitơ để pha 1 lít môi trường nuôi cấy lỏng. Cấy chuyển những mẫu thạch môi trường PDA có tơ nấm khoẻ mạnh (đường kính 5 mm) vào 9 bình tam giác chứa 40 mL môi trường nuôi cấy.

Nhiệt độ nuôi ủ tối và pH của môi trường nuôi cấy như đã xác định ở thí nghiệm 1. Lặp lại thí nghiệm 3 lần. Kết quả thu được tiến hành phân tích thống kê bằng phần mềm Minitab16 để xác định nguồn cacbon và nitơ nào giúp sinh trưởng của hệ sợi nấm đạt được tối ưu.

Chỉ tiêu theo dõi: Khối lượng sinh khối khô (mg).

Phương pháp thu hệ sợi khô, tính năng suất/bình/lít môi trường.

2.2.3. Tối ưu hóa thành phần môi trường nuôi cấy hệ sợi nấm Sữa dạng dịch thể

a) Bước 1: Tối ưu hóa đơn yếu tố

Từ kết quả nội dung 2 chọn được nguyên liệu cung cấp thành phần môi trường nuôi cấy. Sau đó thay đổi biên độ của nguồn carbon, nitơ, khoáng, vitamin như bảng 1. Khi thay đổi biên độ của từng thành phần thì cố định các thành phần còn lại theo môi trường gốc.

Bảng 1. Biên độ khảo sát của các thành phần môi trường nuôi cấy

Tên thành phần	Biên độ khảo sát				
Carbon (g/L)	5	10	15	20	25
Nitơ (g/L)	2	4	6	8	10
$MgSO_4$ (g/L)	0,3	0,5	0,7	0,9	1,1
K_2HPO_4 (g/L)	1	2	3	4	5
Thiamin ($\mu g/L$)	10	15	20	25	30

Chỉ tiêu theo dõi: Khối lượng sinh khối khô (mg).

Nồng độ các thành phần dinh dưỡng trong biên độ khảo sát được chọn ở mức dao động quanh hàm lượng dinh dưỡng từ môi trường gốc.

b) Bước 2: Khảo sát cùng lúc nhiều yếu tố

Sử dụng phần mềm Design Expert® 7.0 thực hiện thí nghiệm Plackett - Burman gồm 5 yếu tố: carbon (nguồn carbon chọn được ở nội dung 2), nitơ (nguồn nitơ chọn được ở nội dung 2), $MgSO_4$, K_2HPO_4 , thiamin với 2 mức, mức cao (+1) và mức thấp (-1).

c) Bước 3: Kiểm tra biến

Mô hình kiểm tra các biến thử nghiệm cần thiết sinh khối hệ sợi tối ưu bằng thiết kế Box-Behnken và phương pháp bề mặt đáp ứng. Trong nghiên cứu này, xác định giá trị tối ưu của ba yếu tố chính từ kết quả sàng lọc thu được và được nghiên cứu ở 3 mức (-1, 0 và +1) với 17 thí nghiệm trong đó có 5 thí nghiệm ở tâm.

2.2.4. Xử lý số liệu

Các số liệu thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2010 và phần mềm thống kê Minitab 18, Design Expert® 7.0 Stat-Ease, Inc., Minneapolis, Hoa Kỳ. Kết quả phân tích ANOVA với độ tin cậy 95%, so sánh sự khác biệt có ý nghĩa của các số liệu biểu diễn giá trị trung bình.

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 01/2023 đến tháng 12/2023 tại Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Nông nghiệp Công nghệ cao.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của điều kiện môi trường đến sinh khối hệ sợi của giống nấm sữa (*Calocybe indica*)

Nấm sữa được nuôi trong bình tam giác có chứa 40 mL môi trường PDB ở điều kiện tối với 3 mức pH và nhiệt độ khác nhau, xác định thời gian khi sợi nấm lan kín trong bình và khối lượng sinh khối khô để đánh giá ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy đến sinh trưởng, phát triển của nấm sữa.

Kết quả bảng 2 cho thấy, nhiệt độ và pH có ảnh hưởng đến điều kiện nuôi sinh khối hệ sợi của giống nấm sữa với sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ($P < 0,05$). Ở nhiệt độ 30°C, pH = 7,0, hệ sợi nấm sữa phát triển nhanh nhất. Bên cạnh đó, các bình môi trường ở điều kiện 30°C và được điều chỉnh pH = 7,0 là những bình đầu tiên có hệ sợi phát triển kín bề mặt của bình dung dịch nuôi cấy sau $13,67^d \pm 0,58$ ngày cũng có khối lượng sinh khối khô cao nhất ($302,00^a \pm 2,65$ mg) và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại nên đó là điều kiện thích hợp để nuôi sinh khối hệ

sợi giống nấm sữa. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của một số tác giả khác, theo Josephine và Sahana (2014) nấm sữa cũng có thể phát triển tốt ở nhiệt độ $28 \pm 3^\circ\text{C}$; nấm có khả năng sinh trưởng thích hợp nhất trong môi trường trung tính pH = 7,0 (Cooke & Whipps, 1993). Kết quả theo dõi được trong quá trình nghiên cứu này cho thấy, điều kiện nhiệt độ nuôi 30°C và môi trường có pH = 7,0 là điều kiện tối ưu cho môi trường nuôi cấy lỏng của nấm sữa nên sẽ được chọn áp dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nhiệt độ, pH đến sinh trưởng của hệ sợi nấm sữa trên môi trường PDB nồng độ 24 g/L

Nhiệt độ và pH	Ký hiệu nghiệm thức	Khối lượng sinh khối khô (mg/bình/lít môi trường)	Thời gian có bình đầu tiên lan kín tơ (ngày)
20°C; 6,0	NT1	$175,67^e \pm 1,53$	$22,67^a \pm 0,58$
20°C; 6,5	NT2	$192,33^d \pm 2,08$	$22,33^a \pm 0,58$
20°C; 7,0	NT3	$176,00^e \pm 3,61$	Không lan kín tơ
25°C; 6,0	NT4	$121,33^f \pm 1,53$	Không lan kín tơ
25°C; 6,5	NT5	$232,67^b \pm 2,52$	$17,67^b \pm 0,58$
25°C; 7,0	NT6	$232,33^b \pm 3,21$	$19,67^{bc} \pm 0,58$
30°C; 6,0	NT7	$204,67^c \pm 5,51$	$18,67^c \pm 0,58$
30°C; 6,5	NT8	$207,67^c \pm 2,52$	Không lan kín tơ
30°C; 7,0	NT9	$302,00^a \pm 2,65$	$13,67^d \pm 0,58$

Ghi chú: Trong cùng một cột giá trị trung bình, các trị số có cùng ký tự đi kèm khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ($P > 0,05$).

3.2. Ảnh hưởng nguồn dinh dưỡng đến sự sinh trưởng của hệ sợi nấm sữa trên môi trường lỏng
3.2.1. Ảnh hưởng của nguồn carbon đến sự sinh trưởng của hệ sợi nấm sữa

Để đánh giá ảnh hưởng của các nguồn

carbon khác nhau đến sinh trưởng hệ sợi nấm sữa, nấm được nuôi cấy ở điều kiện tối ưu trong môi trường gốc dạng lỏng, trong đó các nghiệm thức sử dụng 3 nguồn carbon là glucose, sacharose và mật rỉ đường.

Bảng 3. Khả năng sinh trưởng hệ sợi nấm sữa trên môi trường lỏng với các nguồn carbon khác nhau

Nguồn Carbon	Khối lượng sinh khối khô (mg)	Thời gian có bình đầu tiên lan kín tơ (ngày)
Glucose	$242,37^a \pm 0,61$	$15,00^b \pm 0,70$
Mật rỉ đường	$118,83^b \pm 0,55$	$19,89^a \pm 0,80$
Saccharose	$80,91^c \pm 0,73$	Không lan kín tơ

Ghi chú: Trong cùng một cột giá trị trung bình, các trị số có cùng ký tự đi kèm khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ($P > 0,05$).

Kết quả bảng 3 cho thấy, nguồn carbon có ảnh hưởng đến sinh trưởng hệ sợi của giống nấm sữa với sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ($P < 0,05$). Nghiệm thức sử dụng nguồn carbon là glucose cho khối lượng sinh khối khô cao nhất ($242,37^a \pm 0,61$ mg) và thời gian có bình đầu tiên lan kín tơ là ngắn nhất so với các nghiệm thức còn lại ($15,00^b \pm 0,70$ ngày). Điều đó cho thấy glucose là nguồn

carbon thích hợp để hệ sợi nấm sữa sinh trưởng và phát triển tốt. Theo kết quả nghiên cứu của các tác giả Ngô Xuân Nghiễn và Nguyễn Thị Bích Thuý (2016); Cổ Thị Thuý Vân và cộng sự (2019), fructose thích hợp cho sự phát triển hệ sợi của nấm sò vàng; glucose làm cho hệ sợi nấm mốc nhĩ phát triển mạnh nhất. Qua kết quả nghiên cứu của Cổ Thị Thuý Vân (2015), mỗi loại nấm phản ứng

khác nhau đối với các nguồn carbon (Cổ Thị Thùy Vân, 2015; Cổ Thị Thùy Vân và cs., 2019; Ngô Xuân Nghiễn và Nguyễn Thị Bích Thùy, 2016; Wu *et al.*, 2008). Kết quả của nghiên cứu này cho thấy, nguồn carbon sử dụng glucose là nguồn dinh dưỡng thích hợp cho sinh trưởng của hệ sợi nấm sữa và sẽ được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

Bảng 4. Khả năng sinh trưởng hệ sợi nấm sữa trên môi trường lỏng với các nguồn nito khác nhau

Nguồn nito	Khối lượng sinh khối khô (mg/bình/lít MT)	Thời gian có bình đầu tiên lan kín tơ (ngày)
Cao nấm men	175,74 ^b ± 0,61	18,33 ^b ± 0,50
Cao đậu nành	261,18 ^a ± 0,59	14,78 ^c ± 0,83
Cao thịt	152,41 ^c ± 0,59	19,33 ^a ± 0,70
Cao malt	136,14 ^d ± 0,72	19,11 ^{ab} ± 0,60

Ghi chú: Trong cùng một cột giá trị trung bình, các trị số có cùng ký tự đi kèm khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ($P > 0,05$).

Kết quả bảng 4 cho thấy nguồn nito có ảnh hưởng đến sự sinh trưởng hệ sợi của giống nấm sữa với sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ($P < 0,05$). Nghiệm thức sử dụng nguồn nito là cao đậu nành cho khối lượng sinh khối khô (261,18^a ± 0,59 mg) cao nhất; thời gian có bình đầu tiên lan kín tơ là ngắn nhất (14,78^c ± 0,83), so với các nghiệm thức còn lại. Điều đó cho thấy nguồn nito sử dụng cao đậu nành thích hợp để hệ sợi nấm sữa sinh trưởng và phát triển tốt. Các công trình nghiên cứu trên nấm sò vàng, nấm đầu khỉ, nấm bào ngư, nấm chân dài, nấm kim châm đều cho thấy cao đậu nành là nguồn dinh dưỡng quan trọng, có ảnh hưởng tốt nhất nhì so với các dạng đạm khác đối với sự sinh trưởng và phát triển của hệ sợi trong điều kiện phòng thí nghiệm (Cổ Thị Thùy Vân, 2015; Ngô Xuân Nghiễn & Nguyễn Thị Bích Thùy, 2016; Phạm Thị Thu và cs., 2018; Vũ Thị

3.2.2. Ảnh hưởng của nguồn nito đến sự sinh trưởng của hệ sợi nấm sữa

Nấm sữa được nuôi cấy ở điều kiện tối ưu trong môi trường gốc dạng lỏng để tiến hành thí nghiệm đánh giá ảnh hưởng của các nguồn nito đến sự sinh trưởng hệ sợi, trong đó các nghiệm thức sử dụng 4 nguồn nito là cao nấm men, cao đậu nành, cao thịt, cao malt.

Hằng, 2012; Wu *et al.*, 2008). Kết quả nghiên cứu này phù hợp với các nghiên cứu khác do đó, chọn cao đậu nành là nguồn cung cấp nito thích hợp cho sự phát triển hệ sợi nấm sữa để thực hiện cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.3. Tối ưu hóa thành phần môi trường nuôi cấy hệ sợi nấm sữa dạng dịch thể bằng phần mềm Design – expert

3.3.1. Sàng lọc các yếu tố trong ma trận Plackett-Burman

Kết quả phân tích trong ma trận Plackett-Burman cho thấy, chỉ có việc thay đổi nồng độ glucose; cao đậu nành; thiamin có ảnh hưởng rõ rệt ($P < 0,05$) đến khối lượng sinh khối khô hệ sợi nấm sữa trên môi trường lỏng. Khối lượng sinh khối khô tổng số trong ma trận thí nghiệm Plackett-Burman đạt từ 200,22 mg đến 440,60 mg/40 mL (Bảng 5).

Bảng 5. Khối lượng sinh khối khô trong ma trận thiết kế thí nghiệm Plackett-Burman

Thí nghiệm	Glucose	Cao đậu nành	MgSO ₄	K ₂ HPO ₄	Thiamin	Khối lượng sinh khối khô (mg/40mL)
1	25	6	1,1	5	15	400,00
2	25	10	0,3	1	15	300,40
3	15	10	1,1	5	15	410,00
4	25	6	1,1	5	25	346,66
5	15	10	0,3	5	25	340,66
6	25	10	1,1	1	15	200,20
7	15	10	1,1	1	25	360,40
8	25	6	0,3	1	25	440,60
9	25	10	0,3	5	25	400,00
10	15	6	0,3	5	15	300,40
11	15	6	1,1	1	25	460,00
12	15	6	0,3	1	15	200,22

Kết luận: Chỉ có nồng độ glucose, cao đậu nành, thiamin có ảnh hưởng đối với sự phát triển hệ sợi của nấm sữa. Do đó, thiết kế tối ưu hoá Box-Behken sử dụng 3 yếu tố: nồng độ glucose, nồng độ cao đậu nành, nồng độ thiamin.

3.3.2. Tối ưu hoá bằng thiết kế Box-Behken và phương pháp bề mặt đáp ứng

Thí nghiệm tối ưu hóa sử dụng 3 yếu tố là nồng độ glucose, nồng độ cao đậu nành và nồng độ thiamin ở 3 mức (-1; 0 và +1) với 17 nghiệm thức trong đó có 5 thí nghiệm ở trung tâm theo mô hình Box-Behnken.; điều chỉnh pH = 7,0; nhiệt độ nuôi ủ 30°C.

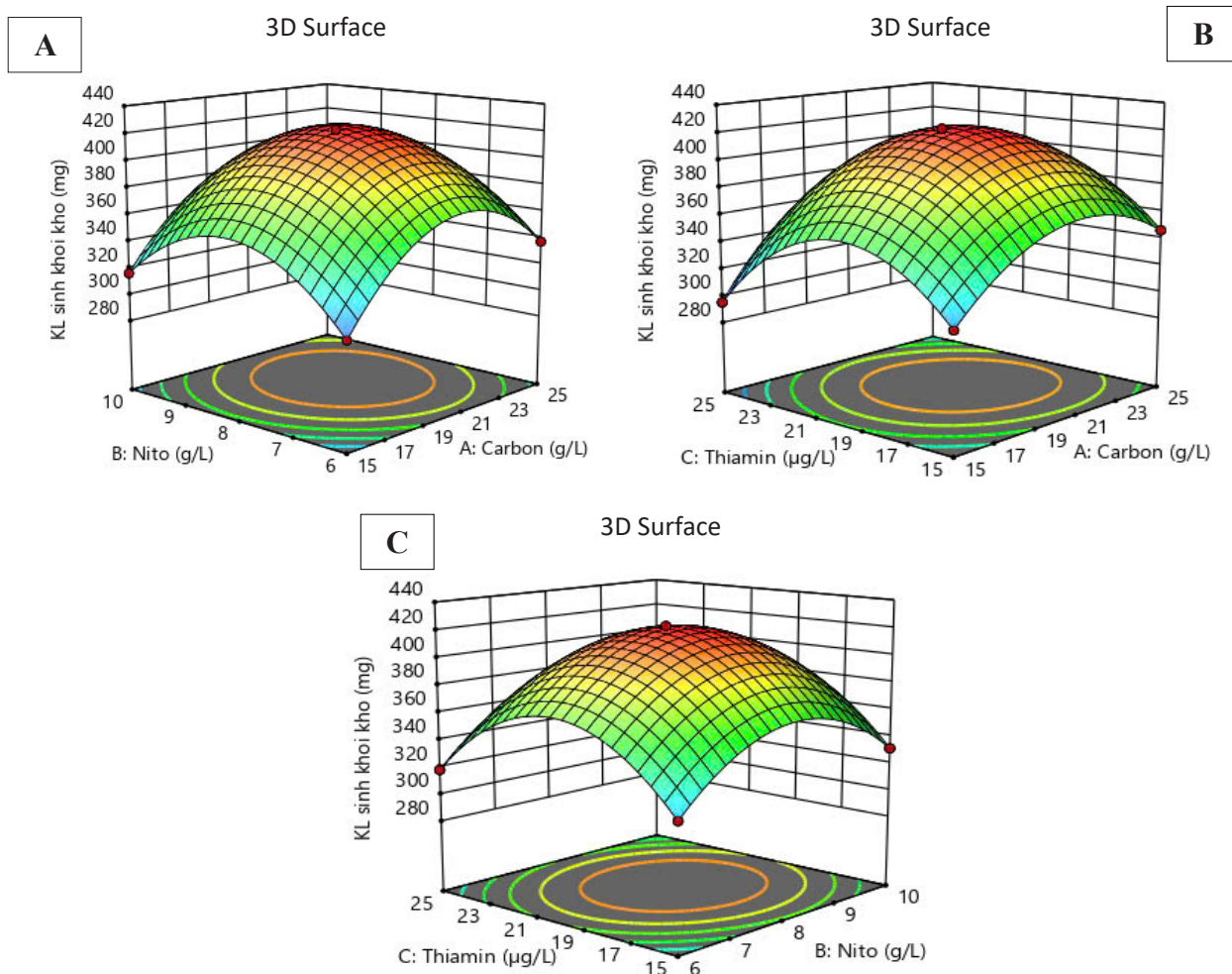
Kết quả thí nghiệm cho thấy khối lượng sinh khối khô thu được không có sự chênh lệch đáng kể so với kết quả dự đoán từ phần mềm Design-expert. Phân tích ANOVA một chiều mô hình đủ độ chính xác cho thí nghiệm tối ưu hóa môi

trường. Phương trình hồi quy theo nồng độ các yếu tố như sau:

$$Y = 420,38 + 16,98A + 8,15B + 1,70C + 5,36AB - 0,3425AC + 1,24BC - 46,88A^2 - 41,39B^2 - 52,88C^2 + 3,24A^2B - 10,56A^2C + 4,76AB^2$$

Trong đó: Y là khối lượng sinh khối khô; A là nồng độ glucose (g/L); B nồng độ cao đậu nành (g/L); C nồng độ thiamin (µg/L).

Sau khi phân tích các số liệu của mô hình Box-Behnken, sử dụng phần mềm Design-Expert để đưa ra dự đoán thành phần môi trường tối ưu cho quy trình nhân giống nấm sữa dạng dịch thể cho khối lượng sinh khối khô cao nhất như sau: glucose 24,764 g/L; cao đậu nành 8,437 g/L và thiamin 19,625 µg/L với khối lượng sinh khối khô dự đoán đạt 396,075 mg trong bình nuôi cấy chứa 40 mL môi trường dịch thể.



Hình 1. Bề mặt đáp ứng của khối lượng sinh khối khô (mg) trong thí nghiệm tối ưu hoá

Ghi chú: A: Bề mặt đáp ứng thể hiện sự tương tác của cặp yếu tố glucose (g/L) và cao đậu nành (g/L); B: Bề mặt đáp ứng thể hiện sự tương tác của cặp yếu tố glucose (g/L) và thiamin (mg/L); C: Bề mặt đáp ứng thể hiện sự tương tác của cặp yếu tố nitơ (g/L) và thiamin (mg/L).

Để xác định sự tương tác của mỗi yếu tố đối với khối lượng sinh khối khô tối ưu, đồ thị tương tác bề mặt ba chiều được xây dựng với trục z thể hiện khối lượng sinh khối khô và hai biến độc lập bất kỳ trục x, y. Quy luật của sự tương tác giữa các yếu tố được thể hiện qua hình 1.

Khi cố định nồng độ thiamin, thay đổi nồng độ glucose (23 g/L) và cao đậu nành (9 g/L), khối lượng sinh khối khô tăng lên. Tiếp tục tăng nồng độ glucose (25 g/L) và cao đậu nành (10 g/L) thì khối lượng sinh khối khô giảm xuống (Hình 1A).

Khi cố định nồng độ cao đậu nành, thay đổi nồng độ glucose (24 g/L) và thiamin (21 µg/L), khối lượng sinh khối khô tăng lên. Tiếp tục tăng nồng độ glucose (25 g/L) và thiamin (25 µg/L) thì khối lượng sinh khối khô giảm xuống (Hình 1B).

Tương tự, khi cố định nồng độ glucose, thay đổi nồng độ cao đậu nành (8,5 g/L) và thiamin (21 µg/L), khối lượng sinh khối khô tăng lên. Tiếp tục tăng nồng độ cao đậu nành (9,5 g/L) và thiamin (24 µg/L) thì khối lượng sinh khối khô giảm xuống. Kết quả khối lượng sinh khối khô thực tế đạt mức 376,25 mg trong bình nuôi cấy chứa 40 mL môi trường dịch thể và phù hợp với kết quả dự đoán từ mô hình.

Các thông số tối ưu của thành phần môi trường cho quy trình nhân giống nấm sữa (*Calocybe indica*) dạng dịch thể: glucose 24,764 g/L; cao đậu nành 8,437 g/L và thiamin 19,625 µg/L trong bình nuôi cấy chứa 1.000 mL môi trường dịch thể.

IV. KẾT LUẬN

Xác định được nhiệt độ và pH môi trường phù hợp nhất để nuôi sinh khối hệ sợi nấm sữa là 30°C; pH = 7,0; nguồn carbon và nitơ phù hợp nhất để nuôi sinh khối hệ sợi của giống nấm sữa lần lượt là glucose và cao đậu nành tương ứng với khối lượng sinh khối khô thu được 242,37^a ± 0,61 mg và 261,18^a ± 0,59 mg.

Xác định được các điều kiện, thông số tối ưu của thành phần môi trường nuôi cấy cho quy trình nhân giống nấm sữa (*Calocybe indica*) dạng dịch thể bằng phần mềm Design - expert: glucose 24,764 g/L; cao đậu nành 8,437 g/L và thiamin 19,625 µg/L trong bình nuôi cấy chứa 1.000 mL môi trường dịch thể pH = 7,0 được nuôi ủ tối ở nhiệt độ 30°C.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Vũ Thị Hằng, 2012. Nghiên cứu xây dựng quy trình nhân giống nấm kim châm dạng dịch thể và sản xuất nấm kim châm (*Flammulina velutipes*). Luận văn Thạc sỹ Nông nghiệp, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội, Hà Nội.
- Ngô Xuân Nghiễn, Nguyễn Thị Bích Thùy, 2016. Nghiên cứu nhân giống nấm chân dài *Clitocybe maxima* (Gartn. ex Mey.: Fr.) Quél. dạng dịch thể. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, 14: 1817-1824.
- Phạm Thị Thu, Lê Văn Vẻ, Trần Thu Hà, Nguyễn Duy Trinh, 2018. Công nghệ nhân giống dịch thể, ứng dụng trong nuôi trồng nấm sò vàng (*Pleurotus citrinopileatus*). *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, 60 (5): 27-33.
- Cổ Thị Thùy Vân, 2015. Nghiên cứu qui trình phân lập, nhân giống dạng dịch thể để nuôi trồng nấm đầu khỉ (*Hericium erinaceus* (Bull.: FR.) Pers.) và tách chiết một số polysaccharide có hoạt tính sinh học. Luận án Tiến sĩ Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Bách Khoa Hà Nội.
- Cổ Thị Thùy Vân, Lê Thị Lan, Hoàng Thị Soan, Phạm Xuân Hội, 2019. Xây dựng và hoàn thiện quy trình công nghệ nhân giống nấm mộc nhĩ dạng dịch thể. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 102 (5): 97-105.
- Alam N., Amin R., Khan A., Ara I., Shim M.J., Lee M.W., Lee T.S., 2008. Nutritional analysis of cultivated mushrooms in Bangladesh - *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus sajor-caju*, *Pleurotus florida* and *Calocybe indica*. *Mycobiology*, 36: 228-232.
- Balan V. and Subbiah K.A., 2015. A Comprehensive review of Tropical Milky White Mushroom (*Calocybe indica* P&C). *Mycobiology*, 43 (3): 184-194
- Cooke R.C. & Whipps J.M. 1993. *Ecophysiology of fungi*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK, 337.
- Josephine R. & Sahana B. 2014. Cultivation of milky mushroom using paddy straw waste. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3: 404-408.
- Wu C.-Y., Liang Z.-C., Lu C.-P. & Wu S.-H. 2008. Effect of carbon and nitrogen sources on the production and carbohydrate composition of exopolysaccharide by submerged culture of *Pleurotus citrinopileatus*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 16: 6.

Optimization of a liquid spawn production procedure for milky mushroom (*Calocybe indica*)

Nguyen Tran Duc Duy, Luong Thi Ngoc Han, Do Thi Nhu Thao,
Nguyen Pham Truc Phuong, Le Thanh Hung, Hoang Dac Hiet, Nguyen Thi Loan

Abstract

The milky mushroom cultivating process using liquid spawn instead of cassava stalks and grain spawn when propagating helps to significantly shorten cultivating time and improve economic efficiency. The result of research showed that the parameters of the liquid milk mushroom propagation process at a scale of 1,000 mL are as follows: the appropriate temperature and pH for culturing mycelium on liquid medium are 30°C and pH = 7.0, respectively; suitable carbon and nitrogen nutritional sources for mycelial growth on liquid medium: glucose and soya peptone. The optimal parameters of medium components for milky mushroom (*Calocybe indica*) propagating process in liquid form: glucose 24.764 g/L; soya peptone 8.437 g/L and thiamin 19.625 µg/L in 1,000 mL of culture medium, the actual dry biomass weight reached 376.25 mg.

Keywords: Milky mushroom (*Calocybe indica*), liquid spawn, liquid fermentation

Ngày nhận bài: 15/7/2024

Người phản biện: PGS.TS. Khuất Hữu Trung

Ngày phản biện: 19/8/2024

Ngày duyệt đăng: 17/9/2024

ẢNH HƯỞNG CỦA ẨM ĐỘ ĐẾN SỰ GIA TĂNG QUẦN THỂ CỦA NHỆN BẮT MỖI (*Amblyseius largoensis*)

Dương Thị Nga^{1,2}, Hồ Thị Quỳnh Trang², Hồ Thị Thu Giang¹, Nguyễn Đức Tùng^{1*}

TÓM TẮT

Kết quả nghiên cứu khi nuôi nhện bắt mối *Amblyseius largoensis* với thức ăn là nhện đỏ cam chanh *Panonychus citri* trong điều kiện phòng thí nghiệm ở các mức độ ẩm tương đối (RH%) khác nhau (55%, 65%, 75%, 85% và 95%) với điều kiện nhiệt độ trung bình 27,5°C, thời gian chiếu sáng 12 giờ/ngày, cho thấy ẩm độ có tác động rõ rệt đến thời gian các pha phát dục, sức sinh sản và sức tăng quần thể của nhện bắt mối *Amblyseius largoensis*. Nuôi ở điều kiện ẩm độ 55%, thời gian vòng đời của nhện bắt mối *Amblyseius largoensis* trung bình là 8,33 ngày, tổng số trứng trung bình 12,28 quả/trưởng thành, khi nuôi ở điều kiện ẩm độ 75% thời gian vòng đời trung bình là 6,87 ngày, tổng số trứng trung bình 17,48 quả/trưởng thành. Thời gian của một thế hệ (T) và thời gian nhân đôi quần thể (DT) khi nuôi ở 55% và 75% tương ứng là 4,59 và 3,90 ngày. Tỷ lệ sinh sản thuần (Ro) đạt cao nhất ở 75% là 10,06 con cái/nhện cái, thấp nhất ở 55% là 6,85 con cái/nhện cái. Tỷ lệ tăng tự nhiên (r_m) cao nhất ở 75% (0,178 con cái/nhện cái/ngày), tiếp đến ở 85% (0,171 con cái/nhện cái/ngày), ở 65% (0,158 con cái/nhện cái/ngày) và thấp nhất ở 55% (0,140 con cái/nhện cái/ngày). Điều kiện ẩm độ thích hợp cho sự sinh trưởng, phát triển của quần thể nhện bắt mối *A. largoensis* dao động từ 75% đến 85%.

Từ khóa: Nhện bắt mối (*Amblyseius largoensis*), tỷ lệ tăng tự nhiên, ẩm độ

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây ăn quả có múi là nhóm cây giàu dinh dưỡng và có giá trị kinh tế cao. Trong những năm gần đây, cây ăn quả có múi bị nhiều loại dịch hại tấn công và gây hại, trong đó phải kể đến là nhóm nhện nhỏ, đặc biệt chúng phát sinh và gây hại nhiều trong điều kiện khí hậu nóng và khô. Với đặc điểm kích thước rất nhỏ, vòng đời ngắn, khả năng sinh sản cao, phát

sinh nhiều thế hệ trong năm, khả năng hình thành tính kháng thuốc cao là những nguyên nhân để chúng dễ phát triển thành dịch trong thời gian ngắn.

Nhện bắt mối (NBM) *Amblyseius largoensis* thuộc họ Phytoseiidae là tác nhân kiểm soát sinh học quan trọng đối với nhiều loài nhện gây hại trên cây trồng, trong đó có nhện đỏ cam chanh (*Panonychus citri*) một loài gây hại phổ biến trên

¹ Học viện Nông nghiệp Việt Nam; ² Trung tâm Bảo vệ Thực vật phía Bắc

* Tác giả liên hệ, email: nguyenductung@vnua.edu.vn