



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ**

(11)



2-0003265

(51) **A01G 1/04; C12N 3/00; C12N 1/14**
2006.01

(13) **Y**

(21) 2-2020-00329

(22) 17/07/2020

(45) 25/08/2023 425

(43) 25/01/2022 406

(73) **TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN-ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI
(VN)**

334 Nguyễn Trãi, quận Thanh Xuân, thành phố Hà Nội

(72) **Trần Văn Tuấn (VN); Vũ Xuân Tạo (VN).**

(54) **QUY TRÌNH PHỤC HỒI KHẢ NĂNG HÌNH THÀNH QUẢ THỂ Ở NẤM CORDYCEPS
MILITARIS DỰA TRÊN GEN GIỚI TÍNH**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình phục hồi khả năng hình thành quả thể ở nấm *Cordyceps militaris* dựa trên gen giới tính, bao gồm các bước: a) phân lập và lưu giữ bào tử nấm *Cordyceps militaris* mang đơn gen giới tính *MAT1-1* hoặc *MAT1-2*; và b) nuôi tạo quả thể nấm trên cơ sở lai hai loại bào tử nấm *Cordyceps militaris* mang đơn gen giới tính *MAT1-1* hoặc *MAT1-2* với nhau. Quy trình góp phần duy trì ổn định năng suất và phục hồi khả năng hình thành quả thể cho các chủng nấm *Cordyceps militaris* có đặc tính quý bị thoái hóa trong quá trình sản xuất.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực công nghệ vi sinh vật, cụ thể giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình phục hồi khả năng hình thành quả thể ở nấm *Cordyceps militaris* dựa trên gen giới tính.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Nấm dược liệu *Cordyceps militaris* từ lâu đã được biết đến với những lợi ích to lớn cho sức khỏe như ngăn ngừa và kìm hãm sự phát triển của các tế bào ung thư, kháng virus, điều hoà tim mạch, điều trị bệnh thận do giảm immunoglobulin A, khả năng chống oxy hóa cao, bảo vệ gan, v.v... Có được những công dụng trên là do trong quả thể nấm *Cordyceps militaris* có chứa nhiều hoạt chất như cordycepin, pentostatin, axit amin, polysaccharit, chất chống oxy hóa và tăng cường hệ miễn dịch... Cũng nhờ những lợi ích to lớn trên đối với sức khỏe mà việc nuôi trồng nhân tạo quả thể nấm *Cordyceps militaris* ngày càng phát triển ở nhiều nước trên thế giới như Nhật Bản, Hàn Quốc, Trung Quốc... Ở Việt Nam, trong năm năm gần đây, việc nuôi trồng *Cordyceps militaris* ngày càng phát triển. Tuy nhiên, quá trình sản xuất quả thể nấm *Cordyceps militaris* trong nước hiện nay đang gặp phải tình trạng thoái hóa giống nghiêm trọng, dẫn đến giảm hoặc mất hoàn toàn khả năng hình thành quả thể.

Đã có nhiều nghiên cứu liên quan đến nấm *Cordyceps militaris* như các nghiên cứu về điều kiện nuôi trồng quả thể, quy trình lên men chìm để thu sinh khối nấm *Cordyceps militaris*. Các nghiên cứu sâu hơn về gen ở nấm *Cordyceps militaris* đã chỉ ra rằng có sự liên quan giữa hai gen giới tính *MAT1-1* và *MAT1-2* đến khả năng hình thành quả thể ở *Cordyceps militaris*. Nhiều chủng giống có chất lượng cao dùng trong nuôi trồng quy mô lớn tại Việt Nam dễ bị thoái hóa chỉ sau một thời gian đưa vào sản xuất. Thoái hóa giống làm giảm nghiêm trọng khả năng hình thành quả thể ở nấm và gây nhiều khó khăn cho người sản xuất. Nghiên cứu phát triển giải pháp để phục hồi các chủng giống quý đang lưu hành tại Việt Nam dựa trên công nghệ sinh học phân tử giữ vai trò quan trọng trong việc thúc đẩy mở rộng ngành trồng nấm dược liệu *Cordyceps militaris* ở nước ta và có thể giúp giảm giá thành sản phẩm. Tuy nhiên cho

đến nay vẫn chưa có công trình nghiên cứu nào về việc phát triển giải pháp hoàn chỉnh dựa trên gen giới tính để phục hồi các chủng giống *Cordyceps militaris* bị thoái hóa.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là giải quyết các vấn đề nêu trên. Theo đó, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình phục hồi khả năng hình thành quả thể ở nấm *Cordyceps militaris* dựa trên gen giới tính, bao gồm các bước:

a) Phân lập và lưu giữ các bào tử nấm *Cordyceps militaris* mang đơn gen giới tính *MAT1-1* hoặc *MAT1-2*; và

b) Nuôi tạo quả thể trên cơ sở lai hai loại bào tử nấm *Cordyceps militaris* mang đơn gen giới tính *MAT1-1* hoặc *MAT1-2* với nhau.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1: Mẫu quả thể nấm *Cordyceps militaris* bị thoái hóa

Hình 2: Đĩa phân lập bào tử

Hình 3: Quả thể nấm nuôi trồng với công thức lai tối ưu

Hình 4: Quả thể nấm sau 5 thế hệ cấy truyền từ bào tử đơn gen giới tính

Hình 5: Quả thể nấm sau 5 thế hệ cấy truyền từ hệ sợi nấm,

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Sau đây, giải pháp hữu ích mô tả chi tiết các phương án và ví dụ thực hiện cụ thể, tuy nhiên, các phương án này chỉ nhằm mục đích mô tả chi tiết giải pháp hữu ích chứ không nhằm mục đích giới hạn phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Các quy trình, kỹ thuật pha chế môi trường, khử trùng môi trường, tách chiết ADN, kỹ thuật PCR (Polymerase chain reaction - Phản ứng chuỗi polymerase), điện di sản phẩm PCR, v.v... là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ: phương pháp cấy để tránh vi sinh vật ngoại lai lây nhiễm vào môi trường nuôi cấy, phương pháp khử trùng môi trường nuôi cấy.

Các thành phần, hóa chất hoặc thiết bị sử dụng trong quy trình theo sáng chế có thể tìm thấy, hoặc mua được trên thị trường. Các thiết bị hoặc hóa chất có thể mua được, ví dụ, từ công ty Difco (Tây Ban Nha), Merck (Đức), Sigma (Hoa Kỳ) v.v..

Theo đó, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình phục hồi khả năng hình thành quả thể ở nấm dược liệu *Cordyceps militaris* dựa trên gen giới tính bao gồm các bước:

a) Phân lập và lưu giữ các bào tử nấm *Cordyceps militaris* mang đơn gen giới tính *MAT1-1* hoặc *MAT1-2*

Chọn mẫu quả thể nấm đang bị thoái hóa dựa vào số lượng quả thể nấm hình thành trên môi trường nuôi giảm nhiều so với ban đầu khi chưa bị thoái hóa.

Chuẩn bị môi trường PDA (trong 1 lít) bao gồm:

Glucoza: 20 g

Nước chiết 200 g khoai tây

Thạch (agar): 20g

pH: 6,5-7

Nước cho đủ 1 lít.

(nước chiết khoai tây thu được bằng cách lấy 200g khoai tây cắt thành kích thước 1cmx1cm, đun sôi trong 1L nước cất trong 30 phút, thu phần nước chiết)

Dùng bánh kẹp vô trùng tách quả thể nấm từ hộp nuôi nấm và gắn lên nắp đĩa petri bằng băng dính, phía trên bề mặt môi trường PDA. Đĩa được ủ 4-5 ngày ở 25°C chiếu sáng liên tục bằng đèn huỳnh quang với cường độ ánh sáng 250-300 lux, bào tử nấm sẽ phát tán và rơi trên bề mặt môi trường PDA. Mỗi bào tử sẽ phát triển thành 1 khuẩn lạc. Mỗi khuẩn lạc nấm được tiến hành cấy sang 1 đĩa môi trường PDA riêng biệt nuôi trong tối 4-5 ngày ở 25°C, sau đó chuyển ra chiếu sáng 2 ngày để tiến hành thu bào tử và xác định gen giới tính.

Để xác định gen giới tính của các bào tử này, một lượng nhỏ bào tử nấm từ mỗi đĩa được nuôi lác riêng biệt trong môi trường PDB trong 3 ngày ở 22-25°C để thu hệ sợi nấm.

Môi trường PDB (trong 1 lít) bao gồm:

Glucoza: 20 g

Nước chiết 200 g khoai tây

pH: 6,5-7

Nước cho đủ 1 lít.

Hệ sợi nấm sẽ được tách chiết ADN dùng cho phản ứng PCR xác định gen giới tính với cặp mồi đặc hiệu cho hai gen *MAT1-1* và *MAT1-2*. Kết quả được kiểm tra bằng phương pháp điện di sản phẩm PCR trên gel agarosa 0,7%.

Phản ứng PCR sử dụng Master Mix (Promega) với tổng thể tích 5 μ L gồm các thành phần sau:

Master Mix	: 2,5 μ L
Mồi xuôi	: 0,2 μ L
Mồi ngược	: 0,2 μ L
Nước không có nucleaza	: 1,9 μ L
ADN khuôn	: 0,2 μ L

Phản ứng PCR được thực hiện với chu trình nhiệt như sau: 94°C: 6 phút; 30 chu kỳ của 94°C: 30 giây, 58°C: 30 giây, 72°C: 40 giây; 72°C: 10 phút; 20°C: ∞ . Từ kết quả điện di sản phẩm PCR, xác định được các bào tử mang đơn gen giới tính từ mỗi đĩa nuôi cấy.

Các bào tử sau khi được xác định mang đơn gen giới tính *MAT1-1* hoặc *MAT1-2* được giữ riêng biệt trong dung dịch glycerol 20%, trong các ống có nắp đậy vô trùng và bảo quản trong tối ở nhiệt độ 4-6°C.

b) Nuôi tạo quả thể trên cơ sở lai hai loại bào tử nấm *Cordyceps militaris* mang đơn gen giới tính *MAT1-1* hoặc *MAT1-2* với nhau

Dịch bào tử mang đơn gen *MAT1-1* và dịch bào tử mang đơn gen *MAT1-2* được pha loãng tới nồng độ 10^6 bào tử/mL. Hai loại dịch bào tử này được phối trộn theo tỷ lệ 1:1. Dịch bào tử sau phối trộn được tiến hành đồng nuôi cấy trong môi trường PDB với lượng dịch bào tử đưa vào là 4%, tiến hành nuôi lắc 200 vòng/phút trong 3 ngày, ở 25°C trong tối.

Dịch giống nấm nuôi lắc sau 3 ngày được tiến hành cấy sang môi trường CM1 chứa trong hộp nhựa trong hình trụ thể tích 650 mL. Hộp môi trường CM1 sau cấy giống được ủ ở 25°C trong tối trong khoảng thời gian từ 5-7 ngày, tới khi hệ sợi nấm lan kín bề mặt môi trường một lớp sợi nấm mỏng màu trắng. Sau đó hộp nuôi nấm được chuyển qua giai đoạn nuôi quả thể ở điều kiện 25°C, độ ẩm 80-90%, chiếu sáng

12 giờ/ngày bằng ánh sáng huỳnh quang có cường độ ánh sáng là 300-350 lux. Sau 45 ngày nuôi, quả thể nấm hình thành đạt khối lượng tươi trung bình 36 g/hộp nuôi, 227 quả thể/hộp nuôi và chiều cao quả thể trung bình đạt 8 cm/quả thể.

Môi trường CM1 (dùng cho 1 hộp nuôi hình trụ, thể tích 650 mL) bao gồm:

Gạo lứt huyết rồng : 30 g

Dịch dinh dưỡng : 80 mL

Dịch dinh dưỡng (1 lít):

Nước chiết 200 g khoai tây

Glucose : 30 g

Pepton : 1 g

MgSO₄.7H₂O : 2 g

KH₂PO₄ : 1 g

Nhộng tằm : 50 g

Nước cho đủ 1 lít.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Phân lập và lưu giữ bào tử nấm *Cordyceps militaris* mang đơn gen giới tính *MAT1-1* hoặc *MAT1-2*

Chọn mẫu quả thể nấm đang bị thoái hóa với số lượng quả thể nấm hình thành trên môi trường nuôi giảm nhiều so với ban đầu khi chưa bị thoái hóa.

Môi trường PDA (trong 1 lít) bao gồm:

Glucose: 20 g

Nước chiết 200 g khoai tây

Thạch (agar): 20g

pH: 6,5-7

Nước cho đủ 1 lít

(nước chiết khoai tây thu được bằng cách lấy 200g khoai tây cắt thành kích thước 1cmx1cm, đun sôi trong 1L nước cất trong 30 phút, thu phần nước chiết)

Môi trường PDA và đĩa petri được khử trùng ở 121°C trong thời gian 20 phút.

Môi trường sau khử trùng được để nguội về 50-60°C và chia vào các đĩa petri đã khử

trùng. Dùng banh kẹp vô trùng tách quả thể nấm từ hộp nuôi nấm đang thoái hóa và gắn lên nắp đĩa petri bằng băng dính, phía trên bề mặt môi trường PDA. Đĩa được ủ 4-5 ngày ở 25°C chiếu sáng liên tục bằng đèn huỳnh quang với cường độ ánh sáng 250-300 lux, bào tử nấm sẽ phát tán và rơi trên bề mặt môi trường PDA. Mỗi bào tử sẽ phát triển thành 1 khuẩn lạc.

Mỗi khuẩn lạc nấm được tiến hành cấy sang 1 đĩa môi trường PDA riêng biệt nuôi trong tối 4-5 ngày ở 25°C, sau đó chuyển ra chiếu sáng 2 ngày để tiến hành thu bào tử. Bỏ sung nước cất vô trùng lên bề mặt đĩa, dùng que cấy vô trùng để gạt tách bào tử ra khỏi sợi nấm. Đặt màng lọc Miracloth vô trùng lên miệng ống ly tâm 50 mL vô trùng, dùng pipet hút dịch trên đĩa và cho dịch đi qua màng lọc để loại bỏ sợi. Xác định nồng độ bào tử của dịch thu được bằng buồng đếm Thoma.

1mL bào tử nấm ở nồng độ 10^6 bào tử/mL thu được từ mỗi đĩa sẽ được nuôi lắc trong 50 mL môi trường PDB, lắc 200 vòng/phút trong 3 ngày ở 22 - 25°C. Lọc dịch nuôi qua màng Miracloth để thu hệ sợi, dùng giấy thấm để loại hết nước, chia 0,2 g hệ sợi nấm vào các ống ly tâm 2 mL vô trùng.

Môi trường PDB (trong 1 lít) bao gồm:

Glucose: 20 g

Nước chiết 200 g khoai tây

pH: 6,5-7

Nước cho đủ 1 lít.

Hệ sợi nấm được dùng cho tách chiết ADN. Sau khi thu 0,2 g sợi nấm vào ống ly tâm 2 mL, giã mẫu bằng đũa thủy tinh vô trùng đến khi hệ sợi nát và sử dụng ngay cho việc tách chiết. Bỏ sung 600 μ L đệm chiết GX (2,5% SDS; 200 mM Tris-HCl pH 8; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA; 0,2% β -mercaptoetanol), vortex đều. Ủ mẫu ở 60°C trong 30 phút. Sau đó, bỏ sung 300 μ L natri axetat 3 M pH 5,2; đảo đều ống, ly tâm 12000 vòng/phút trong 20 phút ở 4°C. Chuyển dịch nổi sang ống ly tâm 1,5 mL mới và bỏ sung 1 thể tích isopropanol lạnh để kết tủa ADN, đảo ống, ly tâm 12000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C. Thu tủa, rửa tủa trong 700 μ L etanol 70%, ly tâm 12000 vòng/phút trong 5 phút. Bỏ dịch nổi, thu lấy tủa. Làm khô mẫu bằng máy cô quay SpeedVac. Thêm 30 μ L TE (Tris-EDTA pH 8) và 3 μ L RNaza (10 mg/mL). Ủ mẫu ở 60°C trong 30 phút. Mẫu ADN được điện di kiểm tra trên gel agarosa 0,7% (0,7 g agarosa/100 mL đệm TAE 1x) ở 90 V trong 30 phút. ADN được bảo quản ở 4°C.

Mẫu ADN tách chiết được dùng cho phản ứng PCR xác nhận gen giới tính với cặp mồi đặc hiệu cho hai gen *MAT1-1* và *MAT1-2*. Cặp mồi đặc hiệu cho gen *MAT1-1* là MAT1-1-F: ATGGAACACAGATCGAGCGACAC và MAT1-1-R: ATATACCTTCGCGATCATTGCCAG. Cặp mồi đặc hiệu cho gen *MAT1-2* là MAT1-2-F: TGTTTTGTCGCGATGGTTCTGG và MAT1-2-R: CCTCTGGAGGTTCTGCATTC CA. Phản ứng PCR sử dụng Master Mix (Promega) với tổng thể tích 5 μ L gồm các thành phần sau:

Master Mix	: 2,5 μ L
Mồi xuôi	: 0,2 μ L
Mồi ngược	: 0,2 μ L
Nước không có nucleaza	: 1,9 μ L
ADN khuôn	: 0,2 μ L

Phản ứng PCR được thực hiện với chu trình nhiệt như sau: 94°C: 6 phút; 30 chu kỳ của 94°C: 30 giây, 58°C: 30 giây, 72°C: 40 giây; 72°C: 10 phút; 20°C: ∞ . Kết quả được kiểm tra bằng phương pháp điện di sản phẩm PCR trên gel agarosa 0,7%. Bào tử nấm mang đơn gen *MAT1-1*, kết quả PCR mẫu ADN của hệ sợi chỉ cho 1 băng với kích thước 457 bp. Bào tử nấm mang đơn gen *MAT1-2*, kết quả PCR mẫu ADN của hệ sợi chỉ cho 1 băng với kích thước 368 bp. Các bào tử sau khi được xác nhận mang đơn gen giới tính *MAT1-1* hoặc *MAT1-2* được giữ riêng biệt trong dung dịch glycerol 20%, trong các ống có nắp đậy vô trùng và bảo quản trong tối ở nhiệt độ 4-6°C.

Ví dụ 2: Nuôi tạo quả thể trên cơ sở lai hai loại bào tử nấm *Cordyceps militaris* mang đơn gen giới tính *MAT1-1* hoặc *MAT1-2* với nhau

Dịch bào tử nấm mang đơn gen *MAT1-1* và dịch bào tử nấm mang đơn gen *MAT1-2* được pha loãng tới nồng độ 10^6 bào tử/mL. Hai loại dịch bào tử này được phối trộn theo tỷ lệ 1:1. Dịch bào tử sau phối trộn được tiến hành đồng nuôi cấy trong môi trường PDB với lượng dịch bào tử đưa vào là 4%, tiến hành nuôi lắc 200 vòng/phút trong 3 ngày, ở 25°C trong tối.

Môi trường CM1 (dùng cho 1 hộp nuôi hình trụ, thể tích 650 mL) bao gồm:

Gạo lứt huyết rồng : 30 g

Dịch dinh dưỡng : 80 mL

Dịch dinh dưỡng (1 lít):

Nước chiết 200 g khoai tây

Glucosa : 30 g

Pepton : 1 g

MgSO₄.7H₂O : 2 g

KH₂PO₄ : 1 g

Nhộng tằm : 50 g

Nước cho đủ 1 lít.

Môi trường CM1 sau khi được chuẩn bị như công thức trên, được tiến hành khử trùng ở 121°C trong thời gian 20 phút và để nguội qua đêm. Mỗi hộp môi trường được cấy 3 mL dịch nuôi lắc bào tử đều khắp bề mặt môi trường. Hộp môi trường CM1 sau cấy giống được ủ ở 25°C trong tối trong khoảng thời gian từ 5-7 ngày, tới khi hệ sợi nấm lan kín bề mặt môi trường một lớp sợi nấm mỏng màu trắng. Sau đó hộp nuôi nấm được chuyển qua giai đoạn nuôi quả thể ở điều kiện 25°C, độ ẩm 80-90%, chiếu sáng 12 giờ/ngày bằng ánh sáng huỳnh quang có cường độ ánh sáng là 300-350 lux. Sau 45 ngày nuôi, quả thể nấm hình thành đạt khối lượng tươi trung bình 36 g/hộp nuôi, 227 quả thể/hộp nuôi và chiều cao quả thể trung bình đạt 8 cm/quả thể.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình theo giải pháp hữu ích đạt hiệu quả cao trong việc phục hồi và duy trì khả năng hình thành quả thể cho nấm *Cordyceps militaris* bị thoái hóa trong sản xuất. Việc lưu giữ và lai các chủng nấm *Cordyceps militaris* mang đơn gen giới tính khác nhau là biện pháp đơn giản và hiệu quả giúp duy trì ổn định khả năng hình thành quả thể với năng suất cao ở nấm *Cordyceps militaris* so với phương pháp lưu giữ giống bằng hệ sợi thông thường.

Quy trình theo giải pháp hữu ích có khả năng áp dụng trên qui mô công nghiệp, góp phần duy trì ổn định năng suất quả thể trong nuôi trồng nấm *Cordyceps militaris* đồng thời giúp phục hồi khả năng hình thành quả thể cho các chủng nấm *Cordyceps militaris* có đặc tính quý bị thoái hóa trong sản xuất, góp phần phát triển bền vững ngành nuôi trồng nấm *Cordyceps militaris* ở Việt Nam.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình phục hồi khả năng hình thành quả thể ở nấm *Cordyceps militaris* dựa trên gen giới tính, bao gồm các bước:

a) Phân lập và lưu giữ bào tử nấm *Cordyceps militaris* mang đơn gen giới tính *MAT1-1* hoặc *MAT1-2*

- chọn mẫu quả thể nấm đang bị thoái hóa với số lượng quả thể nấm hình thành trên môi trường nuôi giảm nhiều so với ban đầu khi chưa bị thoái hóa;

- tách vô trùng quả thể nấm từ hộp nuôi nấm và gắn lên nắp đĩa petri, phía trên bề mặt môi trường PDA, có thành phần (trong 1 lít) bao gồm:

Glucosa: 20 g

Nước chiết 200 g khoai tây

Thạch: 20g

pH: 6,5-7

Nước cho đủ 1 lít.

sau đó đĩa được ủ 4-5 ngày ở 25°C chiếu sáng liên tục bằng đèn huỳnh quang với cường độ ánh sáng 250-300 lux, để bào tử nấm phát tán và phát triển thành khuẩn lạc nấm;

- cấy mỗi khuẩn lạc nấm sang 1 đĩa môi trường PDA riêng biệt, nuôi trong tối 4-5 ngày ở 25°C, sau đó chuyển ra chiếu sáng 2 ngày để thu bào tử;

- nuôi lắc một lượng nhỏ bào tử nấm từ mỗi đĩa để xác định gen giới tính trong môi trường PDB 3 ngày ở 25°C để thu hệ sợi nấm, thành phần môi trường PDB (trong 1 lít) bao gồm:

Glucosa: 20 g

Nước chiết 200 g khoai tây

pH: 6,5-7

Nước cho đủ 1 lít.

- thực hiện phản ứng PCR xác định gen giới tính dựa trên ADN được tách chiết từ hệ sợi nấm với các cặp mồi đặc hiệu cho gen *MAT1-1* và *MAT1-2*:

MAT1-1-F: ATGGAACACAGATCGAGCGACAC

MAT1-1-R: ATATAC CTTGCGGATCATTGCCAG

MAT1-2-F: TGT TTTGTCGCGATGGTTCTGG

MAT1-2-R: CCTCTGGAGGTTCTGCATTC CA;

dựa trên kết quả PCR xác định được các bào tử nấm *Cordyceps militaris* từ mỗi đĩa mang gen giới tính khác nhau; các bào tử mang đơn gen giới tính *MAT1-1* hoặc *MAT1-2* được giữ riêng biệt trong dung dịch glycerol 20%, trong các ống có nắp đậy vô trùng và bảo quản trong tối ở nhiệt độ 4-6°C.

b) Nuôi tạo quả thể nấm trên cơ sở lai hai loại bào tử nấm *Cordyceps militaris* mang đơn gen giới tính *MAT1-1* hoặc *MAT1-2* với nhau

- pha loãng dịch bào tử nấm mang đơn gen *MAT1-1* và dịch bào tử nấm mang đơn gen *MAT1-2* tới nồng độ 10^6 bào tử/mL, phối trộn theo tỷ lệ 1:1; dịch bào tử sau phối trộn được tiến hành đồng nuôi cấy trong môi trường PDB với lượng dịch bào tử đưa vào là 4%, nuôi lắc 200 vòng/phút trong 3 ngày, ở 25°C trong tối;

- tiến hành cấy 3 mL dịch giống nấm thu được sau nuôi lắc 3 ngày sang môi trường CM1 chứa trong hộp nhựa trong hình trụ thể tích 650 mL, môi trường CM1 (dùng cho 1 hộp nuôi hình trụ, thể tích 650 mL) bao gồm:

Gạo lứt huyết rồng : 30 g

Dịch dinh dưỡng : 80 mL

Dịch dinh dưỡng (1 lít) bao gồm:

Nước chiết 200 g khoai tây

Glucosa : 30 g

Pepton : 1 g

MgSO₄.7H₂O : 2 g

KH₂PO₄ : 1 g

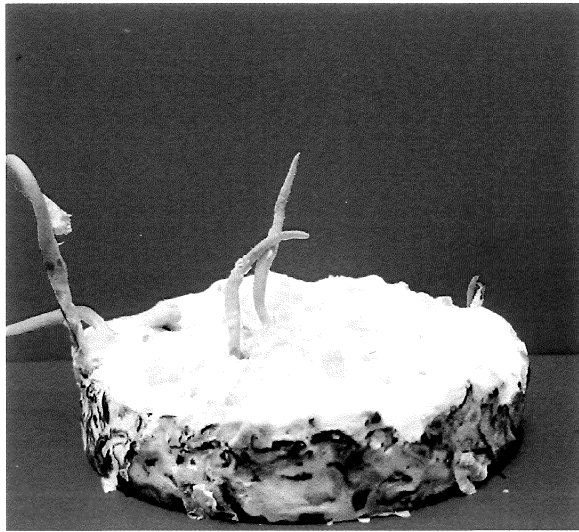
Nhộng tằm : 50 g

Nước cho đủ 1 lít.

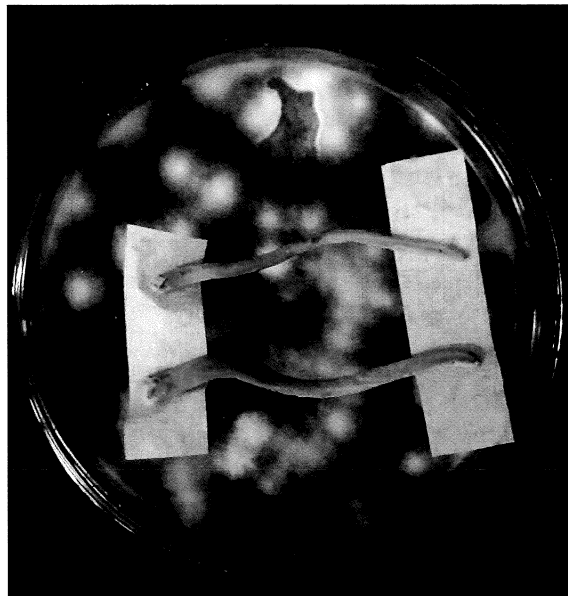
- ủ hộp môi trường CM1 sau khi cấy giống ở 25°C trong tối, trong khoảng thời gian từ 5-7 ngày, tới khi hệ sợi nấm lan kín bề mặt môi trường một lớp sợi nấm mỏng màu trắng; và

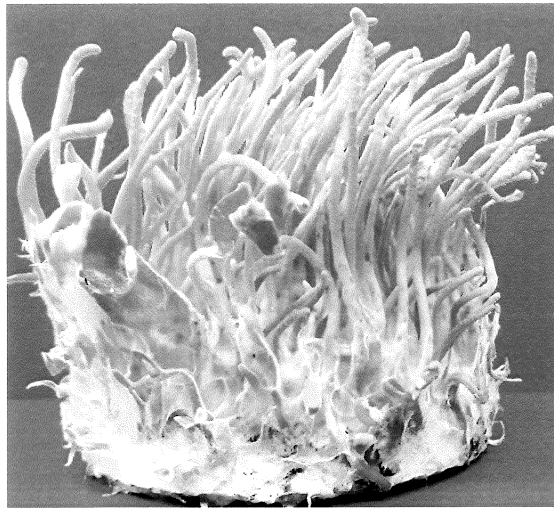
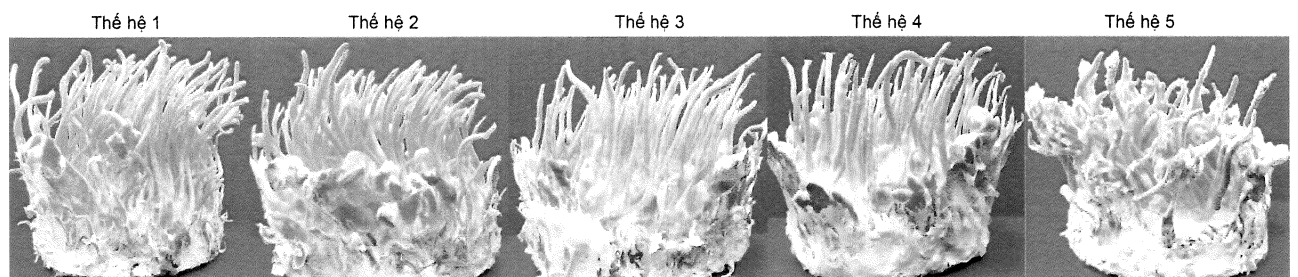
- nuôi tạo quả thể trong 45 ngày ở điều kiện 25°C, độ ẩm 80-90%, chiếu sáng 12 giờ/ngày bằng ánh sáng huỳnh quang có cường độ ánh sáng là 300-350 lux.

Hình 1



Hình 2



Hình 3**Hình 4****Hình 5**