

ĐẶC TÍNH HÌNH THÁI, DI TRUYỀN VÀ ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY MEO GIỐNG CỦA NẤM BÀO NGƯ

Ngô Thị Phương Dung¹, Đặng Bích Tuyền² và Phạm Hồng Quang¹

ABSTRACT

*In this research, 18 pure strains were isolated from 6 different samples of fresh oyster mushrooms. Three groups of these 18 isolates, giving significantly different ability of starch degradation at the 95% confidence level could be distinguished. One representative strain of each group was selected for further study of morphological and genetic characteristics, including strains of 1.2 (TCT), 2.3 (TBT) and 5.2 (NBT). The morphological and molecular identifications performed the similar results in which two strains of white oyster mushrooms were *Pleurotus floridanus* and one strain of Japanese oyster mushroom was *Pleurotus cystidiosus*. Because of its highest performance in starch degrading activity, *Pleurotus floridanus* (strain 1.2) was selected for the study of conditions affecting on its spawn growing. Based on the results of statistical analysis, the favourable conditions for spawn growing time were at 57% humidity and at 27°C incubation temperature.*

Keywords: Oyster mushroom, morphological characteristics, genetic characteristics, ITS, cultivation

Title: Morphological, genetic characteristics and culture conditions effecting on spawn growing of oyster mushrooms

TÓM TẮT

*Trong nghiên cứu này, 18 dòng nấm thuần đã được phân lập từ 6 mẫu nấm bào ngư tươi. Ba nhóm được xác định có hoạt tính phân giải tinh bột khác biệt nhau có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%. Ở mỗi nhóm có một dòng tiêu biểu được tuyển chọn để tiếp tục xác định đặc tính hình thái và di truyền, gồm ba dòng là 1.2 (TCT), 2.3 (TBT) và 5.2 (NBT). Kết quả định danh theo hình thái học và sinh học phân tử cho kết luận tương đồng, trong đó hai dòng nấm bào ngư trắng TCT và TBT thuộc loài *Pleurotus floridanus*, và một dòng nấm bào ngư nhật NBT thuộc loài *Pleurotus cystidiosus*. Dòng 1.2 (TCT) có hoạt tính phân giải tinh bột cao nhất được tuyển chọn cho thí nghiệm khảo sát điều kiện thích hợp nuôi cấy meo giống nấm bào ngư. Kết quả phân tích thống kê về mối tương tác của các tổ hợp gồm nhiệt độ, độ ẩm, và công thức môi trường cho thấy điều kiện thích hợp cho thời gian ủ làm meo giống là ở độ ẩm 57% và nhiệt độ ủ 27°C.*

Từ khóa: Nấm bào ngư, đặc tính hình thái, đặc tính di truyền, ITS, nuôi cấy

1 GIỚI THIỆU

Ngành sản xuất nấm ăn đã được hình thành và phát triển trên thế giới từ khá lâu. Hiện nay trên thế giới có hơn 5000 loài nấm được sử dụng như là nguồn thực phẩm và làm thuốc. Nhiều quốc gia đã cho rằng nấm là một trong những thực phẩm bảo vệ sức khỏe trong thế kỷ XXI (Đặng Châu Linh, 2008). Ở Việt Nam, đặc biệt là vùng Đồng bằng sông Cửu Long, nghề trồng nấm đang phát triển mạnh

¹ Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

² Phòng Công tác sinh viên, Trường Đại học Cần Thơ

mẽ nhờ các lợi thế về điều kiện thời tiết, nguồn nhân công dồi dào, và nguồn cơ chất trồng nấm phong phú. Nhiều loài nấm ăn đã được sản xuất với sản lượng lớn đáp ứng nhu cầu trong nước và xuất khẩu, trong đó có nấm bào ngư. Nấm bào ngư là loại thức ăn ngon, là thực phẩm có giá trị dinh dưỡng khá cao, cung cấp một lượng đáng kể chất đạm, đường bột, nhiều vitamin và khoáng chất. Ngoài ra, còn có tác dụng duy trì bảo vệ sức khỏe, giảm chững cholesterol cao trong máu và chững vữa động mạch, phòng chống nhiều bệnh kể cả ung thư, ung bướu (Bobek và Galbavý, 1999; Nguyễn Lâm Dũng, 2002; Andrej và Daniel, 2008).

Trong hệ thống phân loại của Ainsworth (1973), giới nấm gồm hai ngành chính là ngành Myxomycota - bao gồm những loài giả nấm (plasmodia và pseudoplasmodia) - và ngành Eumycota – gồm phần lớn các loài nấm còn lại, chủ yếu là nấm sợi. Phần lớn nấm ăn được thuộc ngành phụ Basidiomycotina và Ascomycotina (Nguyễn Lâm Dũng, 2001). Nấm bào ngư là tên dùng chung cho các loài thuộc giống Pleurotus, trong đó có 2 nhóm lớn: nhóm chịu nhiệt (nấm kết quả thể từ 20°C – 30°C) và nhóm chịu lạnh (nấm kết quả thể từ 15°C – 25°C) (Lê Duy Thắng, 1997). Sự tăng trưởng và phát triển của nấm phụ thuộc nhiều yếu tố khác nhau như: nhiệt độ, ẩm độ, pH, ánh sáng, oxy, dinh dưỡng trong cơ chất... Việc nuôi trồng nấm nhân tạo bằng phương pháp công nghiệp hay thủ công đều trải qua một quy trình công nghệ bao gồm phân lập hệ sợi từ quả thể, chuẩn bị giống cấp I, giống cấp II và sử dụng nguồn giống này để nuôi cấy đại trà (Lê Bá Dũng, 2003; Trần Đình Đăng và Nguyễn Hữu Ngoan, 2007).

Mặc dù được sản xuất và tiêu thụ rộng rãi, các dòng nấm bào ngư khác nhau chỉ được phân biệt đơn giản dựa vào màu sắc, mùi vị hay nơi sản xuất. Các dòng thuần ở mức độ giống và loài chưa được xác định nhiều. Bên cạnh đó, do nhu cầu sản xuất tăng cao, lượng meo giống dành cho nuôi trồng cũng tăng mạnh, đòi hỏi cần phải có qui trình sản xuất meo giống hiệu quả và ổn định. Vì thế, việc nghiên cứu phân lập, định danh, khảo sát điều kiện sản xuất meo giống của các loại nấm ăn góp phần cung cấp những thông tin làm cơ sở khoa học nghiên cứu giải quyết hiệu quả vấn đề trong quá trình sản xuất meo giống, đồng thời giúp nhà trồng nấm chủ động hơn trong công nghệ sản xuất meo giống, góp phần đảm bảo năng suất thu hoạch.

Mục tiêu đề tài là phân lập, xác định khả năng phân giải tinh bột, khảo sát đặc điểm hình thái và di truyền của các dòng nấm bào ngư thuần, và đề xuất công thức meo giống với thành phần giá thể ở các điều kiện nhiệt độ và độ ẩm thích hợp.

2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Phương tiện

- Nguyên liệu: Nấm bào ngư tươi, mặt cưa, cám gạo, lúa, khoai tây.
- Hóa chất: dùng trong phản ứng PCR (dNTPs, primer ITS1 và ITS4, Taq polymerase, buffer), 100bp DNA Ladder (Fermentas, Mỹ), Iod, tinh bột hòa tan, glucose, (NH₄)₂SO₄, MgSO₄, CaSO₄, KH₂PO₄.
- Môi trường Môi trường dinh dưỡng nuôi cấy và phân lập vi sinh vật: Khoai tây - Glucose - Agar (PGA).

- Các thiết bị và dụng cụ dùng trong phòng thí nghiệm CNSH thực phẩm và CNSH phân tử.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Thu thập mẫu và phân lập nấm bào ngư

Mẫu nấm bào ngư tươi được mua từ cơ sở sản xuất nấm hoặc từ các chợ đầu mối (Bảng 1). Mẫu nấm được chọn là các quả thể nấm còn tươi, không bị thương tổn. Quả thể nấm được rửa sạch và lau bằng bông thấm cồn 70°. Mẫu nhỏ tổ chức ở phần lõi của tai nấm và cuống nấm được phân tách và chuyển vào đĩa petri chứa môi trường PGA. Ủ đĩa ở 30°C. Khi tơ nấm bắt đầu mọc lan ra từ tổ chức nấm đã cấy, tiến hành cấy chuyển nhiều lần đến khi khuẩn lạc đạt được độ thuần nhất. Các dòng phân lập thuần được tồn trữ trong ống nghiệm chứa môi trường PGA và bảo quản ở 4°C.

Bảng 1: Tên nấm và địa điểm thu mua các loại nấm

TT	Tên nấm	Ký hiệu	Địa chỉ thu mua nấm
1	Bào ngư trắng Cần Thơ	TCT	Công ty TNHH Mai Mỹ, Ô Môn Cần Thơ
2	Bào ngư trắng Bến Tre	TBT	Chợ Bến Tre
3	Bào ngư nhật Phụng Hiệp	NPH	Chợ Phụng Hiệp
4	Bào ngư nhật Vĩnh Long	NVL	Công ty TNHH Kim Anh, Bình Minh Vĩnh Long
5	Bào ngư nhật Bến Tre	NBT	Chợ Bến Tre
6	Bào ngư nhật Cần Thơ	NCT	Công ty TNHH Mai Mỹ, Ô Môn Cần Thơ

2.2.2 Khảo sát khả năng phân giải tinh bột của các dòng nấm phân lập

Với mục đích so sánh và tuyển chọn dòng nấm có hoạt tính phân giải tinh bột cao, các dòng thuần được khảo sát khả năng này trong môi trường chứa 0,5% tinh bột, 0,1% peptone và 1,5% agar (Dung *et al.*, 2006). Cấy mẫu bằng cách dùng kim cây cấy một mẫu nấm thuần đặt vào giữa đĩa môi trường tinh bột agar và ủ ở 30°C. Sau khi tơ mọc được 5 – 8 ngày (khuẩn lạc 2 – 3 cm), tiến hành xác định hoạt tính phân giải tinh bột bằng cách nhỏ vào đĩa môi trường dung dịch Iod 0,25%. Sự phân giải tinh bột xảy ra khi không có sự nhuộm màu xanh điển hình giữa tinh bột và dung dịch Iod. Thí nghiệm gồm 1 nhân tố, 3 lần lặp lại: 3 dòng phân lập x 6 mẫu nấm x 3 lần lặp lại = 54 đơn vị thí nghiệm.

2.2.3 Khảo sát đặc tính hình thái của các dòng nấm tuyển chọn

Các dòng nấm thuần được tuyển chọn từ thí nghiệm khảo sát khả năng phân giải tinh bột (2.2.2) tiếp tục được quan sát xác định đặc tính của hệ sợi, quả thể, bào tử nấm và được mô tả dựa theo khóa phân loại của Lê Bá Dũng (2003) và Sharma (1998).

2.2.4 Khảo sát đặc tính di truyền của các dòng nấm tuyển chọn

Mục đích tiến hành giải trình tự đoạn gen mã hóa cho rRNA 18S trên nhiễm sắc thể nấm, đối chiếu với dữ liệu trên ngân hàng gene và xác định ở mức độ loài của các dòng nấm. Quy trình thực hiện như sau: ly trích DNA của nấm; kiểm tra DNA đã trích được trên agarose gel 0,8% ở hiệu điện thế 100 vol trong 20 phút với sự hiện diện của ethidium bromide, chụp hình gel bằng máy chụp gel BIO-RAD UV 2000; kiểm tra sản phẩm DNA ly trích bằng phương pháp đo quang phổ hấp thụ

OD (Optical density), đo OD bằng máy Beckman Coulter 640B ở hai bước sóng 260nm và 280nm, ghi nhận kết quả hiển thị trên màn hình máy tính; chạy phản ứng PCR (PCR, C1000 Bio-Rad Thermal Cycler) với cặp mồi ITS1 và ITS4, vùng ITS 1 và 4 được khuếch đại từ DNA vừa thu trên bằng cặp mồi ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') và ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990); chạy điện di kiểm tra sản phẩm PCR trên gel agarose 1,5% có nhuộm Ethidium bromide ở hiệu điện thế 80V trong 50 phút, sử dụng thang chuẩn DNA 100bp (Fermentas, USA) để ước lượng kích cỡ DNA và gel được chụp hình bằng máy chụp gel BIO-RAD UV 2000; cuối cùng sản phẩm từ phản ứng PCR được giải trình tự tại Phòng thí nghiệm Sinh học Phân tử, Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Đại học Cần Thơ. Từ kết quả giải trình tự, so sánh trình tự thu được với ngân hàng gene trên trang web <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> để xác định loài của mẫu nấm khảo sát.

2.2.5 Khảo sát điều kiện thích hợp nuôi cấy meo giống nấm bào ngư

Thí nghiệm được bố trí gồm 3 nhân tố với 3 mức độ khác nhau và 3 lần lặp lại, tổng cộng có 27 nghiệm thức với 81 đơn vị thí nghiệm. Ba nhân tố gồm có độ ẩm môi trường: 55%, 60%, 65%; nhiệt độ nuôi cấy: 20°C, 25°C, nhiệt độ môi trường xung quanh (28°C- 33°C); môi trường nuôi cấy: công thức 1 (thóc 93%, CaCO₃ 2%, mật cưa 5%), công thức 2 (thóc 93%, CaCO₃ 3%, đường 4%), công thức 3 (thóc 98%, bột thạch cao 2%).

Quy trình chuẩn bị meo giống được thực hiện như sau: lúa được rửa sạch, loại hạt lép, nấu nứt vỏ, để yên 30 phút, vớt ra để ráo 30 phút → thêm chất bổ sung (tương ứng với 3 công thức môi trường) vào cơ chất làm meo → tạo độ ẩm môi trường (tương ứng với 3 mức độ) → cho vào túi cơ chất → khử trùng ở 121 °C trong 1 giờ 30 phút → để nguội → cấy giống thuần → ủ ở nhiệt độ tương ứng với 3 mức độ. Trong suốt quá trình ủ, quan sát và ghi nhận các chỉ tiêu như sự phát triển của sợi nấm theo thời gian ủ, tỉ lệ nhiễm của các túi meo giống (nếu có) và thời gian sợi nấm phát triển đầy túi meo giống.

2.3 Phương pháp phân tích thống kê

Kết quả thí nghiệm được thu thập và phân tích thống kê bằng chương trình StatGraphics Plus Version 5, Manugistics, Inc., Rockville, USA.

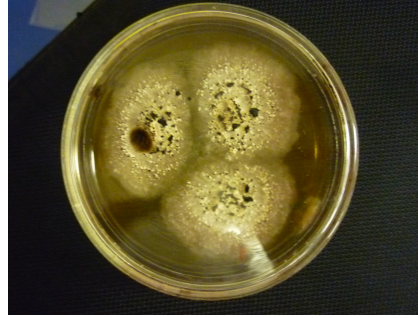
3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Phân lập nấm bào ngư

Một mẫu nhỏ tổ chức từ quả thể nấm được phân tách và đưa vào môi trường PGA cho phát triển hệ sợi. Hệ sợi nấm tiếp tục được cấy chuyển để tách rỗng dòng nấm. Kết quả phân lập được 18 dòng thuần từ 6 mẫu nấm bào ngư khác nhau. Kết quả kiểm tra độ thuần cho thấy các dòng phân lập thuộc nấm bào ngư trắng có hệ sợi trắng đồng nhất, riêng hệ sợi của các dòng phân lập thuộc nấm bào ngư Nhật có xuất hiện những điểm màu đen chứa bào tử. Các khuẩn lạc của các dòng phân lập được có hệ sợi đồng nhất, không xuất hiện khuẩn ty lạ, chứng tỏ dòng nấm thuần nhất. Khuẩn lạc và hệ sợi của dòng tiêu biểu thuộc nấm bào ngư trắng và thuộc nấm bào ngư Nhật được trình bày lần lượt trong hình 1 và hình 2.



Hình 1: Hệ sợi nấm bào ngư trắng TCT



Hình 2: Hệ sợi nấm bào ngư nhạt NBT

3.2 Khả năng phân giải tinh bột của các dòng nấm bào ngư phân lập

Tất cả 18 dòng nấm phân lập được xác định khả năng phân giải tinh bột bằng cách nhỏ vào đĩa môi trường có nấm phát triển dung dịch Iod 0,25% và đo đường kính của vùng không màu (vì nếu còn tinh bột thì khi nhỏ dung dịch Iod vào sẽ tạo màu xanh điển hình). Bảng 2 thể hiện kết quả sự phát triển của hệ khuẩn ty và đường kính vùng phân giải tinh bột (tính bằng cm) trên môi trường tinh bột.

Bảng 2.: Kết quả khảo sát khả năng phân giải tinh bột của các dòng nấm bào ngư

STT	Ký hiệu Mẫu nấm	Dòng phân lập	Sự hiện diện của khuẩn ty	Đường kính vùng phân giải tinh bột	
				cm ¹	SD ²
1	TCT	1.1	+++ ³	6,22a	0,83
2		1.2	+++	6,45a	0,65
3		1.3	+++	6,25a	0,69
4	TBT	2.1	+++	4,28b	0,64
5		2.2	+++	4,30b	0,30
6		2.3	+++	4,35b	0,44
7	NPH	3.1	+	3,33c	0,10
8		3.2	+	3,35c	0,05
9		3.3	+	3,35c	0,22
10	NVL	4.1	++	4,88b	0,04
11		4.2	++	4,87b	0,07
12		4.3	++	4,89b	0,12
13	NBT	5.1	++	3,38c	0,17
14		5.2	++	3,43c	0,24
15		5.3	++	3,37c	0,24
16	NCT	6.1	++	3,28c	0,06
17		6.2	++	3,27c	0,06
18		6.3	++	3,25c	0,08

Chú thích: (+): Đường kính vòng vô khuẩn < 5mm; (++): Đường kính vòng vô khuẩn từ 5 - 10mm; (+++): Đường kính vòng vô khuẩn > 10mm

¹ GCác giá trị trung bình của 3 ba lần lặp lại có mẫu tự giống nhau khác biệt không ý nghĩa về mặt thống kê ở độ tin cậy 95% được theo sau các mẫu tự alphabet giống nhau thì không khác biệt ở mức P=0,05

² Standard deviation

³ Sự phát triển của hệ khuẩn ty được thể hiện từ ít (+), trung bình (++), nhiều (+++)

Kết quả cho thấy đa số các dòng đều phát triển tốt trên môi trường tinh bột nhưng không có nghĩa là chúng đều có khả năng phân giải tinh bột tốt. Kết quả xử lý thống kê cho thấy khả năng phân giải tinh bột của 18 dòng phân lập có sự khác biệt ý nghĩa ($p < 0.05$). Trong đó ba nhóm được xác định có hoạt tính khác biệt nhau có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%. Ở mỗi nhóm này có một dòng tiêu biểu được tuyển chọn để tiến hành nghiên cứu tiếp theo về xác định đặc tính hình thái và di truyền, gồm ba dòng là 1.2, 2.3 và 5.2. Ngoài ra, dòng phân lập có hoạt tính phân giải tinh bột cao nhất được tuyển chọn cho thí nghiệm khảo sát điều kiện thích hợp nuôi cấy meo giống nấm bào ngư.

3.3 Đặc tính hình thái của ba dòng nấm tuyển chọn

Cả 3 dòng nấm đều có hệ sợi phát triển với sợi nấm có vách ngăn ngang. Nhìn bằng mắt thường, hệ sợi có màu trắng. Soi dưới kính hiển vi, sợi nấm trong suốt, không màu. Hai dòng nấm TCT và TBT chỉ có hệ sợi trắng đồng nhất. Hệ sợi của dòng nấm NBT có một số gai nhỏ, đầu gai có chất dịch màu đen chứa rất nhiều bào tử bên trong. Nhiều sợi nấm trong hệ sợi tạo thành mấu (clamp connection). Theo Sharma (1998), mấu là cấu trúc được hình thành trong suốt sự phân chia tế bào của khuẩn ty bậc hai trong hầu hết các dòng nấm thuộc ngành phụ nấm đảm Basidiomycotina. Các đặc điểm vừa nêu của hệ sợi nấm bào ngư được minh họa trong hình 3, 4, 5 và 6.



Hình 3: Sợi nấm bào ngư trắng TCT



Hình 4: Sợi nấm bào ngư trắng TBT



Hình 5: Sợi nấm bào ngư nhạt NBT



Hình 6: Bào tử nấm bào ngư nhạt NBT

Trong quá trình phát triển đến giai đoạn trưởng thành, các sợi nấm của nấm bào ngư trắng và bào ngư nhạt bện chặt lại tạo thành cấu trúc đặc biệt đặc trưng cho giai đoạn sinh sản hữu tính quả thể (fruiting body hay sporocarp). Ngoại trừ khác biệt về màu sắc như miêu tả ở trên, quả thể cả ba dòng nấm có rất nhiều đặc điểm tương đồng. Phần gốc của cuống có lớp lông nhỏ mịn, phần trên cuống dính vào mũ nấm. Cuống dính lệch một bên mũ, không có bao ngoài và trơn láng. Mặt trên

mũ nấm trơn láng, không có lông. Mặt dưới mũ có nhiều phiến rời tỏa ra từ cuống nấm đến hết mũ nấm như hình cánh quạt. Trên mỗi phiến có nhiều chồi nhỏ gọi là đám (basidium), mỗi đám có cuống ngắn, phía trên mang 4 bào tử đám, mỗi bào tử đám sẽ phát triển thành một bào tử. Các bào tử mọc ra từ bào tầng trên phiến với 4 bào tử đám dính phía trên. Bào tử của nấm bào ngư khi chín được phóng thích ra khỏi quả thể. Vết in bào tử nấm bào ngư tạo thành vết trắng, khi soi dưới kính hiển vi, bào tử nấm bào ngư trong suốt, không màu và có dạng thuôn dài hình hạt đậu. Thịt nấm bào ngư được hình thành trên sự ken chặt các sợi nấm, không nhầy nhớt, không chất keo. Quả thể không tiết dịch sữa khi bị thương tổn, khi khô nhăn nhúm lại, không thể phục hồi lại dạng ban đầu khi để ẩm ướt trở lại. Nấm bào ngư sống hoại sinh trên gỗ, không độc và thường được dùng làm thực phẩm. Dựa vào các khóa phân loại theo hình thái học (Sharma, 1998 và Lê Bá Dũng, 2003), cả ba dòng nấm TCT, TBT và NBT thuộc ngành phụ nấm đám Basidiomycota, lớp Hymenomycetes, bộ Agaricales, họ Pleurotaceae và giống (chi) *Pleurotus*.

3.4 Đặc tính di truyền của ba dòng nấm tuyển chọn

Cả 3 dòng nấm đã được ly trích DNA theo qui trình trích nhanh và chạy phản ứng PCR với cặp mồi ITS1 và ITS4. Sản phẩm PCR thu được có chất lượng tốt với một băng rõ duy nhất cho mỗi dòng nấm trên gel điện di. Các băng nằm ở vị trí khoảng 600bp đến 700bp. Các sản phẩm PCR được giải trình tự và kết quả được ghi nhận như sau.

Đoạn gen của mẫu nấm TCT có độ dài 632 bp và có trình tự như sau:

```
01 AGAATTACTA TGGAGTTGTT GCTGGCCTCT AGGGGCATGT GCACGCTTCA 61
CTAGTCTTTC AACACCTGT GAACCTTTGA TAGATCTGTG AAGTCGTCTC 111
TCAAGTCGTC AGACTTGGTT GCTGGGATTT AAACGTCTCG GTGTGACTAC 161
GCAGTCTATT TACTTACACA CCCCAAATGT ATGTCTACGA ATGTCATTTA 211
ATGGGCCTTG TGCCTTTAAA CCATAATACA ACTTTCAACA ACGGATCTCT 261
TGGCTCTCGC ATCGATGAAG AACGCAGCGA AATGCGATAA GTAATGTGAA 311
TTGCAGAATT CAGTGAATCA TCGAATCTTT GAACGCACCT TCGCCCCCTT 361
GGTATTCCGA GGGGCATGCC TGTTGAGTG TCATTAAATT CTCAAACCTCA 411
CTTTGGTTTC TTTCCAATTG TGATGTTTGG ATTGTTGGGG 461 GCTGCTGGCC
TTGACAGGTC GGCTCCTCTT AAATGCATTA GCAGGACTTC 511 TCATTGCCTC
TGCGCATGAT GTGATAATTA TCACTCATCA ATAGCACGCA 561 TGAATAGAGT
CCAGCTCTCT AATCGTCCGC AAGGACAATT TGACAATTTG 611 ACCTCAAATC
AGTAGGACTA CCCGCTGAAC TTAAGCATAT GACCT
```

So sánh trình tự trên với dữ liệu ngân hàng gen trên trang web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> bằng chương trình BLAST, kết quả cho thấy trình tự nhận được giống với trình tự gen của vùng 18S ribosomal RNA (một phần); toàn bộ vùng ITS1, vùng 5,8S ribosomal RNA, vùng ITS2; và một phần vùng bán đơn vị lớn ribosomal RNA của loài *Pleurotus floridanus* – mã số (Accession number) GU721058 – với độ tương đồng 99%. Theo đó, dòng nấm bào ngư trắng TCT thuộc phân loại Eukaryota; Fungi; Dikarya; Basidiomycota; Agaricomycotina; Agaricomycetes; Agaricomycetidae; Agaricales; Pleurotaceae; Pleurotus. và loài *Pleurotus floridanus*.

Đoạn gen của mẫu nấm TBT có độ dài 593 bp và có trình tự như sau:

```
01 AGTCTTCCCA ACCACCTGTG AACTTTTGAT AGACAGTGAA GTCGTCTCTC
AAGTCGTCAG 61 ACTTGGTTGC TGGGATTTAA ACGTCTCGGT GTGACTACGC
AGTCTATTTA 110 CTTACACACC CCAAATGTAT GTCTACGAAT GTCATTTAAT
GGCCTTTGTG 161 CCTTTAAACC ATAATACAAC TTTCAACAAC GGATCTCTTG
GCTCTCGCAT 210 CGATGAAGAA CGCAGCGAAA TGCGATAAGT AATGTGAATT
GCAGAATTCA 260 GTGAATCATC GAATCTTTGA ACGCACCTTG CGCCCCTTGG
TATTCCGAGG 310 GGCATGCCTG TTTGAGTGTC ATTAATTCT CAAACTCACT
TTGGTTTCTT 360 TCCAATTGTG ATGTTTGGAT TGTTGGGGGC TGCTGGCCTT
GACAGGTCCG 410 CTCCTCTTAA ATGCATTAGC AGGACTTCTC ATTGCCTCTG
CGCATGATGT 460 GATAATTATC ACTCATCAAT AGCACGCATG AATAGAGTCC
AGCTCTCTAA 510 TCGTCCGCAA GGACAATTTG ACAATTTGAC CTCAAATCAG
GTAGGACTAC 560 CCGCTGAACT TAAGCATATC AATAGACGGA GGAAGGA
```

So sánh trình tự nhận được với dữ liệu của ngân hàng gen trên trang web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> bằng chương trình BLAST, kết quả cho thấy đoạn gen của mẫu TBT giống với trình tự gen của vùng 18S ribosomal RNA (một phần); toàn bộ vùng ITS1, vùng 5,8S rRNA, vùng ITS2; và một phần vùng bán đơn vị lớn ribosomal RNA của loài *Pleurotus floridanus* – mã số FJ810170.1 – với độ tương đồng 98%. Như vậy, dòng nấm bào ngư trắng TBT thuộc phân loại Eukaryota; Fungi; Dikarya; Basidiomycota; Agaricomycotina; Agaricomycetes; Agaricomycetidae; Agaricales; Pleurotaceae; Pleurotus. và loài *Pleurotus floridanus*.

Đoạn gen của mẫu nấm NBT có độ dài 661 bp và có trình tự như sau:

```
01 ATACATTCAA CCACTTGTGC ACTTTTGATA GATTTCGAGA GTTGCCCTCT
CAGGTCAGTA 61 AATGACTTGG TTGGTCGGGA TTGTCACAGT CCTGGCTTTG
ACTTTGTGGG 110 TCTATTATCT TATACACACT TGTATGTCCA TGAATGTTAT
TTTCTTGGGC 161 CATGTGCCTA TAAAACCTAA TACAACCTTC AACAAACGGAT
CTCTTGGCTC 210 TCGCATCGAT GAAGAACGCA GCGAAATGCG ATAAGTAATG
TGAATTGCAG 261 AATTCAGTGA ATCATCGAAT CTTTGAACGC ACCTTGCGCC
CCTTGGTATT 310 CCGAGGGGCA TGCCTGTTTG AGTGTCATTA AATTCTCAAA
TCTATAGAGC 360 TTTTTTGTGA TATAGATTG GATTGTTGGG GGCTGCTGGC
TTTTTACCAA 410 GTTGGCTCCT CTAAATGCA TTAGCGGGAC TTTATTGCCT
CTGCGCACAG 460 TGTGATAATT ATCTACGCTG GCCGACATGC AATGACTTTA
CAAGTCCAGC 510 TTTCTAACTG TCTTTCAAGA CAATGACTTG ACAATTTGAC
CTCAAATCAG 560 GTAGGACTAC CCGCTGAACT TAAGCATATC AATAAGCGGA
GGAAAGATCA 610 TTAATGAATT ACTCATGAAG CTGATGCTGG TCTCTCGGGA
CATGTGCACG 661 C
```

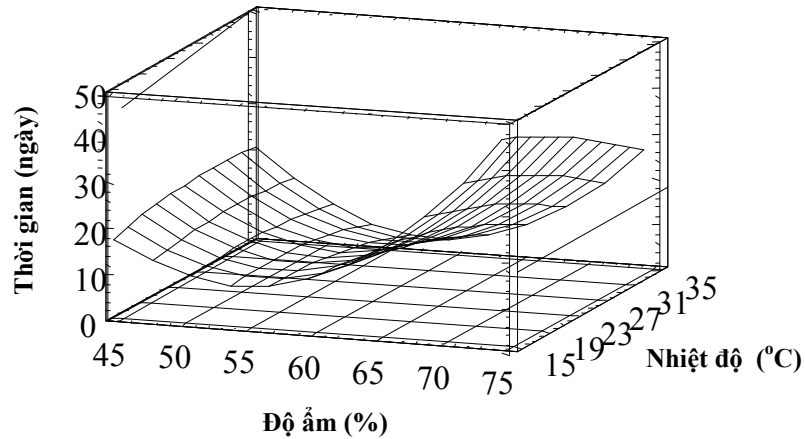
Đối chiếu với dữ liệu trên ngân hàng gen tại trang web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> bằng chương trình BLAST, trình tự trên tương đồng với một phần đoạn gen 18S ribosomal RNA; toàn bộ vùng ITS1, vùng 5,8S ribosomal RNA, vùng ITS2; và một phần đoạn bán đơn vị lớn ribosomal RNA của loài *Pleurotus cystidiosus* với mã số (Accession number) DQ978222.1 – độ tương đồng 100%. Như vậy, dòng nấm bào ngư trắng nhật NBT thuộc loài *Pleurotus cystidiosus* và được xếp bậc phân loại như sau: Eukaryota; Fungi; Dikarya; Basidiomycota; Agaricomycotina; Agaricomycetes; Agaricomycetidae; Agaricales; Pleurotaceae; Pleurotus. và loài *Pleurotus cystidiosus*.

Kết quả định danh theo hình thái học và sinh học phân tử có sự tương đồng cơ bản. Cả 3 dòng nấm đều thuộc giống *Pleurotus*, ngành phụ nấm đảm Basidiomycota. Kết quả phân loại theo phương pháp sinh học phân tử bổ sung một số bậc phân loại như dưới ngành Agaricomycotina, lớp Agaricomycetes, dưới lớp Agaricomycetidae. Ngoài ra, nấm bào ngư được xếp vào họ Agaricaceae theo phương pháp định danh hình thái học, và họ Pleurotaceae theo phương pháp định danh sinh học phân tử. Sự khác biệt này bắt nguồn từ hệ thống phân loại khác nhau giữa hai phương pháp. Phương pháp hình thái học được thiết lập dựa theo bậc phân loại của Ainsworth (1973) có sự bổ sung của Sharma (1998). Bậc phân loại theo sinh học phân tử được thiết lập dựa trên việc so sánh các trình tự gen của các dòng nấm, đặc biệt là các gen mang thông tin phiên mã ra rRNA. Nhiều tác giả đã tham gia xây dựng bậc phân loại nấm dựa theo các thông tin sinh học phân tử. Các kết quả được David S. Hibbett *et al.* (2007) tổng hợp và đưa ra một bộ phân loại nấm mới. Nhìn chung, phương pháp sinh học phân tử chỉ bổ sung, sắp xếp lại hoặc thay đổi một số bậc phân loại trên giống; tên giống và loài của các dòng nấm vẫn được giữ nguyên.

3.5 Kết quả khảo sát điều kiện nuôi cấy meo giống nấm bào ngư

Dòng nấm bào ngư trắng TCT 1.2 có hoạt tính phân giải tinh bột cao nhất được tuyển chọn cho thí nghiệm khảo sát điều kiện thích hợp nuôi cấy meo giống. Nấm TCT 1.2 sau khi được nuôi cấy và phát triển trên đĩa petri được cấy vào các túi môi trường lúa. Thí nghiệm được bố trí có ba nhân tố gồm độ ẩm, nhiệt độ và công thức môi trường, mỗi nhân tố có ba mức độ khác nhau. Mỗi nghiệm thức có 3 lần lặp lại. Trong suốt quá trình ủ, kết quả cho thấy hệ sợi nấm phát triển từ từ theo thời gian ủ và không có hiện tượng nhiễm xảy ra của các túi meo giống. Thời gian sợi nấm phát triển và lan đầy các túi môi trường được ghi nhận và được phân tích thống kê.

Kết quả phân tích cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa ở mức độ tin cậy 95% của thời gian sợi nấm lan đầy túi giữa các nhiệt độ ủ khác nhau ở 20°C, 25°C, 30°C, với ba mức thời gian trung bình lần lượt là 12,7 ngày; 11,2 và 8,8 ngày. Như vậy ở nhiệt độ 30°C các túi meo giống được phát triển trong thời gian ủ ngắn nhất. Đối với độ ẩm gồm ba mức độ khác nhau 55%, 60%, 65%, kết quả phân tích thống kê cho thấy ở độ ẩm 55% và 60% thời gian sợi nấm phát triển và lan đầy túi meo giống khác biệt không ý nghĩa ở mức 95%, nhưng ở độ ẩm 65% thì khác biệt có ý nghĩa. Kết quả thời gian trung bình để sợi nấm lan đầy túi meo ở ba mức độ độ ẩm 55%, 60%, 65% lần lượt là 9,4 ngày, 9,4 ngày, 13,8 ngày. Từ kết quả này cho thấy ở độ ẩm 55% và 60% thích hợp cho thời gian ủ meo giống ngắn nhất. Tuy nhiên, ở các nghiệm thức sử dụng ba loại công thức làm meo giống khác nhau cho kết quả khác biệt không có ý nghĩa ở mức 95%. Dựa trên những kết quả phân tích thống kê của ba nhân tố thử nghiệm và mối tương tác của các tổ hợp gồm nhiệt độ, độ ẩm, và công thức môi trường, từ đó có thể xác định tổ hợp điều kiện tối ưu thích hợp cho thời gian ủ meo giống. Kết quả này được trình bày trong Hình 7, trong đó cho thấy điều kiện thích hợp làm meo giống là ở độ ẩm 57% và nhiệt độ ủ là 27°C.



Hình 7: Bào tử nấm bào ngư nhậKết quả phân tích điều kiện tối ưu trong chuẩn bị meo giống nấm bào ngư t NBT

4 KẾT LUẬN

Từ 6 loại mẫu nấm bào ngư tươi, phân lập được 18 dòng nấm thuần. Kết quả hoạt tính phân giải tinh bột của các dòng nấm phân lập đã xác định được ba nhóm có hoạt tính khác biệt nhau. Ba dòng nấm tiêu biểu được định danh dựa theo hình thái học và sinh học phân tử, kết quả xác định hai dòng nấm bào ngư trắng TCT và TBT thuộc loài *Pleurotus floradinus* và dòng nấm bào ngư nhậ NBT thuộc loài *Pleurotus cystidiosus*. Điều kiện thích hợp cho quá trình ủ meo giống là ẩm độ 57% và nhiệt độ 27°C.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ainsworth G. C. 1973. *The Fungi: An advanced treatise*, IVB. Academic Press, New York.
- Andrej Jedinak and Daniel Sliva 2008. *Pleurotus ostreatus* inhibits proliferation of human breast and colon cancer cells through p53-dependent as well as p53-independent pathway. *International Journal of Oncology* 33: 1307-1313.
- Bobek P. and S. Galbavý 1999. *Hypocholesterolemic and antiatherogenic effect of oyster mushroom (Pleurotus ostreatus) in rabbits*. Research Institute of Nutrition, Bratislava, Slovak Republic, Nahrung.
- David S. Hibbett, Manfred Binder, Joseph F. Bischoff, Meredith Blackwell, Paul F. Cannon, Ove E. Eriksson, Sabine Huhndorf, Timothy James, Paul M. Kirk, Robert Lücking, Thorsten Lumbsch, François Lutzoni, P. Brandon Matheny, David J. McLaughlin, Martha J. Powell, Scott Redhead, Conrad L. Schoch, Joseph W. Spatafora, Joost A. Stalpers, Rytas Vilgalys, M. Catherine Aime, André Aptroot, Robert Bauer, Dominik Begerow, Gerald L. Benny, Lisa A. Castlebury, Pedro W. Crous, Yu-Cheng Dai, Walter Gams, David M. Geiser, Gareth W. Griffith, Cécile Gueidan, David L. Hawksworth, Geir Hestmark, Kentaro Hosaka, Richard A. Humber, Kevin Hyde, Joseph E. Ironside, Urmas Köljalg, Cletus P. Kurtzman, Karl-Henrik Larsson, Robert Lichtwardt, Joyce Longcore, Jolanta Miądlikowska, Andrew Miller, Jean-Marc Moncalvo, Sharon Mozley-Standridge, Franz. Oberwinkler, Erast Parmasto, Valérie Reeb, Jack D. Rogers, Claude Roux, Leif Ryvarden, José Paulo Sampaio, Arthur Schuessler, Junta Sugiyama, R. Greg Thorn, Leif

- Tibell, Wendy A. Untereiner, Christopher Walker, Zheng Wang, Alex Weir, Michael Weiss, Merlin M. White, Katarina Winka, Yi-Jian Yao, Ning Zhang 2007. A Higher-Level Phylogenetic Classification of the Fungi. *Elsevier Editorial System(tm) for Mycological Research*, USA: 1 – 97.
- Dung, N.T.P., Rombouts, F.M., and Nout, M.J.R. 2006. Functionality of selected strains of moulds and yeasts from Vietnamese rice wine starters. *Food Microbiology* 23, 331-340.
- Đặng Châu Linh 2008. *Đậu tương & nấm loại thực phẩm giàu chất dinh dưỡng*, Nxb Hà Nội.
- Lê Bá Dũng 2003. *Nấm lớn Tây Nguyên*, Nxb Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
- Lê Duy Thắng 1997. *Kỹ thuật trồng nấm*. Nxb Nông Nghiệp, Thành phố Hồ Chí Minh.
- Nguyễn Lâm Dũng 2001. *Công nghệ nuôi trồng nấm (tập 1)*. Nxb Nông Nghiệp, Hà Nội.
- Nguyễn Lâm Dũng 2002. *Công nghệ nuôi trồng nấm (tập 2)*. Nxb Nông Nghiệp, Hà Nội.
- Sharma O.P. 1998. *Textbook of Fungi*, 5th edition. Tata McGraw-Hill Publishing Company Limited, New Delhi.
- Trần Đình Đăng và Nguyễn Hữu Ngoan 2007. *Tổ chức sản xuất một số loại nấm ăn ở trang trại & gia đình*, Nxb Nông nghiệp, Thành phố Hồ Chí Minh.
- White T.J., Bruns T.D., Lee S. and Taylor J. 1990. *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR Protocols a Guide to Methods and Applications*, Academic Press, San Diego, USA.