

MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM SINH TRƯỞNG HỆ SỢI, SỰ HÌNH THÀNH VÀ PHÁT TRIỂN QUẢ THỂ NẤM LINH CHI (*Ganoderma orbiforme*) FM6 THU THẬP TẠI VƯỜN QUỐC GIA PÙ MÁT

Nguyễn Thị Luyện^{1*}, Nguyễn Thị Huyền Trang², Ngô Xuân Nghiễn^{1,2}, Nguyễn Xuân Cảnh¹

¹Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

²Viện Nghiên cứu và Phát triển Nấm ăn, Nấm dược liệu, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

*Tác giả liên hệ: ntluyen@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 03.10.2023

Ngày chấp nhận đăng: 25.12.2023

TÓM TẮT

FM6 là chủng linh chi được phát hiện mọc tự nhiên ở vườn quốc gia Pù Mát, huyện Con Cuông, tỉnh Nghệ An. Mục tiêu của nghiên cứu là dựa vào phương pháp khuếch đại vùng ITS của chủng nấm thu được bằng cặp mồi ITS4/ITS5 nhằm định danh chủng nấm Linh chi mới này và bước đầu khảo sát đặc điểm sinh trưởng của hệ sợi trên các nguồn cacbon, nitơ khác nhau. Bên cạnh đó, đánh giá ảnh hưởng của tỷ lệ cám mạch bổ sung vào cơ chất nuôi trồng đến sinh trưởng hệ sợi và sự hình thành quả thể chủng nấm này. Kết quả giải trình tự và chạy BLAST trên NCBI cho thấy chủng nấm FM6 tương đồng với loài *Ganoderma orbiforme* với tỷ lệ hơn 99%. Fructose (hàm lượng 15 g/l), NH₄Cl (hàm lượng 2 g/l) lần lượt là nguồn cacbon, nitơ thích hợp nhất đối với sinh trưởng hệ sợi chủng nấm Linh chi FM6. Cám mạch bổ sung với tỷ lệ 10% cho hiệu suất nấm thu được cao nhất đạt 8,84%.

Từ khóa: Quả thể, Linh chi, hệ sợi, cơ chất, Pù Mát, Việt Nam.

Mycelial Growth Characteristics and Formation and Development of Fruiting Bodies of Natural Lingzhi (*Ganoderma orbiforme*) FM6 Collected in Pu Mat National Park

ABSTRACT

FM6 lingzhi strain was discovered growing naturally in Pu Mat National Park, Con Cuong District, Nghe An Province. This study aims to use the ITS4/ITS5 primer pair to amplify the ITS region of the new collected mushroom strain to identify this strain and initially investigate the growth characteristics of the mycelia on different carbon and nitrogen sources. In addition, the effect of wheat bran ratio added to the culture substrate on the mycelial growth and the formation of fruiting bodies of this strain was evaluated. The results of sequencing and running BLAST on NCBI showed that FM6 strain was more than 99% similar to the species *Ganoderma orbiforme*. Fructose (15g/l) and NH₄Cl (2g/l) were the most suitable carbon and nitrogen sources, respectively, for the growth of lingzhi strain FM6. Substrate supplemented with 10% wheat bran performed the highest BE, reaching 8.84%.

Keywords: Lingzhi, fruit body, mycelial, substrate, Pu Mat, Vietnam.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ganoderma là một chi nấm lỗ thuộc họ *Ganodermataceae* bao gồm khoảng 80 loài, trong đó có nhiều loài được tìm thấy ở vùng nhiệt đới (Kirk & cs., 2008). Theo Luangharn & cs. (2021), từ lâu nhiều loài trong chi *Ganoderma* đã được coi là loại dược liệu quý trong y học phương Đông. Tại Trung Quốc, chi *Ganoderma* được sử dụng

nhờ một phương thuốc để chữa ung thư (Stanley & cs., 2005), bệnh gan (Aarisawa & cs., 1986), tăng cường hoạt động của các tế bào NK (Natural Killer) ở lách và tăng sản xuất interferon huyết thanh ở chuột (Won & cs., 1992). Có hơn 400 thành phần chứa hoạt chất sinh học khác nhau được tìm thấy trong quả thể các loài thuộc chi *Ganoderma* (Sabulal & cs., 2015). Trong số đó các thành phần hóa học được sử dụng nhiều nhất và

quan trọng nhất là polysaccharide, triterpenoid và protein. Các thành phần dược lý có trong chi nấm này giúp chúng có khả năng chống ung thư, trị bệnh đái tháo đường, chống viêm, chống oxy hóa, điều hòa miễn dịch, hạ đường huyết, bảo vệ thần kinh, bảo vệ gan (Su & cs., 2020). Số lượng loài được xác định thuộc chi *Ganoderma* khá lớn, tuy nhiên những nghiên cứu về hoạt chất dược liệu chủ yếu tập trung vào một số loài như *Ganoderma applanatum* (Elkhateeb & cs., 2018), *Ganoderma sinensis* (Li & cs., 2018), *Ganoderma lucidum* (Ahmad & cs., 2021), *Ganoderma tuberculosum*, *Ganoderma tornatum*, *Ganoderma martinidice* (Victoria & cs., 2021).

Việc tìm kiếm và nghiên cứu về các loài mới thuộc chi *Ganoderma* nhận được sự quan tâm khá lớn từ các nhà khoa học. Cách thu thập quả thể tự nhiên, sau đó nuôi trồng nhân tạo là phương pháp thực tế nhất để bảo tồn nguồn gen (Nguyen & cs., 2021a). Bên cạnh đó, việc nghiên cứu các đặc điểm sinh trưởng, sự hình thành và phát triển quả thể nấm cũng vô cùng quan trọng. Đây là bước tiền đề cho sự phát triển mở rộng quy mô nuôi trồng đối với những loài nấm có giá trị dược liệu, giá trị kinh tế cao. Vườn quốc gia Pù Mát thuộc địa phận tỉnh Nghệ An nằm trong vùng nhiệt đới gió mùa, và chịu ảnh hưởng lớn của dãy Trường Sơn nên khí hậu ở đây có sự phân hóa và khác biệt so với trong khu vực. Chính vì vậy, đã tạo ra sự đa dạng sinh thái phù hợp cho sự sinh trưởng, phát triển của nhiều loài nấm lớn, đồng thời có sự đa dạng cao giữa các mùa trong năm tuy nhiên những nghiên cứu cũng như công bố về các loài nấm lớn ở đây còn nhiều hạn chế và hầu như chưa được thực hiện. Chủng nấm FM6 được thu thập tại đây nhận định là một loài linh chi có hoạt chất dược liệu tốt. Do đó, việc định danh và thực hiện nghiên cứu cơ bản về đặc điểm sinh trưởng và sự phát triển quả thể của chủng nấm này là vô cùng ý nghĩa.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Chủng nấm FM6 được thu thập tại vườn Quốc gia Pù Mát, huyện Con Cuông, tỉnh Nghệ An. Mẫu thu nhận được phân lập, nuôi cấy

thuần khiết trên môi trường PGA cải tiến, thành phần môi trường gồm dịch chiết 200g khoai tây, dịch chiết 200g giá đỗ, 20g đường glucose và 16g agar)/1.000ml.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Định danh chủng nấm

Dựa vào phân tích vùng trình tự ITS (Internal Transcribed Spacer) của chủng nấm FM6. DNA tổng số được tách chiết theo phương pháp của Schwessinger & McDonald (2017). Khuếch đại vùng ITS của chủng nấm bằng cặp mồi ITS4/ITS5 (White & cs., 1990), ITS4: 5NTCC TCC GCTTAT TGA TAT GC3N; ITS5: 5NGGA AGT AAAAGT CGT AAC AAG G3N. Mức độ tương đồng của các trình tự gen mã hóa vùng ITS của chủng nấm được so sánh bằng công cụ tìm kiếm BLAST từ Trung tâm Thông tin Công nghệ sinh học Quốc gia, Hoa Kỳ (NCBI; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Sử dụng phần mềm MEGAX để xây dựng cây phát sinh loài (Kumar & cs., 2018), phương pháp phân tích Maximum Parsimony được chọn với độ tin cậy (bootstrap) là lặp lại 1.000 lần.

2.2.2. Đánh giá khả năng sinh trưởng của hệ sợi nấm Linh chi FM6 trên môi trường bổ sung các nguồn cacbon khác nhau

Hệ sợi nấm Linh chi FM6 được nuôi cấy trên môi trường PA (dịch chiết 200g khoai tây + 16g agar)/1 lít môi trường, bổ sung 5 nguồn cacbon khác nhau: glucose, fructose, saccharose, tinh bột tan, lactose với hàm lượng 20 g/l.

Mỗi công thức thí nghiệm được nuôi cấy trên 5 đĩa pettri, nhắc lại 3 lần. Sau khi cấy giống, hệ sợi được nuôi ở nhiệt độ $26^{\circ}\text{C} \pm 1$, điều kiện tối.

2.2.3. Đánh giá khả năng sinh trưởng của hệ sợi nấm Linh chi FM6 trên môi trường bổ sung hàm lượng Fructose khác nhau

Fructose được xác định là nguồn cacbon phù hợp nhất cho hệ sợi nấm Linh chi FM6 sinh trưởng, hệ sợi nấm tiếp tục được theo dõi trên môi trường có bổ sung hàm lượng fructose khác nhau (0g; 10g; 15g; 20g; 25g; 30g). Mỗi công thức thí nghiệm được nuôi cấy trên 5 đĩa pettri và nhắc lại 3 lần. Các đĩa thí nghiệm nuôi ở nhiệt độ $26^{\circ}\text{C} \pm 1$.

Một số đặc điểm sinh trưởng hệ sợi, sự hình thành và phát triển quả thể nấm Linh chi (*Ganoderma orbiforme*) FM6 thu thập tại vườn quốc gia Pù Mát

Bảng 1. Danh sách các loài trên Genbank sử dụng trong nghiên cứu

Tên loài	Mã trình tự
<i>Ganoderma orbiforme</i> Cui 13880	MG279187
<i>Ganoderma mastoporum</i> TNM-F0018835	JX840351
<i>Ganoderma fornicatum</i> TNM-F0009926	JX840348
<i>Ganoderma cupreum</i> HMAS130804	JX840345
<i>Ganoderma austral</i> G88	MZ665511
<i>Ganoderma ecuadorensis</i> Dai 17418	MZ354951
<i>Ganoderma nasalanense</i> LPDR17060211	MK345441
<i>Ganoderma japonicum</i> AS5.69	AY593864
<i>Ganoderma lucidum</i> G7	KX262901

2.2.4. Đánh giá khả năng sinh trưởng của hệ sợi nấm Linh chi FM6 trên môi trường bổ sung các nguồn nitơ khác nhau

Kế thừa kết quả của các thí nghiệm trước, thí nghiệm này sẽ sử dụng môi trường nên bổ sung 6 nguồn nitơ gồm cao nấm men, peptone, casein, NH_4NO_3 và $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ với hàm lượng 2 g/l. Mỗi công thức thí nghiệm được nuôi cấy trên 5 đĩa petri và nhắc lại 3 lần. Các đĩa thí nghiệm được nuôi ở nhiệt độ $26^\circ\text{C} \pm 1$.

2.2.5. Đánh giá khả năng sinh trưởng của hệ sợi nấm Linh chi FM6 trên môi trường bổ sung hàm lượng NH_4Cl khác nhau

Thí nghiệm này đánh giá sinh trưởng hệ sợi nấm Linh chi FM6 trên môi trường được bổ sung hàm lượng NH_4Cl khác nhau (0g; 1g; 2g; 3g; 4g; 5g). Mỗi công thức thí nghiệm được nuôi cấy trên 5 đĩa petri và nhắc lại 3 lần. Các đĩa thí nghiệm nuôi ở nhiệt độ $26^\circ\text{C} \pm 1$

2.2.6. Đánh giá khả năng sinh trưởng của hệ sợi và hình thành quả thể nấm Linh chi FM6 trên nguyên liệu bổ sung tỷ lệ cám mạch khác nhau

Chủng nấm Linh chi FM6 được nuôi cấy trên nền cơ chất gồm mùn cưa và 1% CaCO_3 và lần lượt bổ sung thêm 5 tỷ lệ cám mạch khác nhau (0, 5, 10, 15 và 20%). Nguyên liệu được xử lý, chỉnh ẩm và phối trộn theo phương pháp của Đinh Xuân Linh & cs. (2007).

Các bịch thí nghiệm được đặt tại phòng ươm có nhiệt độ 25°C đến 28°C , độ ẩm không khí

65-75%. Sau 30 ngày ươm sợi, bịch được rạch, sau đó chuyển sang phòng nuôi quả thể có nhiệt độ $27-30^\circ\text{C}$, độ ẩm 85-90%.

2.2.7. Chỉ tiêu theo dõi

Độ dày hệ sợi được đánh giá theo ba mức: dày (+++), trung bình (++) và mỏng (+) (Trịnh Tam Kiệt, 2012).

Hiệu suất sinh học = $\frac{\text{Khối lượng nấm tươi (g)}}{\text{Tổng khối lượng nguyên liệu khô (g)}} \times 100\%$ (Nguyễn Thị Huyền Trang & cs., 2022).

Tốc độ trung bình hệ sợi (mm/ngày) = $\frac{\text{Độ dài trung bình hệ sợi (mm)}}{\text{Thời gian hệ sợi sinh trưởng (ngày)}}$ (Trịnh Tam Kiệt, 2012).

2.3. Xử lý số liệu

Số liệu nghiên cứu được tổng hợp và xử lý bằng phần mềm Excel và phần mềm IRRISTAT 5.0, sử dụng phương pháp phân tích phương sai Blance ANOVA với độ tin cậy 95%

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả giải trình tự và định danh

Quả thể chủng nấm FM6 được tìm thấy và thu hái tại vườn quốc gia Pù Mát thuộc huyện Con Cuông, tỉnh Nghệ An (vị trí GPS: $18^\circ59'0''\text{B}$ $104^\circ40'0''\text{Đ}$ / $18,98333^\circ\text{B}$ $104,66667^\circ\text{Đ}$) (Hình 1). Trong tự nhiên nấm mọc trên thân và gốc cây cổ thụ, tán nấm có hình quạt hoặc vò hén, kích thước khoảng $4,5-5,5 \times 6,5-9\text{cm}$, bề mặt màu nâu sẫm. Mô nấm màu nâu sẫm,

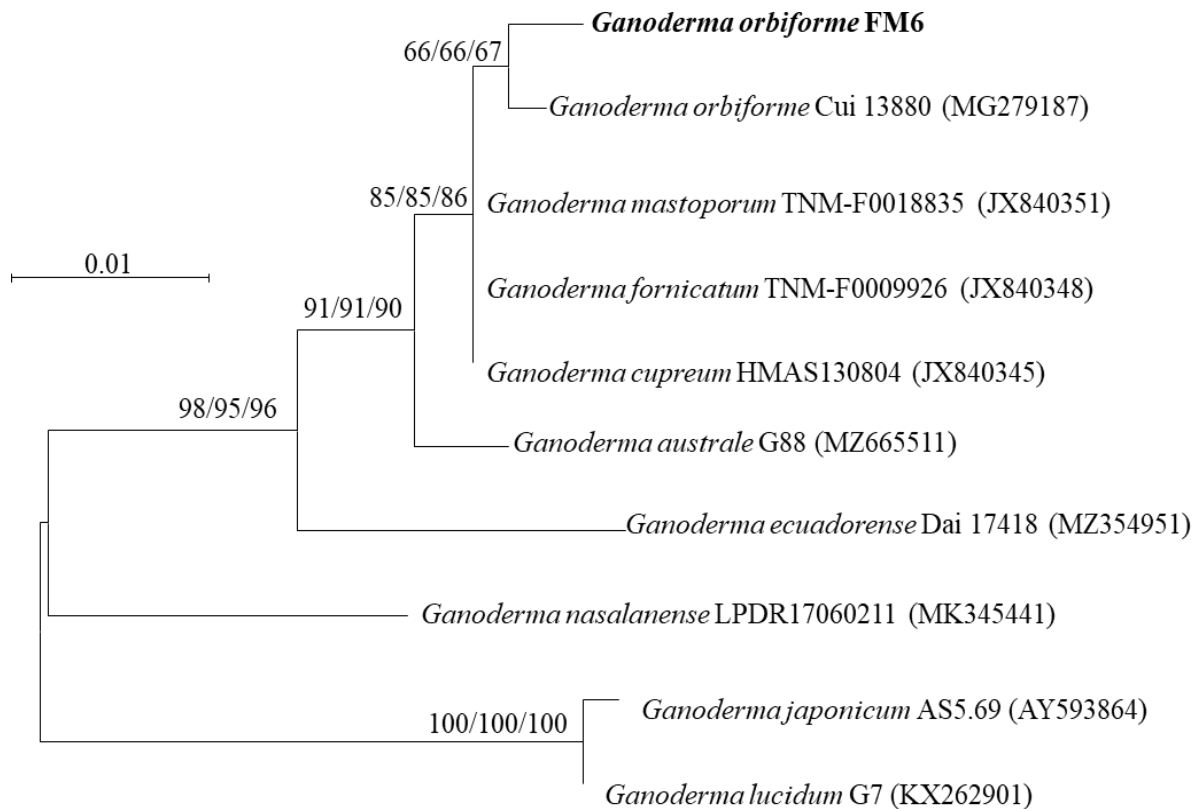
miệng ống nấm hình tròn, 5-6 lỗ/mm. Cuống nấm dính bèn, có độ dài từ 2-4cm.

Sau khi thu hái quả thể tự nhiên, hệ sợi chủng nấm được phân lập và giải trình tự gen. Kết quả giải trình tự với cặp mồi ITS4/ITS5, xây dựng cây phát sinh loài của nấm Linh chi FM6 (Hình 2). Sau khi đối chiếu trình tự gen giải được với cơ sở dữ liệu trên NCBI, kết quả

nhận được chủng nấm FM6 có tỷ lệ tương đồng 99,35% với *Ganoderma orbiforme* Cui 13880. Dựa trên sự giống nhau về giải trình tự ITS và xây dựng cây phát sinh loài có thể khẳng định chủng FM6 thuộc loài *Ganoderma orbiforme* (tên đồng danh khác *Ganoderma mastoporum*, *Ganoderma fornicatum*, *Ganoderma cupreum*).



Hình 1. Hình ảnh quả thể nấm Linh chi FM6 trong tự nhiên và hệ sợi nấm nuôi cấy trên môi trường PGA



Hình 2. Cây phát sinh loài dựa trên trình tự ITS của chủng nấm Linh chi FM6

Một số đặc điểm sinh trưởng hệ sợi, sự hình thành và phát triển quả thể nấm Linh chi (*Ganoderma orbiforme*) FM6 thu thập tại vườn quốc gia Pù Mát

Ganoderma orbiforme là loài nấm mới chưa có nhiều nghiên cứu được thực hiện nhưng loài nấm này chứa một số hoạt chất quý như ergosta-4,6,8 và 22-tetraen-3-one có tác dụng ức chế Superoxide anion và giải phóng Elastase, do đó có ứng dụng tốt trong việc điều trị viêm nhiễm (Tran Dinh Thang & cs., 2013). Bốn triterpenoids mới bao gồm 3,4-seco-27-norlanostane, ganoboninketals E (1), F (2) và ganoboninones G (3), H (4) cùng với một lanostane mới C₃₀ (24Z)-3 β ,27-dihydroxylanosta-7,9(11),24-triene (7) được phân lập từ quả thể loài *G. orbiforme* cho thấy tác dụng chống lại hoạt động của vi khuẩn Gram dương (Wei & cs., 2018). Trong một nghiên cứu của Isaka & cs. (2017), đã phân lập các lanostane từ chủng nấm BBC 22.325 thuộc loài *G. orbiforme* và nhận định rằng một số lanostane trong hệ sợi loài nấm này có hoạt tính kháng lại Mycobacteria bệnh lao H₃₇Ra.

3.2. Ảnh hưởng của nguồn và hàm lượng cacbon đến sinh trưởng hệ sợi nấm Linh chi FM6

Sau khi cấy giống được 4 ngày, hệ sợi nấm Linh chi FM6 bắt đầu sinh trưởng mạnh, tốc độ sinh trưởng hệ sợi giữa các công thức môi trường có sự khác nhau (Bảng 2). Hệ sợi chủng FM6 sinh trưởng nhanh nhất trên môi trường bổ sung fructose và saccharose, tốc độ trung bình của hệ sợi lần lượt đạt 6,16 mm/ngày và 6,10 mm/ngày. Hệ sợi nấm Linh chi FM6 sinh trưởng tốt trên nền môi trường sử dụng glucose và tinh bột tan, hệ sợi đạt tốc độ trung bình lần lượt là 6,07 mm/ngày và 6,08 mm/ngày. Hệ sợi chủng nấm sinh trưởng kém nhất (trung bình đạt 3,00 mm/ngày) khi được nuôi cấy trên môi trường bổ sung lactose.

Mật độ hệ sợi chủng FM6 được ghi nhận dường như không có sự khác biệt nhiều giữa các công thức môi trường (Hình 3a). Trên hầu hết các nguồn cacbon, hệ sợi chủng nấm sinh trưởng mạnh, hệ sợi phát triển mượt, đồng đều và dày. Căn cứ vào tốc độ trung bình hệ sợi và mật độ hệ sợi, fructose được kết luận là nguồn cacbon phù hợp cho sinh trưởng hệ sợi chủng FM6.

Ảnh hưởng của nguồn cacbon đến sinh trưởng hệ sợi nấm còn phụ thuộc vào môi

trường nuôi cấy, chủng giống và điều kiện nuôi cấy (Ito & Reshi, 2014). Rất nhiều công trình nghiên cứu về ảnh hưởng của nguồn cacbon đến sinh trưởng hệ sợi nấm các loài trong chi *Ganoderma* cho kết quả không tương tự nhau. Nguồn cacbon phù hợp nhất đối với sinh trưởng hệ sợi chủng nấm *G. lucidum* 447 là glucose (George & cs., 2008); chủng nấm *G. applanatum* là mannose và dextrin (Woo-Sik Jo & cs., 2009); chủng nấm *G. sinensis* là fructose (Luyen Thi Nguyen & cs., 2023); chủng nấm *G. lucidum* Ga-TB là glucose (Giang Van Nguyen & cs., 2023).

Nồng độ cacbon trong môi trường nuôi cấy rất quan trọng cho sự phát triển của tế bào và sự chuyển hóa các chất tối ưu (Zou, 2005). Vì vậy 7 mức hàm lượng fructose được bổ sung vào môi trường để đánh giá tốc độ và đặc điểm hệ sợi nấm Linh chi FM6. Kết quả bảng 3 chỉ ra rằng khi bổ sung với hàm lượng 15 g/l, hệ sợi chủng nấm FM6 sinh trưởng nhanh nhất đạt tốc độ trung bình 6,17 mm/ngày, tiếp đó là môi trường được bổ sung 10g fructose/l (6,12 mm/ngày). Việc bổ sung fructose với hàm lượng cao làm chậm khả năng sinh trưởng của hệ sợi, tốc độ trung bình hệ sợi đạt được chậm nhất 4,67 mm/ngày (khi bổ sung 30 g/l) và 4,78 mm/ngày (25 g/l). Sự khác nhau về hàm lượng fructose trong môi trường nuôi cấy cho thấy sự khác nhau rõ rệt về mật độ hệ sợi. Công thức không bổ sung fructose cho kết quả về tốc độ hệ sợi khá nhanh, nhưng mật độ hệ sợi mảnh. Với các công thức môi trường được bổ sung nồng độ fructose quá cao (30 g/l và 25 g/l) cũng khiến hệ sợi chủng nấm bị ức chế cả về tốc độ sinh trưởng và mật độ hệ sợi. Với hàm lượng fructose bổ sung trong ngưỡng 10 g/l đến 20 g/l cho thấy hệ sợi sinh trưởng khỏe, đồng đều, mật độ hệ sợi dày (Hình 3b). Căn cứ vào kết quả về tốc độ sinh trưởng trung bình và mật độ hệ sợi cho thấy khi bổ sung fructose với 15 g/l là hàm lượng phù hợp để bổ sung vào môi trường để hệ sợi chủng FM6.

3.3. Ảnh hưởng của nguồn và hàm lượng nitơ đến sinh trưởng hệ sợi nấm Linh chi FM6

Trong 6 nguồn nitơ được sử dụng để đánh giá, hệ sợi chủng nấm FM6 sinh trưởng nhanh

nhất trên nền môi trường bổ sung NH_4Cl , tốc độ trung bình hệ sợi đạt 6,16 mm/ngày. Tiếp đó là trên các môi trường sử dụng NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ và casein, tốc độ trung bình hệ sợi lần lượt đạt 6,11 mm/ngày; 6,10 mm/ngày và 6,09 mm/ngày. Trên nền môi trường bổ sung cao nấm men và peptone, hệ sợi chủng nấm sinh trưởng chậm hơn so với 3 môi trường còn lại, tốc độ trung bình hệ sợi ghi nhận được là 6,04 mm/ngày và 6,07 mm/ngày (Bảng 4). Mật độ hệ sợi giữa các môi trường có sự khác nhau rõ rệt (Hình 4a). Khi nuôi trên môi trường bổ sung cao nấm men, peptone, casein, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hệ sợi sinh trưởng mạnh, phát triển đồng đều và hệ sợi rất dày. Ngược lại, trên nền môi trường sử dụng NH_4NO_3 , hệ sợi sinh trưởng nhanh, nhưng thưa mảnh. Đối với môi trường

bổ sung NH_4Cl , hệ sợi sinh trưởng đồng đều, nhanh, mật độ hệ sợi trung bình. Ammonium acetate, glycine, arginine và calcium nitrate là các nguồn nitơ phù hợp nhất cho hệ sợi các chủng nấm Linh chi tự nhiên thuộc loài *Ganoderma lucidum* (Jayasinghe & cs., 2008). Chủng linh chi Ga-TB thuộc loài *Ganoderma lucidum* cho thấy khả năng sinh trưởng tốt nhất trên nền môi trường bổ sung amoni sulfate (Giang Van Nguyen & cs., 2023). Woo-Sik & cs. (2009) kết luận rằng loài nấm *Ganoderma applanatum* sinh trưởng tốt nhất trên hai nguồn nitơ là chiết xuất nấm men và chiết xuất mạch nha. Đối với loài nấm *Ganoderma sinensis*, Luyen Thi Nguyen & cs. (2023) kết luận rằng cao nấm men là nguồn nitơ thích hợp nhất.

Bảng 2. Khả năng sinh trưởng của hệ sợi nấm Linh chi FM6 trên các môi trường bổ sung nguồn cacbon khác nhau

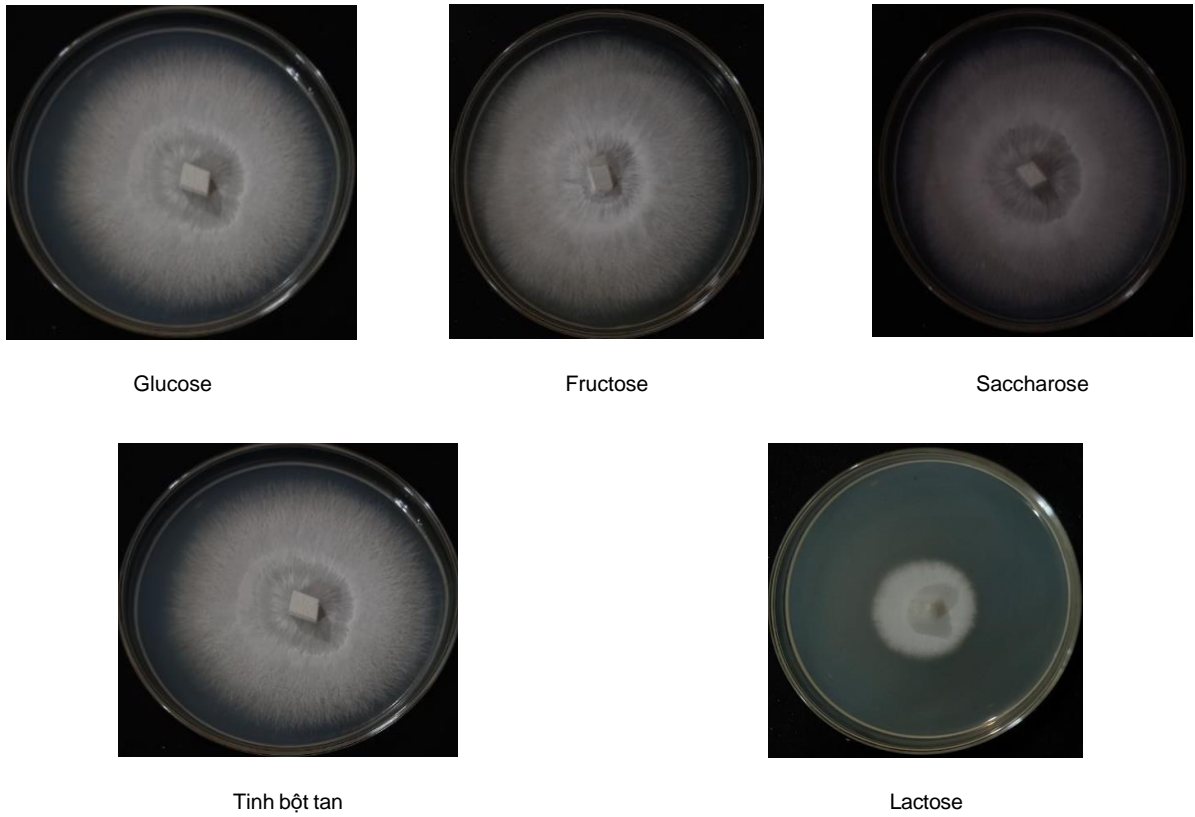
Nguồn cacbon (20 g/l)	Đường kính trung bình hệ sợi (mm)		Tốc độ trung bình của hệ sợi (mm/ngày)	Độ dày hệ sợi
	Sau 3 ngày	Sau 9 ngày		
Glucose	16,67	86,00	6,07	+++
Fructose	18,17	86,33	6,16	+++
Saccharose	18,67	85,33	6,10	++
Tinh bột tan	18,00	85,17	6,08	+++
Lactose	12,93	54,00	3,00	+++
LSD _{0,05}	2,83	2,79	0,27	
CV%	8,9	1,9	2,7	

Ghi chú: (*) Tốc độ trung bình sợi mọc tính trong toàn bộ giai đoạn sợi mọc kín môi trường.

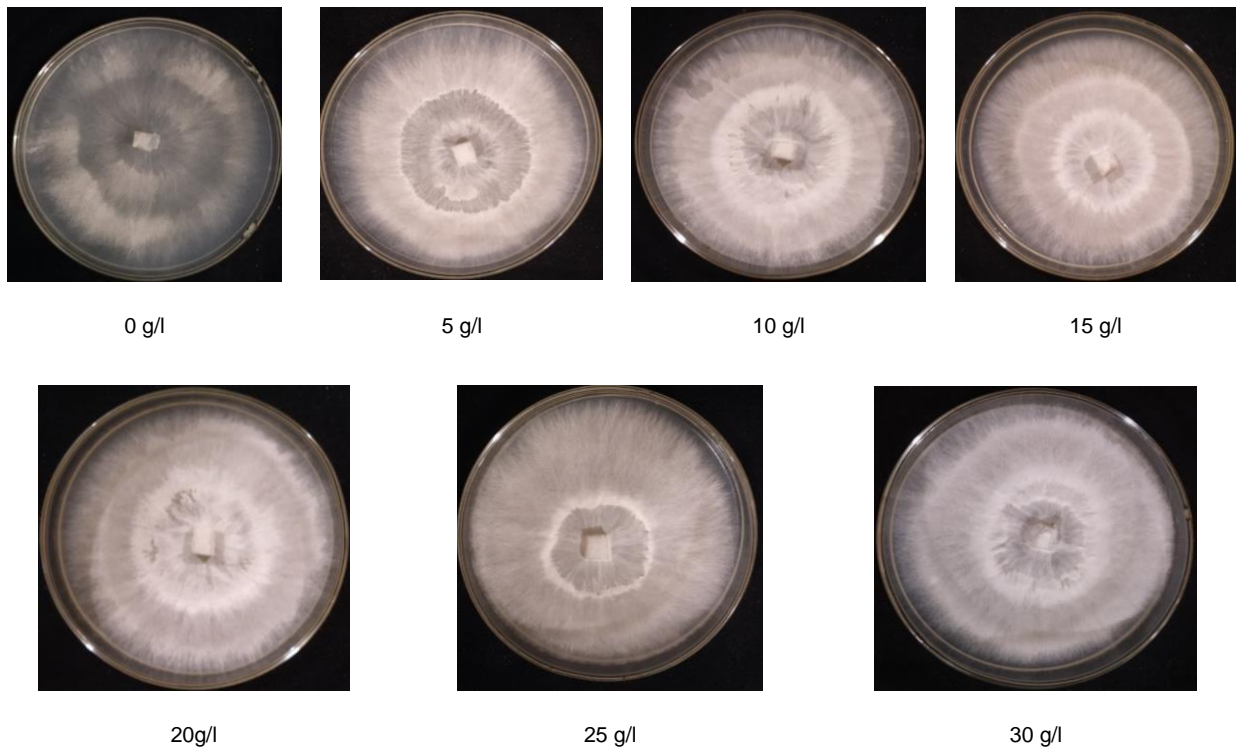
Bảng 3. Khả năng sinh trưởng của hệ sợi nấm Linh chi FM6 trên môi trường bổ sung hàm lượng fructose khác nhau

Hàm lượng Fructose (g/l)	Đường kính trung bình hệ sợi (mm)		Tốc độ mọc trung bình của hệ sợi (mm/ngày)	Độ dày hệ sợi
	Sau 3 ngày	Sau 9 ngày		
0	18,33	86,00	6,14	+
5	17,00	86,67	6,00	+++
10	17,11	86,00	6,12	+++
15	17,67	86,67	6,17	+++
20	16,67	87,00	6,09	++
25	10,72	86,00	4,78	+
30	10,72	86,83	4,67	+
LSD _{0,05}	0,72	0,15	0,28	
CV%	3,8	4,5	2,5	

Một số đặc điểm sinh trưởng hệ sợi, sự hình thành và phát triển quả thể nấm Linh chi (*Ganoderma orbiforme*) FM6 thu thập tại vườn quốc gia Pù Mát



Hình 3a. Hệ sợi nấm Linh chi FM6 trên môi trường bổ sung nguồn carbon khác nhau



Hình 3b. Hệ sợi chủng nấm FM6 trên môi trường bổ sung hàm lượng fructose khác nhau

Bảng 4. Khả năng sinh trưởng của hệ sợi nấm Linh chi FM6 trên môi trường bổ sung các nguồn nitơ khác nhau

Nguồn nitơ bổ sung (2 g/l)	Đường kính trung bình hệ sợi (mm)		Tốc độ trung bình của hệ sợi (mm/ngày)	Độ dày hệ sợi
	Sau 3 ngày	Sau 9 ngày		
Cao nấm men	17,83	84,50	6,04	+++
Casein	18,67	85,33	6,09	+++
NH ₄ NO ₃	19,00	85,50	6,11	+
NH ₄ Cl	19,00	86,17	6,16	+++
(NH ₄) ₂ SO ₄	17,33	85,35	6,10	++
Peptone	17,83	85,00	6,07	+++
LSD _{0,05}	0,72	1,62	0,57	
CV%	2,2	0,5	0,5	

Bảng 5. Khả năng sinh trưởng của hệ sợi nấm Linh chi FM6 trên môi trường bổ sung hàm lượng NH₄Cl khác nhau

Hàm lượng NH ₄ Cl (g/l)	Đường kính trung bình hệ sợi (mm)		Tốc độ trung bình của hệ sợi (mm/ngày) ^(*)	Độ dày hệ sợi
	Sau 3 ngày	Sau 9 ngày		
0	18,33	86,00	6,14	++
1	18,50	85,33	6,10	+++
2	18,50	85,67	6,12	+++
3	17,67	85,51	5,61	+++
4	16,33	85,03	5,33	++
5	17,33	84,50	5,28	++
LSD _{0,05}	0,52	1,35	0,26	
CV%	1,6	0,9	2,5	

Ghi chú: (*) Tốc độ trung bình sợi mọc tính trong toàn bộ giai đoạn sợi mọc kín môi trường

Kết quả cho thấy, hệ sợi chủng nấm FM6 sinh trưởng tốt trên cả 6 nguồn nitơ khảo sát. Căn cứ vào đặc điểm và tốc độ sinh trưởng trung bình của hệ sợi, NH₄Cl được chọn để thực hiện thí nghiệm tiếp theo. Sáu mức hàm lượng NH₄Cl được bổ sung vào môi trường nuôi cấy và kết quả được ghi nhận ở bảng 5 và hình 4b. Theo đó, hệ sợi chủng nấm FM6 đạt tốc độ trung bình 6,14 mm/ngày khi môi trường nuôi cấy không bổ sung NH₄Cl. Tuy nhiên, trên nền môi trường này, hệ sợi chủng nấm sinh trưởng không mượt, mật độ hệ sợi thưa mảnh. Khi bổ sung hàm lượng NH₄Cl cao (3; 4; 5g/l), hệ sợi chủng nấm FM6 sinh trưởng khỏe, mật độ hệ sợi dày, nhưng tốc độ sinh trưởng chậm hơn, lần lượt đạt 5,61 mm/ngày (3 g/l); 5,33 mm/ngày

(4 g/l) và 5,28 mm/ngày (5 g/l). Kết quả cho thấy, khi bổ sung một lượng NH₄Cl phù hợp (1 g/l; 2 g/l), hệ sợi chủng nấm sinh trưởng nhanh, đồng đều, tốc độ trung bình hệ sợi lớn (6,10 mm/ngày đối với hàm lượng 1 g/l và 6,12 mm/ngày đối với hàm lượng 2 g/l) đồng thời mật độ hệ sợi cũng dày.

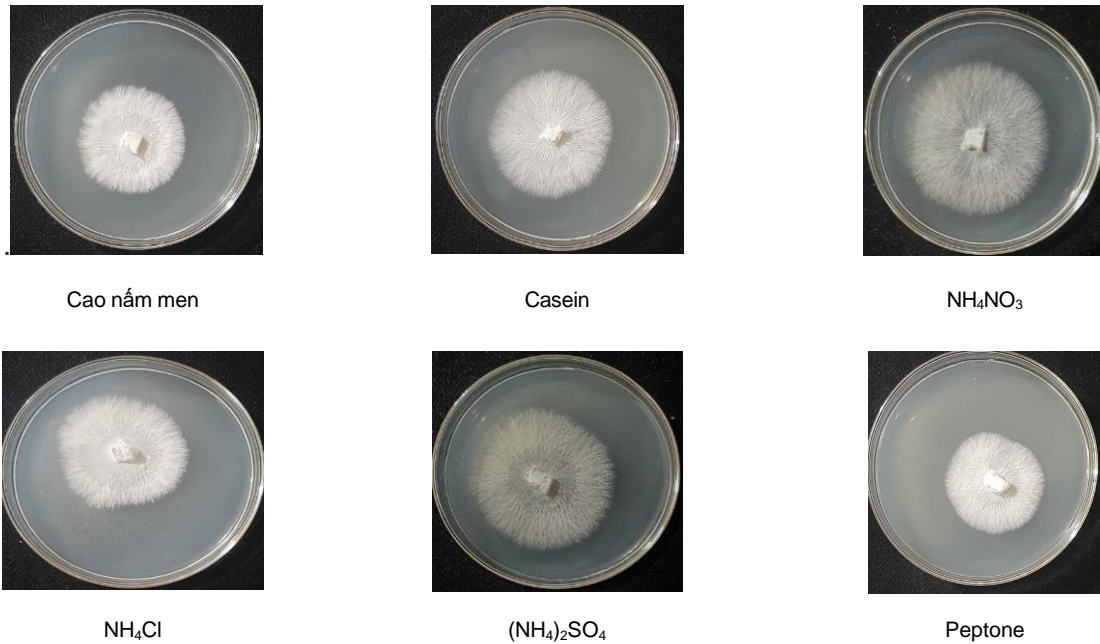
3.4. Ảnh hưởng của tỷ lệ cám mạch đến sự hình thành và phát triển quả thể nấm Linh chi FM6

Trong 5 tỷ lệ cám mạch bổ sung vào cơ chất nuôi trồng, hệ sợi chủng nấm FM6 sinh trưởng nhanh nhất trên nền cơ chất CT3 bổ sung 10% cám mạch, tốc độ trung bình hệ sợi ghi nhận đạt 3,71 mm/ngày, thời gian hệ sợi sinh trưởng kín

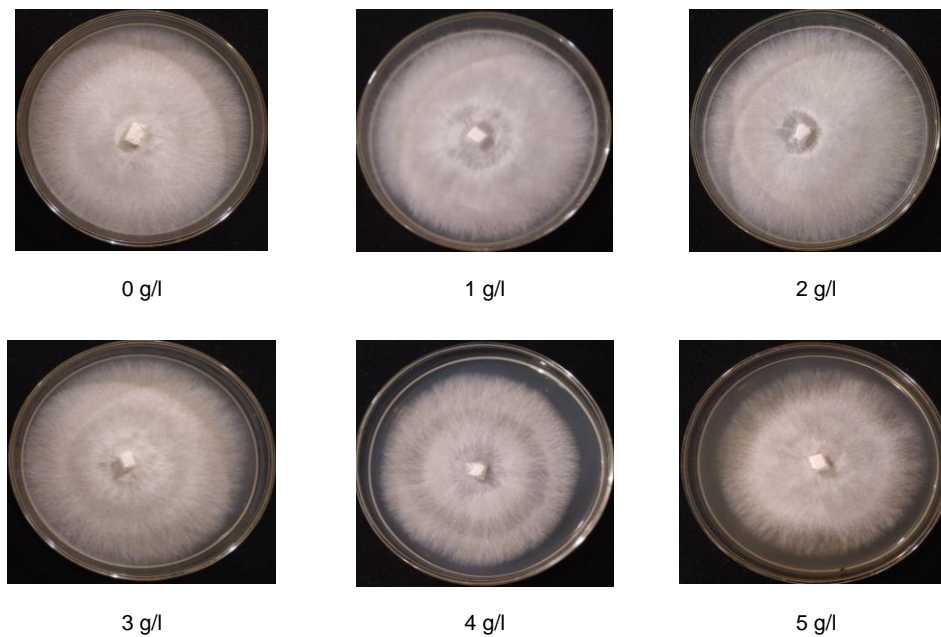
Một số đặc điểm sinh trưởng hệ sợi, sự hình thành và phát triển quả thể nấm Linh chi (*Ganoderma orbiforme*) FM6 thu thập tại vườn quốc gia Pù Mát

bịch cơ chất là 36,83 ngày. Trên nền cơ chất CT1 không bổ sung cám mạch hoặc CT2 bổ sung tỷ lệ cám mạch nhỏ (5%), hệ sợi chủng nấm sinh trưởng yếu, tốc độ sinh trưởng rất chậm, đạt 2,79 mm/ngày (CT1) và 2,87 mm/ngày (CT2), thời gian hệ sợi sinh trưởng kín bịch cơ chất kéo dài 46,5 ngày (CT1) và 45,67 ngày (CT2).

Cơ chất CT4 và CT5 cho thấy kết quả sinh trưởng hệ sợi khá tốt. Tốc độ sinh trưởng trung bình hệ sợi ghi nhận lần lượt đạt 3,43 mm/ngày (CT4) và 3,41 mm/ngày (CT5). Thời gian hệ sợi sinh trưởng kín bịch cơ chất trên nền CT4 và CT5 lần lượt là 38,67 ngày và 40,33 ngày (Bảng 6).



Hình 4a. Hệ sợi nấm Linh chi FM6 nuôi cấy trên môi trường bổ sung nguồn nitơ khác nhau



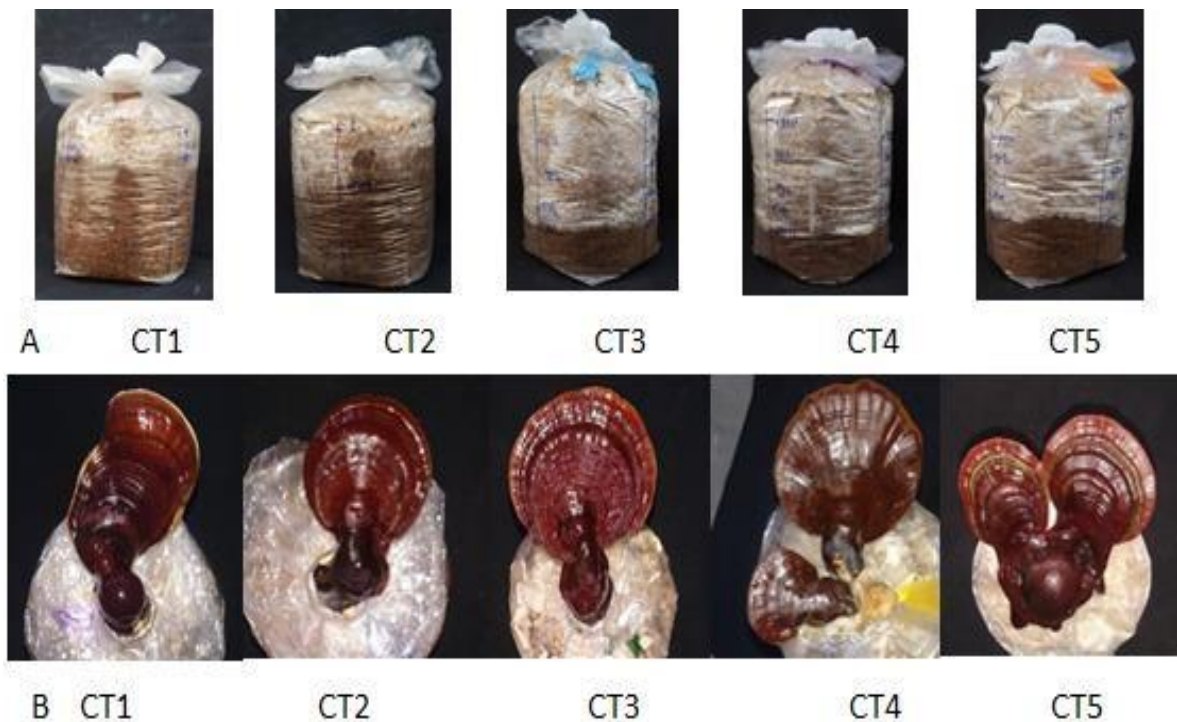
Hình 4b. Hệ sợi nấm Linh chi FM6 nuôi cấy trên môi trường bổ sung hàm lượng NH_4Cl khác nhau

Bảng 6. Khả năng sinh trưởng hệ sợi chủng nấm FM6 trên các cơ chất bổ sung tỷ lệ cám mạch khác nhau

Công thức	Tốc độ trung bình hệ sợi (mm/ngày)	Thời gian sinh trưởng kín cơ chất (ngày)	Đặc điểm hệ sợi
CT1	2,79	46,5	Hệ sợi màu trắng, giai đoạn đầu hệ sợi rất mảnh, tốc độ mọc rất chậm.
CT2	2,87	45,67	Hệ sợi màu trắng, mảnh, tốc độ mọc tương đối chậm.
CT3	3,71	36,83	Hệ sợi màu trắng, dày, phát triển nhanh, đồng đều, nhanh xuất hiện màng dai.
CT4	3,43	38,67	Hệ sợi màu trắng, dày, phát triển nhanh, đồng đều, xuất hiện màng dai sớm.
CT5	3,41	40,33	Hệ sợi màu trắng, dày, phát triển nhanh và đồng đều, sớm xuất hiện màng dai.
LSD _{0,05}	0,48	3,32	
CV%	7,8	4,2	

Bảng 7. Kích thước quả thể và hiệu suất sinh học của chủng nấm FM6 khi nuôi trồng trên các cơ chất bổ sung tỷ lệ cám mạch khác nhau

Công thức	Kích thước ngang quả thể (mm)	Kích thước dọc quả thể (mm)	Khối lượng nấm/bịch (g)	Hiệu suất sinh học (%)
CT1	49,67	38,75	13,73	3,50
CT2	85,65	44,30	25,69	6,83
CT3	63,00	59,50	31,46	8,84
CT4	77,78	74,11	29,50	8,78
CT5	64,11	51,83	24,64	6,48
LSD _{0,05}	3,17	2,26	1,88	0,50
CV%	2,5	2,2	4,0	4,0



Hình 5. Hệ sợi và quả thể của nấm Linh chi FM6 trên các cơ chất nuôi trồng khác nhau

Một số đặc điểm sinh trưởng hệ sợi, sự hình thành và phát triển quả thể nấm Linh chi (*Ganoderma orbiforme*) FM6 thu thập tại vườn quốc gia Pù Mát

Mật độ hệ sợi có sự khác biệt rõ ràng giữa các công thức cơ chất. Hệ sợi chủng nấm FM6 sinh trưởng yếu trên cơ chất không bổ sung cám mạch (CT1) và bổ sung 5% cám mạch (CT2). Khi bổ sung tỷ lệ cám mạch cao hơn (CT3: 10% , CT4: 15% và CT5: 20%), hệ sợi đều phát triển mạnh, mật độ hệ sợi dày và có sự khác nhau về tốc độ sinh trưởng (Hình 5). Chủng nấm FM6 cho hiệu suất nấm thu được cao nhất khi được nuôi trồng trên CT3 (bổ sung 10% cám mạch) và CT4 (15% cám mạch), lần lượt đạt 8,84% và 8,78% và tương ứng với khối lượng nấm trung bình/bịch lớn nhất đạt 31,46g (CT3), 29,50g nấm/bịch (CT4). Hiệu suất nấm thu được tương đối cao khi nuôi trồng trên CT2 (6,83%) và CT5 (6,48%) (Bảng 7).

Như vậy, rõ ràng tỷ lệ cám mạch bổ sung vào cơ chất nuôi trồng đã ảnh hưởng trực tiếp đến quá trình sinh trưởng hệ sợi và hiệu suất nấm thu được. Tỷ lệ cám mạch bổ sung khác nhau khiến cho tỷ lệ C/N thay đổi. Năm 2000, Stamets cho rằng tỷ lệ cân bằng C/N trong cơ chất nuôi trồng là yếu tố vô cùng quan trọng. Tỷ lệ C/N cân bằng trong cơ chất sẽ giúp tăng cường sinh trưởng hệ sợi và sự phát triển quả thể, tuy nhiên nếu tỷ lệ C/N không cân bằng sẽ cản trở sự phát triển của hệ sợi (Stamets & Chilton, 1983; Okhuoya & cs., 2000). Mỗi loài nấm khác nhau sinh trưởng tốt trên nền cơ chất có tỷ lệ C/N khác nhau. Chẳng hạn như tỷ lệ C/N thích hợp cho loài *Ganoderma applanatum* là 2:10 (Jo & cs., 2009), *Ganoderma lucidum* là 2:2 (Suberu & cs., 2013) hay tỷ lệ C/N trong môi trường là 16,7:1 cho sinh khối sợi *Ganoderma lucidum* cao nhất (Torres & cs., 2011).

4. KẾT LUẬN

Chủng nấm Linh chi FM6 được xác định tương đồng với loài *Ganoderma orbiforme* với tỷ lệ lớn hơn 99,35%. Khi nuôi cấy hệ sợi nấm trên môi trường bổ sung các nguồn cacbon, nitơ khác nhau, fructose và NH₄Cl được đánh giá là nguồn cacbon và nguồn nitơ phù hợp nhất đối với sinh trưởng hệ sợi chủng nấm FM6. Hàm lượng fructose và NH₄Cl tối ưu đối với sinh trưởng hệ

sợi chủng nấm FM6 lần lượt là 15 g/l và 2 g/l. Nuôi trồng nấm Linh chi FM6 trên giá thể mùn cưa bổ sung cám mạch với tỷ lệ khác nhau có ảnh hưởng trực tiếp đến sinh trưởng hệ sợi và hiệu suất nấm thu được, hiệu suất sinh học nấm thu được lớn nhất đạt 8,84% khi cơ chất nuôi trồng bổ sung 10% cám mạch. Đây là kết quả nghiên cứu bước đầu, loài nấm *Ganoderma orbiforme* cần có những nghiên cứu tiếp theo để khai thác tiềm năng và giá trị của nó

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Aarisawa M., Fujita A., Saga M., Fukumura H., Hayashi T., Shimizu M., Morita N. (1986). Three new lanostanoids from *Ganoderma lucidum*. J. Nat. Prod. 49: 621-625. doi: 10.1021/np50046a010.
- Ahmad R., Riaz M., Khan A., Aljamea A., Algheryafi M., Sewaket D. & Alqathama A. (2021). *Ganoderma lucidum* (Reishi) an edible mushroom; a comprehensive and critical review of its nutritional, cosmeceutical, mycochemical, pharmacological, clinical, and toxicological properties. Phyther. Res. 35: 6030-6062. doi.org/10.1002/ptr.7215.
- Chang S. & Miles G.P. (2004). Mushroom: Cultivation, nutritional value, medicinal effects and environmental impact. Boca Raton, FL: CRC press. p. 436
- Đinh Xuân Linh, Thân Đức Nhã & Nguyễn Thị Sơn. (2007). Kỹ thuật trồng, chế biến nấm ăn, nấm dược liệu. Nhà xuất bản Nông nghiệp.
- Elkhateeb W.A., Zaghlool G.M., El-Garawani I.M., Ahmed E.F., Rateb M.E. & Abdel Moneim A.E. (2018). *Ganoderma applanatum* secondary metabolites induced apoptosis through different pathways: *In vivo* and *in vitro* anticancer studies. Biomed. Pharmacother. 101: 264-277. doi.org/10.1016/j.biopha.2018.02.058.
- Felsenstein J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. J. Mol. Evol. 17(6): 368-376.
- George G., Songulashvili, Vladimir Elisashvili, Solomon P. Wasser, Yitzhak Hadar & Eviatar Nevo (2008). Effect of the carbon source and inoculum preparation method on laccase and manganese peroxidase production in submerged cultivation by the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* (W. Curt: Fr.) P. Karst. (Aphyllophoromycetidae). International Journal of Medicinal mushrooms. 10(1): 79-86.
- Giang Van Nguyen, Bich Thuy Nguyen Thi, Lan Huong Bui, Trinh Duy Nguyen, Ha Thu Tran,

- Trung Thanh Nguyen, Pylnev V.V. & Popchenko M.I. (2023). Effects of nutrient sources and culture conditions on the mycelial growth of *Ganoderma Lucidum* strain Ga-TB. Research article. 2817(1). doi.org/10.1063/5.0149073
- Isaka Masahiko, Panida Chinthanom, Sermsiri Mayteeworakoon, Kobkul Laoteng, Rapheephat Suvannakad & Rattaket Choeyklin (2017). Lanostane triterpenoids from cultivated fruiting bodies of the basidiomycete *Ganoderma orbiforme*. *Phytochemistry Letters*. 21: 251-255. doi.org/10.1016/j.phytol.2017.07.010.
- Jayasinghe C., Intiaj A., Hur H., Lee G.W., Lee T.S. & Lee U.Y. (2008). Favorable Culture Conditions for Mycelial Growth of Korean Wild Strains in *Ganoderma lucidum*. *Korean J Mycol*. 36: 28-33.
- Jo W.S., Cho Y.Y., Cho D.H., Park S.D., Yoo Y.B. & Seok S.J. (2009). Culture conditions for the mycelial growth of *Ganoderma applanatum*. *Mycobiology*. 37(2): 94-102
- Kirk P.M., Cannon P.F., Minter D.W. & Stalpers J.A. (2008). *Dictionary of the Fungi* (10th ed.). Wallingford: CABI. p. 272. ISBN 978-0-85199-826-8.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35(6): 1547-1549
- Li L.F., Liu H.B., Zhang Q.W., Li Z.P., Wong T.L., Fung H.Y., Zhang J.X., Bai S.P., Lu A.P., Han Q. Bin (2018). Comprehensive comparison of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* and *G. sinense*: Chemical, antitumor, immunomodulating and gut-microbiota modulatory properties. *Sci. Rep.* 8: 1-12. doi.org/10.1038/s41598-018-22885-7.
- Luangharn T., Karunarathna S.C., Dutta A.K., Paloi S., Promputtha I., Hyde K.D., Xu J. & Mortimer P.E. (2021). *Ganoderma* (*Ganodermataceae*, basidiomycota) species from the greater mekong subregion. *J. Fungi* 7. doi.org/10.3390/jof7100819.
- Luyen Thi Nguyen, Ve Van Le, Bich Thuy Thi Nguyen, Huyen Trang Nguyen Thi, Anh Dong Tran & Nghien Xuan Ngo (2023). Optimization of mycelial growth and cultivation of wild *Ganoderma sinensis*. *Journal of Biotechnology, computation Biology and Bionanotechnology*. 104(1): 65-74. doi.org/10.5114/bta.2023.125087.
- Nguyen B.T.T., Van Le V., Nguyen H.T.T., Nguyen L.T., Tran A.D. & Ngô N.X. (2021a). Successful rescue of wild *Trametes versicolor* strains using sawdust and rice husk-based substrate. *Pakistan J. Biol. Sci.* 24: 374-382. doi.org/10.3923/pjbs.2021.374.382.
- Nguyễn Thị Huyền Trang, Lê Văn Vê, Phan Thị Huyền Trang, Nguyễn Thị Luyện, Ngô Xuân Nghiễn, Nguyễn Thị Bích Thùy (2022). Sinh trưởng của hệ sợi và phát triển quả thể nấm sò vàng (*Pleurotus cintrinopileatus*) trên một số môi trường dinh dưỡng khác nhau. *Tạp chí khoa học Nông nghiệp Việt Nam*. 20(5): 642-651.
- Okhuoya J.A, Isikhuemhen O.S. & Tomo H.A. (2000). Effect of soil factors on growth and yield during sporophore induction from sclerotia of *Pleurotus tuberregium* (Fr.) Sing. *The Int. J. Mushroom Sci.* 3: 3 -7.
- Sabula Baby, Anil John Johnson & Balaji Govindan. (2015). Secondary metabolites from *Ganoderma*. *Phytochemistry* 114: 66-101.
- Schwessinger B. & McDonald M. (2017). High quality DNA from Fungi for long read sequencing eg PacBio, Nanopore MinION V. 2. *Plant Pathology*. 22: 7.
- Stamets P. (2000). *Growing gourme and medicinal mushrooms*. Ten Speed Press, California. 574p.
- Stamets P. & Chilton J.S. (1983). *The mushroom cultivator. A practical guide to growing mushrooms at home*. Agarikon Press Olympia Washinton. p. 415.
- Stanley G., Harvey K., Slivova V., Jiang J. & Sliva D. (2005). *Ganoderma lucidum* suppresses angiogenesis through the inhibition of secretion of VEGF and TGF-B1 from prostate cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330: 46-52. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.02.116.
- Su Hai-Guo, Xing- Rong Peng, Qiang-Qiang Shi, Yan-Jin Huang, LinZhou & Ming-Hua Qiu (2020). Lanostane triterpenoids with anti inflammatory activities from *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry*. 173: 112256.
- Suberu H.A., Bello A.A., Daudu Oladipupo Abdulazeez Yusuf & Adebola Lateef (2013). Mycelia biomass yield of *Ganoderma lucidum* mushroom by submerged culture. *Nigerian Journal of Technological Research*. 8(2). doi.org/10.4314/njtr.v8i2.96700.
- Torres Lopze, Ana Maria, Quitero Diaz, Juan Carlos & Atehortua Garces Lucia (2011). Effect of nutrients in the biomass production of the medincinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Rev. Colomb. Biotechnol.* 13(1): 103-109.
- Tran Dinh Thang, Ping-Chung Kuo, Tsong-Long Hwang, Mei-Lin Yang, Nguyen Thi Bich Ngoc, Tran Thi Ngoc Han, Chi-Wen Lin & Tian-Shung Wu. (2013). Triterpenoids and steroids from *Ganoderma mastoporum* and their inhibitory effects on superoxide anion generation and elastase release. *Molecules*. 18(11): 14285-14292. doi.org/10.3390%2Fmolecules181114285.

Một số đặc điểm sinh trưởng hệ sợi, sự hình thành và phát triển quả thể nấm Linh chi (*Ganoderma orbiforme*) FM6 thu thập tại vườn quốc gia Pù Mát

- Trịnh Tam Kiệt (2012). Nấm lớn ở Việt Nam (Tập 2). Nhà xuất bản Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, Hà Nội.
- Victoria Espinosa-García, Guillermo Mendoza, Alla V Shnyreva, José M Padrón & Ángel Trigos. (2021). Biological activities of different strains of the genus *Ganoderma* spp. (Agaricomycetes) from Mexico. *Int J Med Mushroom*. 23(2): 67-77. doi.org/10.1615/intjmedmushrooms.2021037451.
- Wei Li, Panida Chinthanom, Pranee Rachtawee, Kamolphon, Tao Feng, Ji-Kai Liu & Masahiko Isaka (2018). Isolation of 3,4-seco-27-norlanthane triterpenoids from cultivated fruiting bodies of *Ganoderma orbiforme*. *Phytochemistry Letters*. 28: 104-109. doi.org/10.1016/j.phytol.2018.09.017.
- White T.J., Bruns. T. & Lee. S.J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. California. USA Academic press, San Diego. 18(1): 315-322.
- Won S.J., Lin M.T. & Wu W.L. (1992). *Ganoderma tsugae* mycelium enhances splenic natural killer cell activity and serum interferon production in mice. *Japan J. Pharmacol*. 59: 171-176. doi: 10.1254/jjp.59.171.
- Woo-Sik Jo, Yun-Ju Cho, Doo-Huyn Cho, So-Deuk Park, Young-Bok Yoo & Soon-Ja Seok (2009). Culture conditions for the mycelial growth of *Ganoderma applanatum*. *Mycobiology*. 37(2): 94-102.
- Zou X. (2005). Optimization of nutritional factors for exopolysaccharide production by submerged cultivation of the medicinal mushroom *Oudemansiella radicata*. *World J. Microbiol. Biotechnol*. 21: 1267-1271.