

ĐỊNH DANH CÁC CHỦNG NẤM BÀO NGƯ (*Pleurotus* spp.) THU NHẬN TẠI KHU VỰC PHÍA NAM DỰA TRÊN PHÂN TÍCH ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI VÀ TRÌNH TỰ ITS

Phạm Văn Lộc^{1,2}, Ngô Thùy Trâm^{1,3}, Lê Thanh Nhân³,
Phạm Nguyễn Đức Hoàng³, Nguyễn Hoàng Dũng^{1,4}, Hồ Bảo Thùy Quyên^{5*}

¹Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Trường Đại học Công thương TP. Hồ Chí Minh

³Viện Công nghệ sinh học ứng dụng

⁴Viện Sinh học Nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

⁵Trường Đại học Mở TP. Hồ Chí Minh

*Tác giả liên hệ: quyen.hbt@ou.edu.vn

Ngày nhận bài: 15.08.2023

Ngày chấp nhận đăng: 25.12.2023

TÓM TẮT

Nấm bào ngư (*Pleurotus* spp.) là một trong những loại nấm ăn phổ biến trên thế giới. Tại Việt Nam, nấm bào ngư được trồng rộng rãi, đặc biệt tại phía nam. Định danh giống nấm có vai trò quan trọng trong bảo tồn và phát triển giống nấm. Phương pháp định danh cơ bản là dựa vào các đặc điểm hình thái. Bên cạnh đó việc định danh dựa trên dữ liệu các gen bảo tồn cũng đã được áp dụng rộng rãi; trong đó ITS (internal transcribed spacer) là vùng trình tự đã được sử dụng phổ biến trong định danh nấm. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm định danh 15 chủng nấm bào ngư thu thập tại phía nam. Phương pháp định danh được sử dụng là phương pháp phân tích đặc điểm hình thái và giải trình tự vùng ITS. Kết quả phân tích cho thấy 10 chủng nấm thuộc loài *P. pulmonarius* và 5 chủng nấm thuộc loài *P. ostreatus*; kết quả định danh bằng ITS hỗ trợ tốt cho định danh bằng đặc điểm hình thái. Trên cây phát sinh loài 10 chủng nấm bào ngư xám thuộc về phân nhánh loài *P. pulmonarius* với chỉ số bootstrap bằng 88%; 4 chủng bào ngư trắng và chủng bào ngư tiểu yến thuộc về phân nhánh loài *Pleurotus* cf. *floridanus* (thuộc loài *P. ostreatus*) với chỉ số bootstrap bằng 80%. Kết quả của nghiên cứu này bổ sung thêm dữ liệu cơ bản cho các chương trình định danh, bảo tồn nguồn gen giống nấm bào ngư.

Từ khóa: Định danh, hình thái, ITS, nấm bào ngư.

Identification of Oyster Mushroom (*Pleurotus* spp.) Strains in the South Vietnam based on Morphological Characteristics and ITS Sequencing

ABSTRACT

Oyster mushrooms (*Pleurotus* spp.) are one of the most commonly cultivated mushrooms in the world. In Vietnam, *Pleurotus* mushrooms have been popularly grown, especially in the southern region. The classification of oyster mushrooms is important in conservation and development of genetic resources. One of the primary methods for accurate classification of oyster mushrooms is based on their macroscopic and microscopic characteristics. Besides, classification based on the analysis of consensus sequences was widely applied, with ITS being the most used sequence region in fungal genetics. The objective of this study was to identify 15 oyster mushroom strains collected from the southern region through a combination of morphological characteristic analysis and ITS sequencing. The results showed that 10 strains were identified as *P. pulmonarius*, while 5 other strains were identified as *P. ostreatus*. The identification results based on ITS sequences were compatible with the morphological identifications. Following the phylogenetic tree based on ITS sequences, 10 phoenix cultivars belonged to *P. pulmonarius* clade, supported by a bootstrap value of 88%. The oyster cultivars and blue oyster cultivar belonged to *Pleurotus* cf. *floridanus* (*P. ostreatus* species), supported by a bootstrap value of 80%. The results of this study increased the basic data for identification and conservation purposes.

Keywords: Identification, ITS sequence, morphology, oyster mushroom.

Định danh các chủng nấm bào ngư (*Pleurotus* spp.) thu nhận tại khu vực phía nam dựa trên phân tích đặc điểm hình thái và trình tự ITS

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nấm bào ngư (*Pleurotus* spp.) là một trong những giống nấm nuôi trồng quan trọng nhất của thế giới với sản lượng ở vị trí thứ hai sau nấm mỡ (Royse & cs., 2017). Nấm bào ngư không chỉ có giá trị dinh dưỡng cao mà còn chứa nhiều thành phần có hoạt tính sinh học (Cohen & cs., 2012). Tại Việt Nam, bào ngư là loại nấm được trồng phổ biến đặc biệt tại Đông Nam bộ. Trong các giống đang nuôi trồng, bào ngư xám và bào ngư trắng là giống chủ lực do phù hợp với điều kiện nuôi trồng và nhu cầu tiêu thụ của thị trường. Tuy nhiên vấn đề giống nấm chưa được quan tâm đúng mức, nên cần chú trọng để đẩy mạnh sản xuất. Trong đó việc định danh giống có vai trò quan trọng. Phương pháp cơ bản dựa vào các đặc điểm hình thái (đại thể và vi thể). Bên cạnh đó một số phương pháp khác cũng được sử dụng riêng lẻ hay phối hợp để xác định loài. Tại Việt Nam đặc điểm hình thái một số loài nấm bào ngư đã được ghi nhận. Các loài *P. ostreatus*, *P. pulmonarius*... đã được mô tả trong chuyên khảo (Trịnh Tam Kiệt, 2011); loài bản địa *P. cystidiosus* var. *blaoensis* được phát hiện ở Lâm Đồng; các loài *P. sajor-caju*, *P. florida*, *P. pulmonarius* được ghi nhận ở Đồng Nai... (Lê Xuân Thám, 2010). Tuy vậy hình thái nấm thay đổi do ảnh hưởng của môi trường và nhiều loài có quan hệ di truyền gần khó xác định. Đồng thời phương pháp này đòi hỏi nhà phân loại phải có chuyên môn và cần nhiều thời gian để xử lý mẫu và so sánh với các khóa phân loại. Do đó phương pháp định danh dựa trên phân tích dữ liệu các gen bảo tồn đã được phát triển. Trong đó ITS là vùng trình tự đã được sử dụng rộng rãi trong định danh nấm. ITS được phát triển bởi White & cs. (1990). Primer ITS1 và ITS4 cùng một số primer khác để khuếch đại toàn bộ đoạn trình tự đến nay vẫn được sử dụng phổ biến. Hiện nay mặc dù có nhiều trình tự được sử dụng, ITS với tính chất mã vạch năng, dễ khuếch đại bằng PCR và khả năng phân tách loài, nó vẫn được đánh giá là marker định danh hiệu quả cho giới nấm và ITS cũng là một trong những dữ liệu phong phú nhất của Gen Bank (Raja & cs., 2017; Schoch & cs., 2012; Xu, 2016).

Tại Việt Nam, trình tự ITS cũng đã được sử dụng trong định danh nấm bào ngư (Bùi Ngọc Trang & cs., 2021; Ho & cs., 2021).

Trong nghiên cứu này, 15 chủng nấm bào ngư thu thập tại khu vực phía nam đã được định danh dựa vào phân tích đặc điểm hình thái và phân tích vùng trình tự ITS. Kết quả thu được là tiền đề cho các công tác phân loại, bảo tồn các chủng nấm.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Chủng nấm

Nghiên cứu sử dụng 15 chủng nấm do Viện Công nghệ sinh học Ứng dụng cung cấp. Các chủng này có nguồn gốc tự nhiên hoặc thương mại được thu nhận tại một số địa phương khu vực phía nam. Chi tiết các chủng giống được trình bày trong bảng 1.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Định danh bằng đặc điểm hình thái

Mẫu quả thể được mô tả theo phương pháp giải phẫu và phân tích của Largent (1977), Largent & cs. (1977). Kết quả phân tích được so sánh với các mô tả của Miller (1969), Corner (1981), Petersen & Krisai-Greilhuber (1996), Segedin & cs. (1995), Petersen & Krisai-Greilhube (1999), Guzmán (2000), Lechner & cs. (2005), Zmitrovich & Wasser (2016). Kích thước cấu trúc đại thể được đo bằng thước thường. Kích thước cấu trúc vi thể được quan sát dưới kính hiển vi, chụp ảnh và đo bằng phần mềm Piximètre 5.10 (ACH Logiciels, Pháp) kết hợp với thước micrometer của kính hiển vi. Chỉ số Q là tỉ lệ chiều dài trung bình (L) trên chiều rộng trung bình (W) của 50 bào tử.

2.2.2. Định danh bằng phân tích vùng trình tự ITS

DNA bộ gen của các mẫu nấm được tách chiết theo phương pháp CTAB của Winnepenninckx (1993). DNA tổng sau tách chiết được khuếch đại bằng phản ứng PCR với các cặp môi ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGC GG) và ITS4 (TCCTCCGCTTAT TGATATGC) hoặc cặp

mỗi ITS5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) và ITS4 (chúng ABI-F000252; ABI-F000254; ABI-F000257) (James & cs., 2006). Chu trình nhiệt 35 chu kỳ: biến tính ở 95°C trong 5 phút; 95°C trong 30 giây, bắt cặp mỗi ở 56°C trong 30 giây, kéo dài ở 72°C trong 1 phút 30 giây; kết thúc phản ứng ở 72°C trong 10 phút. Sản phẩm sau PCR được tinh sạch bằng ExoSAP-IT (Thermo Fisher, Hoa Kỳ), giải trình tự theo phương pháp Sanger (công ty 1st Base, Malaysia). Kết quả giải trình tự được hiệu chỉnh bằng phần mềm ATGC ver. 7 (Genetyx Corp., Nhật Bản) và so sánh với các dữ liệu trên GenBank thông qua chương trình BLAST của NCBI.

2.2.3. Xây dựng cây phát sinh loài

Dữ liệu được sắp giống cột bằng phần mềm AliView ver 1.28 (Larsson, 2014). Phần mềm MEGA X được sử dụng để dựng cây phả hệ Maximum Likelihood (ML) theo mô hình Kimura 2 yếu tố (theo kết quả tối ưu của phần mềm) (Kimura, 1980; Kumar & cs., 2018). 27 trình tự được chọn tham chiếu; trong đó 25 trình tự các loài bào ngư có hình thái trắng xám

phổ biến, hai loài khác chi *Pleurotus* nhưng cùng họ (*Pleurotaceae*) là *Hohenbuehelia auriscalpium* và *Hohenbuehelia mastrucata* được chọn làm nhóm ngoài (Bảng 2).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Định danh bằng các đặc điểm hình thái

3.1.1. Các chủng bào ngư xám

- Hình thái đại thể:

Quả thể có kích thước trung bình tới lớn, dạng thịt, thường mọc thành dạng ngói lợp, có dạng sò, dạng quạt. Mũ nấm có bề mặt khô, mượt; có màu xám nhạt hoặc xám nâu; phần rìa mũ ban đầu cuộn vào trong khi còn non, gợn sóng, đôi khi rìa bị rách khi về già. Cuống dính lệch tâm hoặc dính bên, thon, đều hoặc có khi nhỏ dần từ đỉnh đến gốc cuống; ở các mẫu già có nhiều lông mao. Phiến nấm nổi dài đến cuống, dày đặc, khoảng cách giữa các phiến hẹp, thường có dạng bảng, màu nhạt, phần rìa phiến mịn; có cùng màu với cuống. Phần thịt mềm, có màu trắng khi tươi và ngả màu kem nhợt khi khô; màu sắc không thay đổi khi bị cắt.

Bảng 1. Danh sách các chủng nấm bào ngư

Mã chủng	Địa phương thu mẫu	Loại chủng	Tên thông thường
ABI-F000201	Củ Chi, TP. HCM	Thương mại	Bào ngư tiểu yến
ABI-F000219	Bình Thủy, Cần Thơ	Thương mại	Bào ngư trắng
ABI-F000222	Thủ Đức, TP. HCM	Thương mại	Bào ngư trắng
ABI-F000223	Củ Chi, TP. HCM	Thương mại	Bào ngư trắng
ABI-F000224	Trảng Bom, Đồng Nai	Thương mại	Bào ngư trắng
ABI-F000241	TP Vĩnh Long, Vĩnh Long	Thương mại	Bào ngư xám
ABI-F000248	Thủ Đức, TP. HCM	Thương mại	Bào ngư xám
ABI-F000252	Long Khánh, Đồng Nai	Thương mại	Bào ngư xám
ABI-F000253	Trảng Bom, Đồng Nai	Thương mại	Bào ngư xám
ABI-F000254	Dĩ An, Bình Dương	Thương mại	Bào ngư xám
ABI-F000255	Xuyên Mộc, Bà Rịa Vũng Tàu	Thương mại	Bào ngư xám
ABI-F000256	Dương Minh Châu, Tây Ninh	Thương mại	Bào ngư xám
ABI-F000257	Dương Minh Châu, Tây Ninh	Thương mại	Bào ngư xám
ABI-F000259	Hàm Tân, Bình Thuận	Thương mại	Bào ngư xám
ABI-F000261	Di Linh, Lâm Đồng	Tự nhiên	Bào ngư xám

Định danh các chủng nấm bào ngư (*Pleurotus* spp.) thu nhận tại khu vực phía nam dựa trên phân tích đặc điểm hình thái và trình tự ITS

Bảng 2. Thông tin các trình tự tham chiếu để xây dựng cây phát sinh loài

Loài	Voucher/specimen/strain	Nguồn gốc	Mã định danh	Tham khảo
<i>P. pulmonarius</i>	HMAS76672	China	AY696299	Liu & cs. (2015)
<i>P. pulmonarius</i>	CCMSSC00498	France	KU612946	Zhao & cs. (2016)
<i>P. pulmonarius</i>	ECS-0158	Mexico	GU722283	Liu & cs. (2015)
<i>P. pulmonarius</i>	LAU09	Nigeria	JF736658	Adebayo & cs. (2012)
<i>P. pulmonarius</i>	HKAS73350	China	KP867917	Li & cs. (2017)
<i>P. pulmonarius</i>	CBS100130	Australia	EU424311	Zhao & cs. (2016)
<i>P. pulmonarius</i>	SP445807	Brazil	KF280340	Menolli & cs. (2014)
<i>P. pulmonarius</i>	NZFRI3528	New Zealand	U60648	Menolli & cs. (2014)
<i>P. ostreatus</i>	TENN53662/AFTOL-ID564 (Epitype)	Austria	AY854077	Liu & cs. (2015)
<i>P. ostreatus</i>	HKAS84903	Germany	KP867913	Liu & cs. (2016)
<i>P. ostreatus</i>	CBS375.51	Italy	EU424310	Zervakis & cs. (2018)
<i>P. ostreatus</i>	CCMSSC06141	China	KP867915	Liu & cs. (2015)
<i>P. cf. floridanus</i>	CCMSSC04604	China	KX836194	Li & cs. (2017)
<i>P. cf. floridanus</i>	CCMSSC00331	China	KX836192	Li & cs. (2017)
<i>P. floridanus</i>	ZP742	Halminton/Canada	KX836193	Li & cs. (2017)
<i>P. floridanus</i>	ZP718	Halminton/Canada	KX836195	Li & cs. (2017)
<i>P. floridanus</i>	M2125	Florida/USA	MK757101	Pánek & cs. (2019)
<i>P. cornucopiae</i>	PHZAU19	China	DQ342325	Menolli & cs. (2014)
<i>P. cornucopiae</i>	8763	Austria	AY450341	Liu & cs. (2016)
<i>P. citrinopileatus</i>	TFM-M-E793	Japan	AB115043	Liu & cs. (2016)
<i>P. citrinopileatus</i>	HMAS63344	Jilin/China	AY696301	Liu & cs. (2016)
<i>P. placentodes</i>	HKAS57145 (Epitype)	China	KR827693	Liu & cs. (2016)
<i>P. placentodes</i>	HKAS9409	China	KX061787	Liu & cs. (2016)
<i>P. abieticola</i>	HKAS45720	China	KP771696	Zervakis & cs. (2018)
<i>P. abieticola</i>	TENN58284	Russia	AF345656	Petersen & Hughes (1997)
<i>Hohenbuehelia auriscalpium</i>	T-082	UK	EF409725	Liu & cs. (2016)
<i>Hohenbuehelia mastrucata</i>	T-025	Canada	EF409737	Liu & cs. (2016)

- Hình thái hiển vi:

Bào tử có bề mặt mịn, hình trụ, thành mỏng, màu kem nhạt. Đảm hình chùy, có bốn bào tử, hoặc đôi khi có hai bào tử. Có nhiều dạng tương tự đảm, hình trụ. Không ghi nhận thấy liệt bào. Vùng cận bào tầng mỏng, có vách. Thể nên rời rạc, cấu thành từ các sợi mỏng hoặc dày, trong suốt, có vách ngăn và mấu. Thịt nấm có kết cấu dạng monomitoc hoặc dimitoc, các sợi nguyên thủy có thành mỏng, mịn, có vách ngăn, phân nhánh; sợi cứng thành dày, không phân nhánh.

Thông tin chi tiết cấu trúc đại thể và vi thể của các chủng nấm bào ngư xám được trình bày trong bảng 3 và hình thái chủng bào ngư xám đại diện (ABI-F000253) được trình bày trong hình 1.

3.1.2. Các chủng bào ngư trắng

- Hình thái đại thể:

Quả thể có kích thước trung bình tới lớn, dạng thịt, có phiến nổi dài tới cuống, thường mọc thành kiểu xếp chồng thành tầng dạng ngôi lợp, dạng quạt tới dạng thìa, có dạng phễu nông.

Mũ nấm có bề mặt mũ khô, mượt; có màu nâu nhạt hoặc xám nâu ở tâm và nhạt dần về phía rìa mũ. Phần rìa mũ ban đầu cuộn vào trong, sau đó trải dẹt ra hoặc hướng lên trên, tạo thành hình gợn sóng khi về già. Phần cuống mọc lệch tâm hoặc sát phía rìa của phiến, mọc đều hoặc nhỏ dần từ đỉnh đến gốc cuống; có ghi nhận ít nhiều lông mao ở các mẫu già. Phiến nấm mọc dài tới cuống, dày đặc, khoảng cách giữa các phiến hẹp, thường tạo thành dạng lưới ở đỉnh cuống, rìa của phiến mịn; phiến có cùng màu với cuống. Phần thịt mềm; thịt có màu trắng khi tươi và màu kem nhạt khi khô; màu sắc không đổi khi bị cắt.

- Hình thái hiển vi:

Bào tử có bề mặt mịn, hình trụ, thành mỏng, màu kem nhạt. Đám hình chùy, có bốn bào tử. Có nhiều dạng tương tự đám, hình chùy. Không ghi nhận thấy liệt bào. Vùng cận bào tầng mỏng, có vách. Thể nền rời rạc, cấu thành từ các sợi mỏng hoặc dày, trong suốt, có vách ngăn và máu. Thịt nấm có kết cấu dạng monomitic hoặc dimitic, các sợi nguyên thủy có thành mỏng, mịn, có vách ngăn, phân nhánh; sợi cứng thành dày, không phân nhánh.

Thông tin chi tiết cấu trúc đại thể và vi thể của các chủng nấm bào ngư trắng được trình bày trong bảng 3 và hình thái chủng bào ngư trắng đại diện (ABI-F000222) được trình bày trong hình 2.

3.1.3. Chủng nấm bào ngư tiểu yến

Các chủng bào ngư tiểu yến có hình thái đặc trưng như sau:

- Hình thái đại thể:

Quả thể có kích thước nhỏ tới trung bình, dạng thịt, có hoặc không có phiến nổi dài tới cuống, hiếm khi dạng ngói lợp, thỉnh thoảng có dạng lồi. Bề mặt mũ khô, mượt; có màu xám nhạt, xám nâu hoặc xám tím; phần rìa mũ cuộn vào trong. Cuống dính tâm hoặc lệch tâm, dạng chùy, mọc đều hoặc nhỏ dần từ đỉnh đến gốc cuống; có ghi nhận ít nhiều lông mao ở các mẫu già. Phiến nấm mọc dài tới cuống, dày đặc, khoảng cách giữa các phiến hẹp, thường tạo thành dạng lưới ở đỉnh cuống, rìa của phiến

mịn; phiến có cùng màu với cuống. Phần thịt hơi cứng; thịt có màu trắng khi tươi và màu kem nhạt khi khô; màu sắc không đổi khi bị cắt.

- Hình thái hiển vi:

Bào tử có bề mặt mịn, hình trụ, thành mỏng, màu kem nhạt. Đám hình chùy, có bốn bào tử. Có nhiều dạng tương tự đám, hình chùy. Không ghi nhận thấy liệt bào. Vùng cận bào tầng mỏng, có vách. Thể nền rời rạc, cấu thành từ các sợi mỏng hoặc dày, trong suốt, có vách ngăn và máu. Thịt nấm có kết cấu dạng dimitic, các sợi nguyên thủy có thành mỏng, mịn, có vách ngăn, phân nhánh; sợi cứng thành dày, không phân nhánh.

Thông tin chi tiết cấu trúc đại thể và vi thể của các chủng nấm bào ngư tiểu yến được trình bày trong bảng 3 và hình thái được trình bày trong hình 3.

Các đặc điểm của mũ nấm, phiến nấm và bào tử của 10 chủng bào ngư xám có nhiều điểm tương đồng với loài *P. pulmonarius* và *P. ostreatus*. Các đặc điểm vi thể về giá trị Q của bào tử (2,1-2,5), hình dáng mũ nấm và độ dày lớp bì mũ nấm (mỏng) tương đồng với loài *P. pulmonarius*. Như vậy 10 chủng nấm bào ngư xám có thể thuộc loài *P. pulmonarius*.

Các đặc điểm mũ nấm, phiến nấm và bào tử của 4 chủng nấm bào ngư trắng có nhiều điểm tương đồng với loài *P. pulmonarius* và *P. ostreatus*. Các đặc điểm vi thể về giá trị Q của bào tử (2,7-2,9); màu sắc (trắng); độ dày lớp bì mũ nấm (dày) tương đồng với loài *P. ostreatus*. Như vậy 4 chủng nấm bào ngư trắng có thể thuộc loài *P. ostreatus*.

Chủng nấm bào ngư tiểu yến ABI-F000201 có đặc điểm đại thể tương đồng với loài *P. pulmonarius* và *P. ostreatus*; nhưng các đặc điểm vi thể, đặc biệt giá trị Q (2,8) thì giống với loài *P. ostreatus* hơn. Do vậy chủng này có thể thuộc loài *P. ostreatus*.

Các kết quả trên cũng cho thấy giá trị Q là đặc điểm phù hợp có thể dùng để phân biệt loài *P. pulmonarius* và *P. ostreatus*. Điều này tương đồng với các nghiên cứu trong và ngoài nước trên hai loài này (Tran Thi Ngọc My & cs., 2017; Rajarathnam & cs., 1987; Segedin & cs., 1995).

Định danh các chủng nấm bào ngư (*Pleurotus* spp.) thu nhận tại khu vực phía nam dựa trên phân tích đặc điểm hình thái và trình tự ITS

Bảng 3. Kích thước các cấu trúc đại thể và vi thể các chủng nấm

Mã chủng	Mũ (mm)	Cuống (mm)	Thịt nấm (mm)	Bào tử (µm)	Đám (µm)	Cận bào tầng (µm)	Sợi nấm (µm)
ABI-F000241	43-78 x 47-98	53-78 x 64-90	6-9/1	4,9-7,6 x 2,0-3,4 L = 5,8; W = 2,5; Q = 2,3	28,6-34,8 x 6,1-7,8	12	4,6-5,4
ABI-F000248	52-75 x 49-98	16-35 x 12-26	11-16/1	6,6-8,4 x 2,8-3,4 L = 7,4; W = 3,1; Q = 2,4	20,2-27,6 x 2,8-4,6	9,3	5,5-9,4
ABI-F000252	40-87 x 45-123	8-30 x 2-25	7-19/1	5,9-7,5 x 2,6-3,2 L = 6,6; W = 2,9; Q = 2,3	23,8-38,2 x 6,4-8,1	9,2	6,0-9,1 (nguyên thủy) 1,7-5,4 (cứng)
ABI-F000253	45-95 x 60-131	12-54 x 2-23	9-19/1	6,0-7,4 x 2,6-3,4 L = 6,7; W = 3,0; Q = 2,2	22,3-30,6 x 4,9-9,8	112,5	3,5-12,9
ABI-F000254	35-66 x 45-92	40-77 x 8-29	5-25/1	6,7-8,1 x 2,6-3,4 L = 7,4; W = 3,1; Q = 2,4	23,3-35,4 x 5,3-7,7	110,9	4,2-13,9 (nguyên thủy) 2,6-3,6 (cứng)
ABI-F000255	46-64 x 55-88	45-86 x 4-16	5-8/1	4,4-6,9 x 1,9-3,6 L = 5,7; W = 2,5; Q = 2,3	23,9-35,7 x 6,3 - 8,2	112	6,8-10,4
ABI-F000256	46-90 x 53-104	63-113 x 7-16	8-11/1	5,5-8,0 x 2,0-3,9 L = 6,8; W = 2,8; Q = 2,5	20,5-37,8 x 5,9-8,1	111,5	4,0-14,2
ABI-F000257	22-60 x 20-80	3-90 x 2-22	4-15/1	6,2-7,4 x 2,3-3,2 L = 6,8; W = 2,8; Q = 2,5	20,9-34,9 x 4,1-5,7	99,5	6,3-7,9
ABI-F000259	20-85 x 22-130	10-60 x 4-31	4-25/1	4,8-7,3 x 1,8-3,3 L = 5,6; W = 2,7; Q = 2,1	35,6-39,5 x 6,3-7,9	110,6	3,7-8,6
ABI-F000261	44-96 x 59-125	5-73 x 3-16	7-13/1	5,9-6,9 x 2,4-3,0 L = 6,4; W = 2,7; Q = 2,4	15,3-21,3 x 4,3-6,0	66,7	3,4-8,5
ABI-F000219	35-90 x 35-99	39-75 x 3-19	4-15/1	7,2-9,8 x 2,2-3,9 L = 8,7; W = 3,0; Q = 2,9	29,7-44,8 x 6,12-8,5	110	2,9-7,3 (nguyên thủy) 1,2-3,5 (cứng)
ABI-F000222	39-84 x 42-99	44-66 x 3-17	5-12/1	6,2-10,8 x 2,1-3,8 L = 8,2; W = 3,0; Q = 2,7	20,1-27,5 x 10,6-14,3	99,3	2,8-11,5 (nguyên thủy) 0,8-3,9 (cứng)
ABI-F000223	45-129 x 50-120	51-91 x 2-23	8-16/1	6,1-7,9 x 2,2-3,0 L = 7,1; W = 2,6; Q = 2,8	44,9-50,1 x 7,6-8,9	110,9	5,0-8,9
ABI-F000224	35-90 x 36-120	36-80 x 2-19	8-20/1	6,1-7,8 x 2,0-2,8 L = 7,0; W = 2,4; Q = 2,9	20,1-27,5 x 10,6-14,3	110,9	4,9-12,2
ABI-F000201	25-74 x 30-85	45-78 x 3-23	7-15/0,5	6,8-8,2 x 2,4-3,2 L = 7,4; W = 2,7; Q = 2,8	28,6-39,5 x 14,0-15,5	99,3	2,4-11,1 (nguyên thủy) 1,1-4,8 (cứng)



Ghi chú: a, b: Quả thể; c: Phiến; d: Bề mặt của cuống; e: Thịt nấm; f: Hệ sợi của thịt nấm; g: Bào tử; h: Đám;
Thước: a-d: 1cm; f-h: 10 μ m.

Hình 1. Đặc điểm đại thể và vi thể của chủng nấm bào ngư xám ABI-F000253



Ghi chú: a, b: Quả thể; c: Phiến; d: Bề mặt của cuống; e: Thịt nấm; f: Hệ sợi của thịt nấm; g: Bào tử; h: Tế bào tương tự đám; Thước: a-d: 1cm; f-h: 10 μ m.

Hình 2. Đặc điểm đại thể và vi thể của chủng nấm bào ngư trắng ABI-F000222

Định danh các chủng nấm bào ngư (*Pleurotus* spp.) thu nhận tại khu vực phía nam dựa trên phân tích đặc điểm hình thái và trình tự ITS

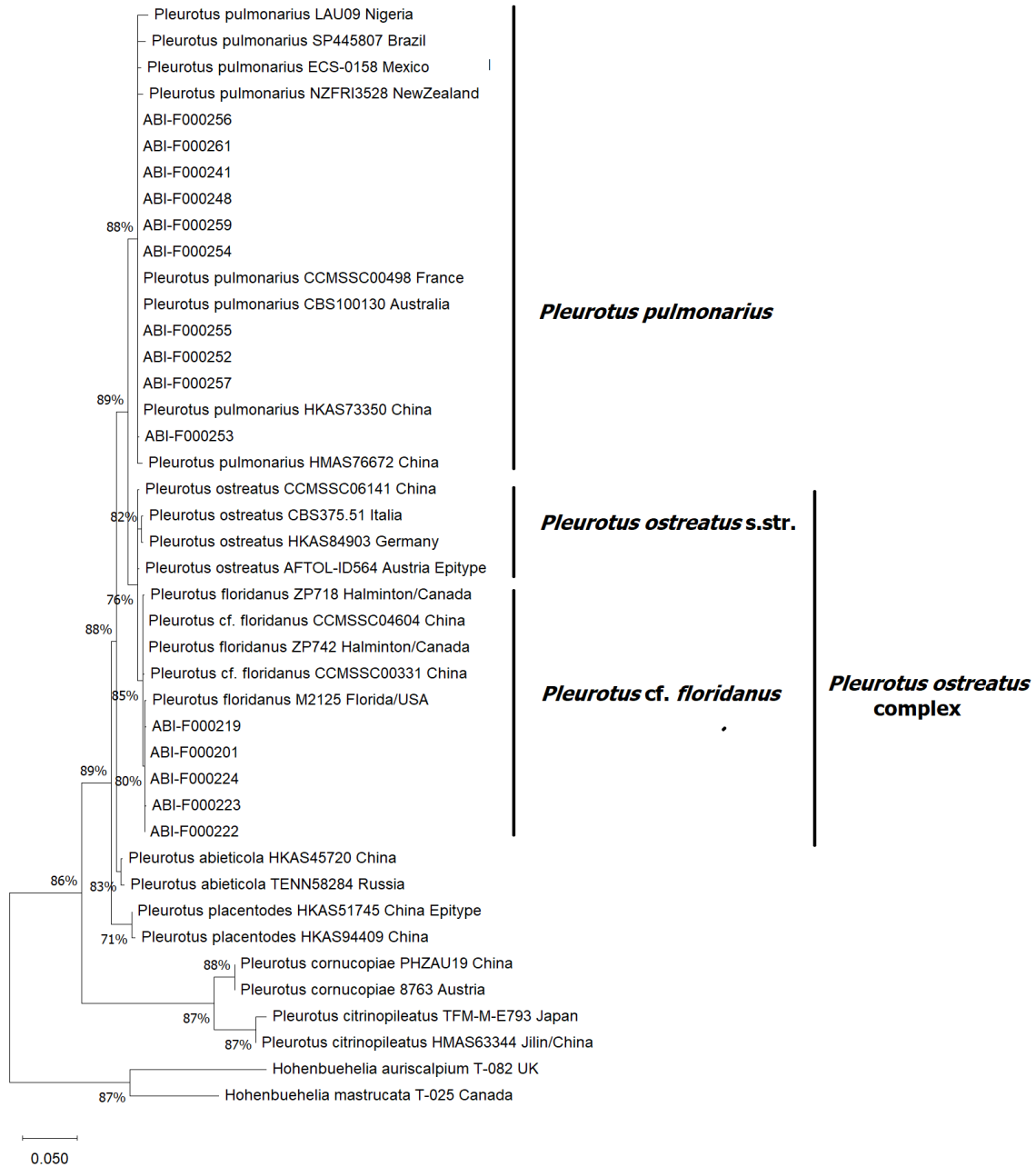


Ghi chú: a, b: Quả thể; c: Phiến; d: Bề mặt của cuống; e: Thịt nấm; f: Hệ sợi của thịt nấm; g: Bào tử; h: Đám; Thước: a-d: 1cm; f-h: 10 μ m.

Hình 3. Đặc điểm đại thể và vi thể của chủng ABI-F000201

Bảng 3. Kết quả so sánh trình tự ITS của các chủng nấm bào ngư với GenBank

Mã chủng	Mã định danh	Độ bao phủ (%)	Độ tương đồng (%)	E -value	Tên loài
ABI-F000201	MK603976	100	99,85	0,0	<i>P. ostreatus</i>
ABI-F000219	MG819727	99	99,85	0,0	<i>P. ostreatus</i>
ABI-F000222	MK603976	100	100	0,0	<i>P. ostreatus</i>
ABI-F000223	MG819739	99	99,70	0,0	<i>P. ostreatus</i>
ABI-F000224	MG819739	100	100	0,0	<i>P. ostreatus</i>
ABI-F000241	KT273376	99	100	0,0	<i>P. pulmonarius</i>
ABI-F000248	MN239983	99	100	0,0	<i>P. pulmonarius</i>
ABI-F000252	MN239983	99	100	0,0	<i>P. pulmonarius</i>
ABI-F000253	MG819635	100	99,54	0,0	<i>P. pulmonarius</i>
ABI-F000254	MN239983	100	99,84	0,0	<i>P. pulmonarius</i>
ABI-F000255	KT273376	99	100	0,0	<i>P. pulmonarius</i>
ABI-F000256	MT778822	97	100	0,0	<i>P. pulmonarius</i>
ABI-F000257	KF932728	99	100	0,0	<i>P. pulmonarius</i>
ABI-F000259	ON869366	98	99,87	0,0	<i>P. pulmonarius</i>
ABI-F000261	MN239983	100	99,84	0,0	<i>P. pulmonarius</i>



Hình 4. Cây phát sinh loài dựa trên trình tự ITS theo phương pháp ML, mô hình Kimura hai yếu tố của các chủng *Pleurotus* spp. (bootstrap lặp lại 1.000 lần)

3.2. Định danh bằng phân tích vùng trình tự ITS

Kết quả phân tích trình tự ITS được trình bày trong bảng 3. Kích thước của các trình tự dao động từ 583bp đến 819bp. Kết quả cho thấy các chủng nấm đều thuộc chi *Pleurotus* với độ tương đồng cao. Trong đó, 10 mẫu được định danh là *P. pulmonarius*, 5 mẫu định danh là

P. ostreatus. Kết quả định danh dựa trên trình tự ITS phù hợp với kết quả định danh dựa trên đặc điểm hình thái như trên và vùng trình tự ITS hỗ trợ tốt cho định danh nấm bào ngư.

Các nghiên cứu định danh các chủng nấm bào ngư tại khu vực phía nam cũng được một số tác giả công bố. Các chủng nấm bào ngư xám thu thập được xác định là *P. pulmonarius* (Tran Thi Ngọc My & cs., 2017). Một vài nghiên cứu

Định danh các chủng nấm bào ngư (*Pleurotus* spp.) thu nhận tại khu vực phía nam dựa trên phân tích đặc điểm hình thái và trình tự ITS

khác cũng có kết quả tương tự (Liễn Như Ý & Trần Nhân Dũng, 2012; Hồ Bảo Thùy Quyên & cs., 2019; Ho & cs., 2021). Riêng các chủng nấm bào ngư trắng có sự khác nhau giữa các công bố: *P. ostreatus* (Liễn Như Ý & Trần Nhân Dũng, 2012; Ho & cs., 2021); *P. ostreatus* và *P. cornucopiae* (Tran Thi Ngọc My & cs., 2017); *P. floridanus* (Ngô Thị Phương Dung & cs., 2011). Do loài *P. floridanus* thuộc *P. ostreatus* complex nên khác biệt về hình thái và cả sinh học phân tử với loài *P. ostreatus* rất ít nên khó phân biệt. Đặc điểm chính để phân biệt giữa *P. floridanus* và *P. ostreatus* là sự xuất hiện nhiều liệt bào trong lớp thụ tầng ở *P. floridanus* (Singer, 1946), nhưng tất cả các mẫu nấm bào ngư trắng và nấm bào ngư tiểu yến trong nghiên cứu đều không ghi nhận liệt bào. Bên cạnh đó, loài *Pleurotus* cf. *floridanus* được xem là phân loại dưới loài của loài *P. ostreatus*, do vậy các chủng nấm bào ngư trắng và nấm tiểu yến trong nghiên cứu này vẫn tương đồng với loài *P. ostreatus*.

3.3. Xây dựng cây phát sinh loài

Cây phát sinh loài dựa trên trình tự ITS của các chủng nấm bào ngư được trình bày trong hình 4. Với cây phát sinh loài của bộ dữ liệu trình tự ITS 719 bp gồm 27 trình tự tham chiếu và 15 trình tự mẫu nghiên cứu sau khi sắp gióng hàng, các chủng bào ngư xám được xác định là loài *P. pulmonarius* tập hợp thành một nhánh với chỉ số bootstrap là 88% cùng với 8 trình tự tham chiếu của loài *P. pulmonarius*. Các chủng nấm bào ngư trắng và chủng nấm bào ngư tiểu yến tạo thành một phân nhánh khác với chỉ số bootstrap là 80% với 5 trình tự tham chiếu của nhóm *Pleurotus* cf. *floridanus*. Các chủng này tách biệt với nhóm *P. ostreatus* sensu stricto (s.str.) (bootstrap 76%). Có thể thấy nhóm bào ngư trắng và tiểu yến thương mại tại Việt Nam đã tách ra khỏi nhóm *P. ostreatus* s.str. tự nhiên trên cây phát sinh loài. Loài *Pleurotus* cf. *floridanus* được xem là phân loại dưới loài của loài *P. ostreatus*, do vậy các chủng nấm bào ngư trắng và nấm tiểu yến vẫn tương đồng với loài *P. ostreatus*.

Trong các nghiên cứu của các tác giả khác cho thấy vùng trình tự ITS cũng phân tách được

các nhóm *P. pulmonarius*, *Pleurotus* cf. *floridanus*, *P. ostreatus* s.str., với các chỉ số bootstrap tương ứng là 99%, 90%, 92% (Li & cs., 2017). Nhóm *P. ostreatus* tự nhiên cũng tách khỏi nhóm *P. ostreatus* thương mại trên cây phát sinh loài trong nghiên cứu của Pánek & cs. (2019). Kết quả nghiên cứu này cũng tương tự với công bố của Ho & cs. (2021). Nhóm tác giả khi phân tích vùng trình tự ITS cho thấy 5 chủng bào ngư xám thuộc loài *P. pulmonarius*, 2 chủng bào ngư trắng và bào ngư tiểu yến thuộc loài *P. ostreatus*; tất cả các nhánh có chỉ số bootstrap trên 90%. Ba nhóm *P. pulmonarius*, *Pleurotus* cf. *floridanus*, *P. ostreatus* s.str. đều thuộc *P. ostreatus* complex, đồng thời màu sắc quả thể nấm bào ngư bị ảnh hưởng bởi môi trường nuôi trồng, cũng như quá trình nuôi trồng thương mại có sự lai tạo nên các phương pháp định danh bằng hình thái gặp khó khăn (Pánek & cs., 2019; Zervakis & cs., 2014); do vậy các phương pháp định danh bằng sinh học phân tử đã hỗ trợ tốt cho các phương pháp định danh truyền thống.

4. KẾT LUẬN

Các kết quả định danh dựa trên hình thái, kết quả phân tích trình tự ITS và dựng cây phát sinh loài cho thấy: 10 chủng bào ngư xám được định danh là thuộc loài *P. pulmonarius*, 4 chủng nấm bào ngư trắng và chủng nấm bào ngư tiểu yến được định danh là thuộc loài *P. ostreatus*. ITS có thể phân biệt được các loài *P. pulmonarius*, *P. ostreatus* và *Pleurotus* cf. *floridanus* và kết quả định danh bằng sinh học phân tử hỗ trợ tốt cho định danh hình thái.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Adebayo E., Oloke J., Achana Y. & Bora T. (2012). Improvement of laccase production in *Pleurotus pulmonarius*-LAU 09 by mutation. *Journal of Microbiology Research*. 2: 11-17.
- Bùi Ngọc Trang, Ngô Thùy Trâm, Phạm Văn Lộc & Hồ Bảo Thùy Quyên (2021). Nghiên cứu định danh và khả năng sinh trưởng hệ sợi của các giống nấm bào ngư thương mại trên một số môi trường dinh dưỡng. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*. 6: 48-56.

- Cohen R., Persky L. & Hadar Y. (2002). Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 58: 582-594.
- Corner E.J.H. (1981). The agaric genera *Lentinus*, *Panus*, and *Pleurotus* with particular reference to Malaysian species. Nova Hedwig Beih, Germany.
- Guzmán G. (2000). Genus *Pleurotus* (Jacq.: Fr.) P. Kumm. (Agaricomycetidae): diversity, taxonomic problems, and cultural and traditional medicinal uses. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2(2): 29-123.
- Ho B.T.Q., Huynh N.M.T., Co D.T., Dinh M.H. & Pham N.D.H. (2021). Biological characteristic of the *Pleurotus* cultivars in southwestern Viet Nam. *International Journal of Agricultural Technology*. 18(1): 105-122.
- Hồ Bảo Thùy Quyên, Ngô Thùy Trâm, Lê Quang Anh Tuấn, Bùi Thị Như Quỳnh, Nguyễn Hòa Minh Tuấn & Cổ Đức Trọng (2019). Khả năng sinh trưởng của hệ sợi của các chủng nấm bào ngư xám *Pleurotus* sp. trên một số môi trường thạch dinh dưỡng. *Tạp chí Di truyền và Ứng dụng. Chuyên san Nấm và Công nghệ sinh học*. tr. 112-118.
- James T.Y., Kauff F., Schoch C.L., Matheny P.B., Hofstetter V., Cox C.J., Celio G., Gueidan C., Fraker E. & Miadlikowska J. (2006). Reconstructing the early evolution of fungi using a six-gene phylogeny. *Nature*. 443: 818-822.
- Jusuf M. (2010). Amplified fragment length polymorphism diversity of cultivated white oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Hayati Journal of Biosciences*. 17: 21-26.
- Kimura M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*. 16: 111-120.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C. & Tamura K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*. 35: 1547-1549.
- Largent D. (1977). How to identify mushrooms to genus I: Macroscopic Features. Mad River Press, USA.
- Largent D., Johnson D. & Watling R. (1977). How to identify mushrooms to genus III: Microscopic features. Mad River Press, USA.
- Larsson A. (2014). AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics*. 30: 3276-3278.
- Lechner B. E., Wright J. E. & Albertó E. (2004). The genus *Pleurotus* in Argentina. *Mycologia*. 96(4): 845-858.
- Lê Xuân Thám (2010). Nấm bào ngư - *Pleurotus* spp. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
- Li J., He X., Liu X.B., Yang Z.L. & Zhao Z.W. (2017). Species clarification of oyster mushrooms in China and their DNA barcoding. *Mycological Progress*. 16: 191-203.
- Liễu Như Ý & Trần Nhân Dũng (2012). Đa dạng di truyền một số loại nấm ăn dựa trên trình tự ITS (internal transcribed spacer). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. 22b: 18-25.
- Liu X.B., Liu J.W. & Yang Z.L. (2015). A new edible mushroom resource, *Pleurotus abieticola*, in southwestern China. *Mycosystema*. 34: 581-588.
- Liu X.B., Li J., Horak E. & Yang Z.L. (2016). *Pleurotus placentodes*, originally described from Sikkim, rediscovered after 164 years. *Phytotaxa*. 267: 137-145.
- Menolli Jr N., Breternitz B. S. & Capelari M. (2014). The genus *Pleurotus* in Brazil: a molecular and taxonomic overview. *Mycoscience*. 55: 378-389.
- Miller Jr O.K. (1969). A new species of *Pleurotus* with a coremioid imperfect stage. *Mycologia*. 61(5): 887-893.
- Pánek M., Wiesnerová L., Jablonský I., Novotný D. & Tomšovský M. (2019). What is cultivated oyster mushroom? Phylogenetic and physiological study of *Pleurotus ostreatus* and related taxa. *Mycological Progress*. 18: 1173-1186.
- Petersen R.H. & Krisai-Greilhuber I. (1996). An epitype specimen for *Pleurotus ostreatus*. *Mycological Research*. 2(100): 229-235.
- Petersen R.H. & Krisai-Greilhuber I. (1999). Type specimen studies in *Pleurotus*. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*. 17(2): 201-219.
- Petersen R.H. & Hughes K.W. (1997). A new species of *Pleurotus*. *Mycologia*. 89: 173-180.
- Rajaratnam S., Bano Z. & Miles P.G. (1987). *Pleurotus* mushrooms. Part I A. Morphology, life cycle, taxonomy, breeding, and cultivation. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*. 26(2): 157-223.
- Raja H.A., Miller A.N., Pearce C.J. & Oberlies N.H. (2017). Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community. *Journal of Natural Products*. 80: 756-770.
- Royse D.J., Baars J. & Tan Q. (2017). Current overview of mushroom production in the world. In: Diego C.Z. & Pardo-Giménez A. (Eds.). *Edible and Medicinal Mushrooms: Technology and Applications*. Wiley Online Library.
- Schoch C.L., Seifert K.A., Huhndorf S., Robert V., Spouge J.L., Levesque C.A., Chen W. & Consortium F.B. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a

Định danh các chủng nấm bào ngư (*Pleurotus* spp.) thu nhận tại khu vực phía nam dựa trên phân tích đặc điểm hình thái và trình tự ITS

- universal DNA barcode marker for fungi. Proceedings of the National Academy of Sciences. 109: 6241-6246.
- Segedin B.P., Buchanan P.K. & Wilkie J. (1995). Studies in the Agaricales of New Zealand: new species, new records and renamed species of *Pleurotus* (Pleurotaceae). Australian Systematic Botany. 8(3): 453-482.
- Singer R. (1946). Two new species of the *Pleurotoideae*. In: McCartney E.S & Schalie H.V.D. (Eds). Papers of the Michigan Academy of Science, Arts, and Letters., v.32. The University of Michigan Press, USA.
- Tran Thi Ngoc My, Ho Bao Thuy Quyen & Pham Nguyen Duc Hoang (2017). Isolating the monokaryon collection of *Pleurotus* spp. Vietnam Journal of Science and Technology. 55: 73-91.
- Trịnh Tam Kiệt (2011). Nấm lớn ở Việt Nam (Tập 1). Nhà xuất bản Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, Hà Nội.
- Winnepenninckx B. (1993). Extraction of high molecular weight DNA from molluscs. Trends in Genetics. 9: 407.
- White T.J., Bruns T., Lee S. & Taylor J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J. & White T.J. (Eds.). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press Inc., USA. pp. 315-322.
- Xu J. (2016). Fungal DNA barcoding. Genome. 59: 913-932.
- Zervakis G., Ntougias S., Gargano M.L., Besi M.I., Polemis E., Typas M.A. & Venturella G. (2014). A reappraisal of the *Pleurotus eryngii* complex-New species and taxonomic combinations based on the application of a polyphasic approach, and an identification key to *Pleurotus* taxa associated with *Apiaceae* plants. Fungal Biology. 118: 814-834.
- Zervakis G.I., Venturella G., Fryssouli V., Inglese P., Polemis E. & Gargano M.L. (2018). *Pleurotus opuntiae* revisited-An insight to the phylogeny of dimitic *Pleurotus* species with emphasis on the *P. djamor* complex. Fungal Biology. 123: 188-199.
- Zhao M., Zhang J., Chen Q., Wu X., Gao W., Deng W. & Huang C. (2016). The famous cultivated mushroom Bailinggu is a separate species of the *Pleurotus eryngii* species complex. Scientific Reports. 6: 1-9.
- Zmitrovich I.V. & Wasser S.P. (2016). Is widely cultivated "*Pleurotus sajor-caju*", especially in Asia, indeed an independent species? International Journal of Medicinal Mushrooms. 18(7): 583-588.