

NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM SINH TRƯỞNG HỆ SỢI VÀ ẢNH HƯỞNG CỦA TỶ LỆ CÁM MẠCH ĐẾN SỰ HÌNH THÀNH, PHÁT TRIỂN QUẢ THỂ CỦA NẤM HOÀNG CHI (*Tomophagus cattienensis*)

Nguyễn Thị Huyền Trang¹, Ngô Xuân Nghiễn²,
Trần Đông Anh¹, Nguyễn Thị Luyện¹, Nguyễn Thị Bích Thùy^{2*}

¹Viện Nghiên cứu Phát triển Nấm ăn, Nấm dược liệu, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

²Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

*Tác giả liên hệ: ntbthuy.cnsh@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 15.08.2023

Ngày chấp nhận đăng: 25.12.2023

TÓM TẮT

Chủng nấm hoàng chi Toc1 (*Tomophagus cattienensis*) là một chủng nấm mới thu thập từ vườn quốc gia Cát Tiên thuộc tỉnh Đồng Nai, được nhận định là một chủng nấm quý. Trong nghiên cứu này, hệ sợi chủng nấm hoàng chi Toc1 được nuôi ở 4 ngưỡng nhiệt độ ($20 \pm 1^\circ\text{C}$, $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $30 \pm 1^\circ\text{C}$ và $35 \pm 1^\circ\text{C}$); môi trường nuôi cấy sử dụng 5 nguồn cacbon khác nhau (glucose, fructose, saccharose, maltose và lactose), 5 nguồn nitơ khác nhau (cao nấm men, peptone, NH_4Cl , NH_4NO_3 và $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) và 6 nguồn muối khoáng (KCl , KNO_3 , NaNO_3 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 và $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), đồng thời hệ sợi chủng nấm được nuôi cấy trên 4 cơ chất nền bổ sung tỷ lệ cám mạch khác nhau (0%, 5%, 10% và 15%). Mục tiêu nhằm tìm ra ngưỡng nhiệt độ tối ưu, nguồn cacbon, nguồn nitơ và nguồn muối khoáng phù hợp với sinh trưởng hệ sợi chủng nấm hoàng chi Toc1, đồng thời đánh giá ảnh hưởng của tỷ lệ cám mạch bổ sung vào cơ chất nuôi trồng đến sự hình thành và phát triển quả thể chủng nấm này. Kết quả chỉ ra rằng, hệ sợi nấm hoàng chi Toc1 sinh trưởng tốt nhất ở ngưỡng nhiệt $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Glucose và cao nấm men lần lượt là các nguồn cacbon và nitơ tốt nhất đối với hệ sợi chủng nấm. Chủng nấm cũng sinh trưởng mạnh nhất trên môi trường có bổ sung K_2HPO_4 . Công thức nuôi trồng bao gồm 89% mùn cưa, 5% bột ngô, 1% CaCO_3 và 5% cám mạch cho hiệu suất nấm thu được cao nhất đạt 15,97%.

Từ khóa: *Tomophagus cattienensis*, nuôi trồng, nguồn muối khoáng, nhiệt độ, tỷ lệ cám mạch.

Evaluating Properties of Mycelial Growth and Effect of the Wheat Bran Ratio on Formation and Fruiting Body Development of Golden Lingzhi Mushroom Strain (*Tomophagus cattenensis*)

ABSTRACT

The golden lingzhi strain Toc1 (*Tomophagus cattienensis*) is a new strain that was discovered in the Cat Tien National Park in Dong Nai province and it was identified to be a precious mushroom species. In this study, mycelial of strain Toc1 were incubated in 4 temperature levels ($20 \pm 1^\circ\text{C}$, $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $30 \pm 1^\circ\text{C}$ and $35 \pm 1^\circ\text{C}$); culture medium supplemented 5 different carbon sources (glucose, fructose, saccharose, maltose and lactose), 5 different nitrogen sources (yeast extract, peptone, ammonium clorua, ammonium nitrate and ammonium sulfate), 6 mineral salt sources (kali chloride, kali nitrate, natri nitrate, dikali phosphat, kali dihydrophosphat and magie sulfat). Beside that, mycelial of this strain were cultivated in 4 substrates added different wheat bran ratio (0%, 5%, 10% and 15%). This study aims to figure out the optimal temperature, the suitable carbon, nitrogen and mineral salt source for mycelial growth of golden lingzhi mushroom strain Toc1 and also evaluating effect of the wheat bran ratio, which was supplemented on substrate, on formation and fruiting body development of this strain. The results showed that the optimal temperature for mycelial growth is $25^\circ\text{C} \pm 1$. Glucose and yeast extract were considered the most suitable carbon and nitrogen sources for mycelial growth. This strain grew very well on culture supplemented K_2HPO_4 . The substrate containing 89% sawdust, 5% corn powder, 1% CaCO_3 and 5% wheat bran performed the highest BE, reached 15,97%.

Keywords: *Tomophagus cattienensis*, cultivation, mineral salt sources, temperature, wheat bran ratios.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tomophagus là một chi nấm trong họ *Ganodermataceae*, loại điển hình *Tomophagus colossus* có nguồn gốc từ vùng nhiệt đới châu Mỹ và châu Phi (Murrill WA, 1905). *Tomophagus cattienensis* (nấm hoàng chi), là một loài nấm được phát hiện, thu thập trên cây gỗ cứng tại vườn quốc gia Cát Tiên, đã được xác định loài mới dựa vào hình thái học và mã vạch ITS DNA (Le Xuan Tham & cs., 2012).

Hiện nay, các nghiên cứu mô tả đặc điểm sinh học, giá trị dược liệu của chi *Tomophagus* nói chung và loài *Tomophagus cattienensis* nói riêng còn chưa nhiều. Gần đây nhất, ba hợp chất steroid mới có trong quả thể *T. cattienensis* (đặt tên là cattienoid A-C) và schisanlactone A được phát hiện (Bui Thi Thu Hien & cs., 2013). Theo đó, các hợp chất này mặc dù không có hoạt tính kháng khuẩn cũng như ức chế tyrosinase, nhưng steroid B và schisanlactone A lại có khả năng gây độc tế bào KB (tế bào ung thư biểu mô biểu bì ở người) với giá trị IC_{50} tương ứng của chúng lần lượt là 91,2 và 63,3 μ m.

Trong một nghiên cứu, Nguyen & cs. (2021b) nhận định rằng, điều kiện môi trường nuôi cấy là yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến sinh trưởng hệ sợi, sự hình thành và phát triển quả thể nấm. Tuy nhiên, các công trình nghiên cứu về sinh trưởng hệ sợi, sự phát triển quả thể của chi *Tomophagus* nói chung, đặc biệt là loài mới *T. cattienensis* còn rất hạn chế. Vì thế, mục tiêu của nghiên cứu này nhằm đánh giá khả năng sinh trưởng hệ sợi chủng nấm *T. cattienensis* Toc1 trên các điều kiện khác nhau bao gồm: nhiệt độ, nguồn cacbon, nguồn nitơ, nguồn khoáng, đồng thời xác định ảnh hưởng của tỷ lệ dinh dưỡng bổ sung trong giai đoạn nuôi trồng đến sự hình thành và phát triển quả thể chủng nấm.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Hệ sợi chủng nấm hoàng chi (ký hiệu là Toc1) được bảo quản trên môi trường PGA ở 10°C và lưu trữ tại Viện Nghiên cứu và Phát triển

Nấm ăn, Nấm dược liệu, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Sinh trưởng hệ sợi chủng nấm hoàng chi Toc1 ở các điều kiện nhiệt độ khác nhau

Chủng nấm hoàng chi Toc1 được nuôi cấy trên môi trường PGA và được nuôi ở các mức nhiệt độ 20°C \pm 1, 25°C \pm 1, 30°C \pm 1 và 35°C \pm 1 để đánh giá khả năng sinh trưởng. Đường kính hệ sợi được đo 3 ngày một lần.

* Công thức môi trường PGA (định lượng sử dụng cho 1 lít môi trường) bao gồm: dịch chiết 200g khoai tây, 20g đường glucose và 15g agar.

2.2.2. Sinh trưởng hệ sợi chủng nấm hoàng chi Toc1 trên môi trường có bổ sung các nguồn cacbon khác nhau

Năm nguồn cacbon được sử dụng để khảo sát bao gồm: glucose, fructose, maltose, lactose và saccharose. Công thức môi trường (định lượng sử dụng cho 1 lít môi trường) như sau:

CT1: Dịch chiết 200g khoai tây + 20g glucose + 15g agar

CT2: Dịch chiết 200g khoai tây + 20g fructose + 15g agar

CT3: Dịch chiết 200g khoai tây + 20g maltose + 15g agar

CT4: Dịch chiết 200g khoai tây + 20g lactose + 15g agar

CT5: Dịch chiết 200g khoai tây + 20g saccharose + 15g agar

Sau khi cấy giống, hệ sợi chủng nấm được nuôi ở nhiệt độ 25°C \pm 1. Đường kính hệ sợi được theo dõi liên tục 3 ngày 1 lần.

2.2.3. Sinh trưởng hệ sợi chủng nấm hoàng chi Toc1 trên môi trường có bổ sung các nguồn nitơ khác nhau

Tại thí nghiệm này, 5 nguồn nitơ khác nhau được sử dụng để đánh giá đặc điểm hệ sợi và tốc độ sinh trưởng hệ sợi chủng nấm hoàng chi Toc1 bao gồm: cao nấm men, peptone, NH₄Cl, NH₄NO₃ và (NH₄)₂SO₄. Công thức môi trường (định lượng sử dụng cho 1 lit môi trường) như sau:

CT1: Dịch chiết 200g khoai tây + 20g glucose + 2g cao nấm men + 15g agar

CT2: Dịch chiết 200g khoai tây + 20g glucose + 2g peptone + 15g agar

CT3: Dịch chiết 200g khoai tây + 20g glucose + 2g NH₄Cl + 15g agar

CT4: Dịch chiết 200g khoai tây + 20g glucose + 2g NH₄NO₃ + 15g agar

CT5: Dịch chiết 200g khoai tây + 20g glucose + 2g (NH₄)₂SO₄ + 15g agar

Sau khi cấy giống, hệ sợi chủng nấm được nuôi ở nhiệt độ 25°C ± 1. Đường kính hệ sợi được theo dõi liên tục 3 ngày 1 lần.

2.2.4. Sinh trưởng hệ sợi chủng nấm hoàng chi Toc1 trên môi trường có bổ sung các nguồn muối khoáng khác nhau

Tại thí nghiệm này, 6 nguồn muối khoáng được sử dụng bao gồm: KCl, KNO₃, KH₂PO₄, K₂HPO₄, NaNO₃, MgSO₄.7H₂O. Công thức môi trường (định lượng sử dụng cho 1 lit môi trường) như sau:

CT1: Dịch chiết 200g khoai tây + 20g glucose + 2g cao nấm men + 2g KCl + 15g agar

CT2: Dịch chiết 200g khoai tây + 20g glucose + 2g cao nấm men + 2g KNO₃ + 15g agar

CT3: Dịch chiết 200g khoai tây + 20g glucose + 2g cao nấm men + 2g KH₂PO₄ + 15g agar

CT4: Dịch chiết 200g khoai tây + 20g glucose + 2g cao nấm men + 2g K₂HPO₄ + 15g agar

CT5: Dịch chiết 200g khoai tây + 20g glucose + 2g cao nấm men + 2g NaNO₃ + 15g agar

CT6: Dịch chiết 200g khoai tây + 20g glucose + 2g cao nấm men + 2g MgSO₄.7H₂O + 15g agar

Sau khi cấy giống, hệ sợi chủng nấm được nuôi ở nhiệt độ 25°C ± 1. Đường kính hệ sợi được theo dõi liên tục 3 ngày 1 lần.

2.2.5. Ảnh hưởng của tỷ lệ cám mạch đến sự hình thành và phát triển quả thể nấm hoàng chi Toc1

Chủng nấm hoàng chi Toc1 được nuôi trồng trên cơ chất bổ sung 4 mức tỷ lệ cám mạch khác nhau. Công thức nuôi trồng được thiết kế như sau:

CT1: 94% mùn cưa bồ đề + 5% bột ngô + 0% cám mạch + 1% CaCO₃

CT2: 89% mùn cưa bồ đề + 5% bột ngô + 5% cám mạch + 1% CaCO₃

CT3: 84% mùn cưa bồ đề + 5% bột ngô + 10% cám mạch + 1% CaCO₃

CT4: 79% mùn cưa bồ đề + 5% bột ngô + 15% cám mạch + 1% CaCO₃

Nguyên liệu được xử lý, chỉnh ẩm và phối trộn theo phương pháp của Đinh Xuân Linh & cs. (2007). Các bịch thí nghiệm được tiến hành trong phòng tối, nhiệt độ 26°C ± 1, độ ẩm không khí 65-75%. Sau 30 ngày ươm sợi, bịch được rạch và chuyển sang phòng nuôi quả thể có nhiệt độ 30-35°C, độ ẩm 85-90%, ánh sáng 800-1.000lux.

Các chỉ tiêu theo dõi quá trình sinh trưởng hệ sợi và sự hình thành, phát triển quả thể bao gồm:

+ Độ dài hệ sợi (mm): Tính từ ngày cấy giống, cứ 7 ngày đo 1 lần độ dài hệ sợi

+ Thời gian hệ sợi sinh trưởng kín bịch cơ chất (ngày): Tính từ thời điểm cấy giống đến khi hệ sợi sinh trưởng kín bịch cơ chất

+ Tốc độ sinh trưởng trung bình của hệ sợi (mm/ngày) = Độ dài trung bình hệ sợi (mm)/Thời gian hệ sợi sinh trưởng được độ dài đó (ngày)

+ Thời gian bắt đầu xuất hiện mầm quả thể (ngày): Tính từ thời điểm cấy giống đến khi quả thể bắt đầu hình thành

+ Thời gian bắt đầu thu hái quả thể (ngày): Tính từ thời điểm cấy giống đến lúc quả thể được thu hái

+ Khối lượng trung bình quả thể (g)

+ Đường kính trung bình mũ quả thể (mm): Đo phần mũ dài nhất của quả thể

+ Hiệu suất sinh học (%) = Khối lượng nấm tươi (g) × 100%/Tổng khối lượng nguyên liệu khô (g).

2.2.6. Đặc điểm hệ sợi

Đặc điểm sinh trưởng và hình thái hệ sợi được quan sát và đánh giá theo phương pháp của Trịnh Tam Kiệt (2012). Mật độ hệ sợi được đánh giá theo ba mức độ: thưa (+), trung bình (++); dày (+++).

2.3. Xử lý số liệu

Các thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên và được lặp lại 3 lần. Số liệu ghi nhận được xử lý bằng phần mềm Excel và phần mềm xử lý thống kê Iristat 5.0, sử dụng phương pháp phân tích phương sai Blance ANOVA với độ tin cậy 95%.

Cặp đôi giá trị trung bình được so sánh theo phương pháp sau: Giá trị $LSD_{0,05}$ được so sánh với trị tuyệt đối hiệu hai giá trị trung bình của hai công thức, nếu giá trị $LSD_{0,05}$ nhỏ hơn giá trị hiệu đó thì hai công thức so sánh khác nhau có ý nghĩa về mặt thống kê với độ tin cậy 95%. Ngược lại, nếu giá trị $LSD_{0,05}$ lớn hơn giá trị hiệu đó thì hai công thức so sánh không khác nhau về mặt thống kê với độ tin cậy 95%.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh trưởng hệ sợi chủng nấm hoàng chi Toc1

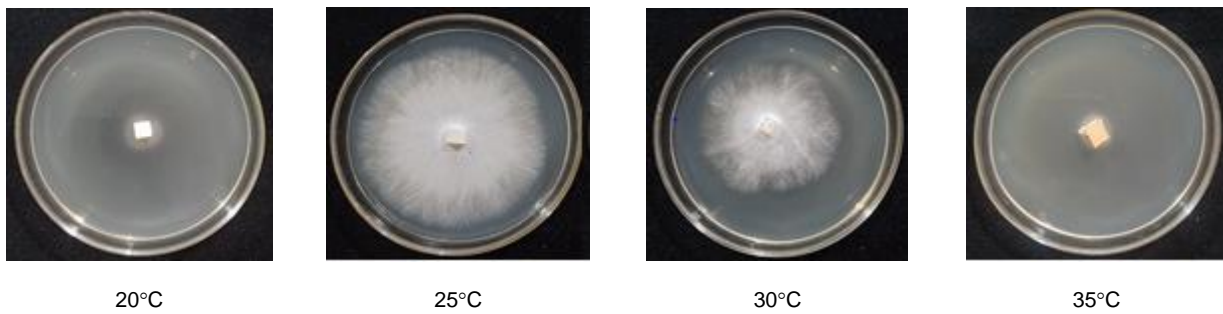
Hệ sợi chủng nấm hoàng chi Toc1 sinh trưởng nhanh nhất khi nuôi ở nhiệt độ $25^{\circ}\text{C} \pm 1$, tốc độ trung bình hệ sợi (TĐTBHS) đạt 16,50 mm/ngày. Tại nền nhiệt độ cao hơn $30^{\circ}\text{C} \pm 1$, hệ sợi chủng nấm sinh trưởng tốt, TĐTBHS khá nhanh, đạt 11,86 mm/ngày. Hệ sợi chủng nấm vẫn sinh trưởng khi nhiệt độ hạ xuống thấp $20^{\circ}\text{C} \pm 1$, tuy nhiên TĐTBHS chậm, chỉ đạt 6,07 mm/ngày. Trong khi đó, khi nâng nhiệt độ lên $35^{\circ}\text{C} \pm 1$, sự sinh trưởng của hệ sợi chủng nấm bị ức chế, có xu hướng co lại, ngừng phát triển, do đó không xác định được TĐTBHS cũng như thời gian sinh trưởng kín đĩa thí nghiệm (Bảng 1).

Tại các mức nhiệt độ khác nhau, hệ sợi chủng nấm hoàng chi Toc1 thể hiện sự khác biệt rõ rệt về TĐTBHS và độ dày hệ sợi (Hình 1). Hệ sợi chủng nấm hoàng chi Toc1 khi được nuôi ở nhiệt độ $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ phát triển nhanh, hệ sợi dày và khỏe hơn so với các mức nhiệt độ còn lại. Ở nền nhiệt độ thấp ($20^{\circ}\text{C} \pm 1$), hệ sợi sinh trưởng yếu, mật độ thưa. Khi nuôi ở ngưỡng nhiệt độ cao hơn ($30^{\circ}\text{C} \pm 1$), hệ sợi phát triển tương đối tốt nhưng không dày. Tại mức nhiệt cao ($35^{\circ}\text{C} \pm 1$) kéo dài, hệ sợi bị ức chế, ngừng sinh trưởng. Như vậy, hệ sợi chủng nấm hoàng chi Toc1 sinh trưởng tốt trong ngưỡng nhiệt từ $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ đến $30^{\circ}\text{C} \pm 1$, sinh trưởng tốt nhất tại nhiệt độ $25^{\circ}\text{C} \pm 1$, sinh trưởng yếu ở nền nhiệt độ thấp ($20^{\circ}\text{C} \pm 1$) và bị ức chế sinh trưởng tại mức nhiệt $35^{\circ}\text{C} \pm 1$ kéo dài.

Năm 1976, kết quả nghiên cứu của Zadrazil cho thấy nhiệt độ có tác động lớn đến sinh trưởng hệ sợi nấm. Chủng giống linh chi *G. lucidum* sinh trưởng tốt nhất ở 22°C , khi tăng nhiệt độ lên cao 30°C , hệ sợi không có dấu hiệu sinh trưởng theo ghi nhận của Ian Fletcher & cs. (2019). Theo Andrew & cs. (2019) các loài nấm Linh chi sinh trưởng trong khoảng nhiệt độ tối ưu từ 25°C đến 30°C , bao gồm các chủng *G. curtisii*, *G. meredithiae*, *G. ravenelii*, *G. sessile*, *G. tuberculosum*, *G. cf. weberianum* và *G. zonatum*. Chủng nấm Linh chi *G. martinicense* phát triển tối ưu ở nền nhiệt độ cao hơn từ 30°C đến 35°C và *T. colossus* sinh trưởng tối ưu trong khoảng nhiệt độ từ 35°C - 40°C . Như vậy, tác động của nhiệt độ lên sự sinh trưởng hệ sợi của các loài, các chủng khác nhau là khác nhau.

Bảng 1. Sinh trưởng hệ sợi chủng nấm hoàng chi Toc1 ở các ngưỡng nhiệt độ khác nhau

Nhiệt độ	ĐDHS sau 3 ngày (mm)	ĐDHS sau 6 ngày (mm)	TĐTBHS (mm/ngày)	Thời gian kín đĩa (ngày)
20°C	15,83	35,17	6,07	13,67
25°C	49,00	82,50	16,50	5,00
30°C	38,17	79,00	11,86	7,00
35°C	5,33	9,83	----	----
CV%	6,90	0,80	1,50	3,90
$LSD_{0,05}$	5,39	1,19	3,90	0,75



Hình 1. Hệ sợi chủng nấm hoàng chi Toc1 sau 4 ngày cấy giống ở các ngưỡng nhiệt độ khác nhau

Bảng 2. Ảnh hưởng của các nguồn cacbon khác nhau đến sinh trưởng hệ sợi chủng nấm hoàng chi Toc1

Nguồn cacbon	ĐDHS sau 3 ngày (mm)	ĐDHS sau 6 ngày (mm)	TĐTBHS (mm/ngày)	Thời gian kín đĩa (ngày)
Glucose	49,00	82,50	16,50	5,00
Fructose	42,67	82,83	13,80	6,00
Maltose	47,00	82,33	15,54	5,33
Saccharose	42,83	82,33	13,72	6,00
Lactose	25,17	49,50	6,79	11,67
CV%	7,10	3,20	6,10	5,00
LSD _{0,05}	5,49	4,58	1,53	0,64

3.2. Ảnh hưởng của nguồn cacbon khác nhau đến sinh trưởng hệ sợi chủng nấm hoàng chi Toc1

Trong 5 nguồn cacbon được sử dụng, hệ sợi nấm hoàng chi Toc1 sinh trưởng nhanh nhất trên nền môi trường PA bổ sung glucose và maltose, TĐTBHS đạt lần lượt 16,50 mm/ngày và 15,54 mm/ngày. Trên nền môi trường bổ sung fructose và saccharose, hệ sợi chủng nấm sinh trưởng khá nhanh, TĐTBHS lần lượt đạt 13,80 mm/ngày và 13,74 mm/ngày. Hệ sợi chủng nấm nuôi cấy trên môi trường bổ sung lactose sinh trưởng chậm, không đồng đều, TĐTBHS chậm nhất, đạt 6,79 mm/ngày (Bảng 2).

Sự khác biệt về mật độ hệ sợi trên các môi trường khác nhau cũng là một điểm đáng quan tâm của các nhà nghiên cứu. Hình 2A cho thấy, khi nuôi trên môi trường bổ sung glucose và maltose, hệ sợi nấm hoàng chi Toc1 sinh trưởng đồng đều, hệ sợi dày mượt. Trên môi trường sử

dụng saccharose và fructose, hệ sợi sinh trưởng đồng đều nhưng mật độ hệ sợi mỏng. Đối với môi trường bổ sung lactose, hệ sợi sinh trưởng chậm, đồng đều, mật độ hệ sợi dày, nhưng đầu sợi nấm không mượt. Dựa vào kết quả về hình thái hệ sợi và TĐTBHS, có thể kết luận rằng hệ sợi chủng nấm hoàng chi Toc1 sinh trưởng tốt trên nhiều nguồn cacbon khác nhau nhưng glucose là nguồn cacbon phù hợp nhất.

Hệ sợi nấm sử dụng nhiều nguồn cacbon để sinh trưởng và phát triển bao gồm monosaccharide, polysaccharide, axit amin và axit hữu cơ (Chang & Miles, 2004). Năm 2014, Ito & Reshi kết luận rằng ảnh hưởng của nguồn cacbon đến tốc độ sinh trưởng của hệ sợi phụ thuộc vào chủng giống, môi trường và điều kiện nuôi cấy. George & cs. (2008) báo cáo rằng glucose là nguồn cacbon bổ sung vào môi trường nuôi cấy cho sinh khối sợi khô nấm *G. lucidum* 447 đạt cao nhất (5,3 g/l), sau đó là cellobiose (5,0 g/l). Mannose và dextrin là hai nguồn

Nghiên cứu đặc điểm sinh trưởng hệ sợi và ảnh hưởng của tỷ lệ cám mạch đến sự hình thành, phát triển quả thể của nấm hoàng chi (*Tomophagus cattienensis*)

cacbon thúc đẩy sự tốc độ phát triển và mật độ hệ sợi của loài nấm *G. applanatum* (Woo-Sik & cs., 2009). Trong khi đó, với một chủng khác cùng loài *G. applanatum*, Jeong & cs. (2005) kết luận rằng glucose là nguồn cacbon tốt nhất cho hệ sợi nấm phát triển.

3.3. Ảnh hưởng của nguồn nitơ khác nhau đến sinh trưởng hệ sợi chủng nấm hoàng chi Toc1

Trong 5 nguồn nitơ được sử dụng ở thí nghiệm này, hệ sợi chủng nấm sinh trưởng tốt nhất trên nền môi trường PGA bổ sung cao nấm men, TĐTBHS đạt 16,53 mm/ngày. Trên các môi trường bổ sung $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl , peptone và NH_4NO_3 , hệ sợi chủng nấm sinh trưởng tương đối tốt, hệ sợi phát triển nhanh, gần như không có sự khác biệt rõ ràng giữa các môi trường, TĐTBHS lần lượt đạt 14,78 mm/ngày; 14,71 mm/ngày; 14,01 mm/ngày và 13,69 mm/ngày (Bảng 3).

Mật độ hệ sợi giữa các môi trường không có sự khác biệt rõ rệt. Trên tất cả các môi trường, hệ sợi chủng nấm Toc1 sinh trưởng nhanh, đồng đều. Tuy nhiên, trên môi trường bổ sung cao nấm men và $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, hệ sợi sinh trưởng tốt nhất, mật độ hệ sợi dày hơn các môi trường còn lại (Hình 2B). Như vậy, hệ sợi chủng nấm hoàng chi Toc1 sinh trưởng tốt trên tất cả các nguồn nitơ thí nghiệm, nhưng chúng sinh trưởng tốt nhất trên nền môi trường bổ sung cao nấm men với hàm lượng bổ sung 2 g/l.

Theo Elhami & cs. (2008), nitơ tác động lớn đến quá trình sinh trưởng hệ sợi, sự hình thành và phát triển quả thể nấm, đồng thời ảnh hưởng đến hàm lượng protein có trong nấm. Tuy nhiên, cũng giống như cacbon, sự ảnh hưởng của nitơ còn phụ thuộc vào chủng nấm, điều kiện và môi trường nuôi cấy (Itoo & Reshi, 2014). Woo-Sik Jo & cs. (2009) báo cáo rằng chiết xuất nấm men và chiết xuất mạch nha là hai nguồn nitơ thúc đẩy sự phát triển hệ sợi loài nấm *G. applanatum*, kết quả này không tương đồng với kết quả của Jeong & cs. (2005) khi cho rằng rượu ngâm ngô là nguồn nitơ tốt nhất đối với sinh trưởng hệ sợi nấm Linh chi *G. applanatum*.

3.4. Sinh trưởng hệ sợi chủng nấm hoàng chi Toc1 trên môi trường bổ sung nguồn muối khoáng khác nhau

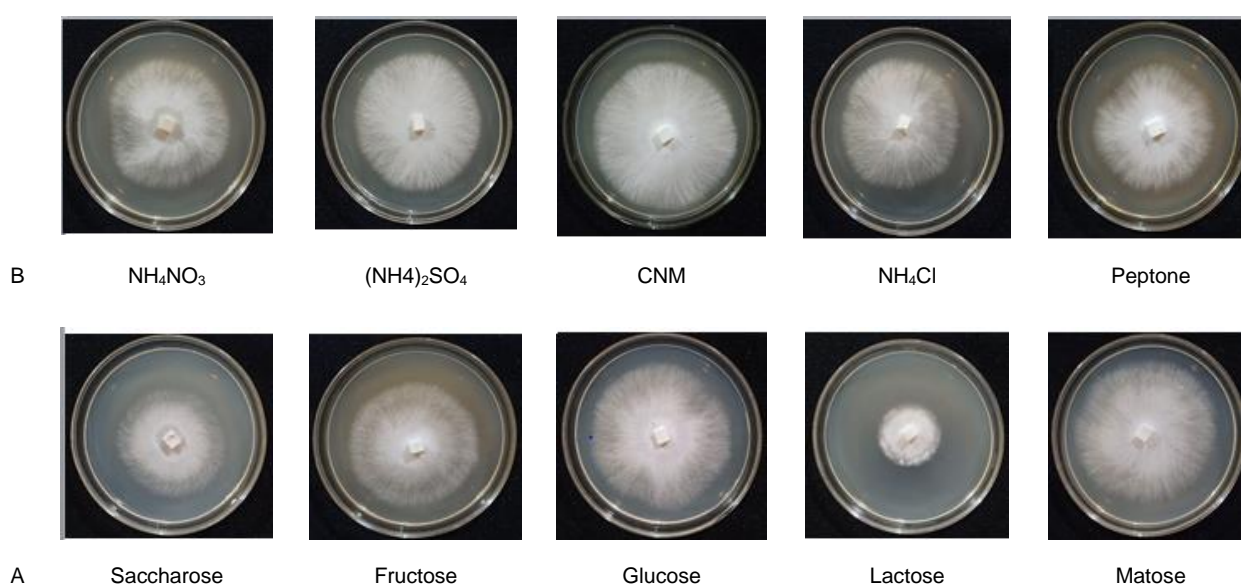
Trong 6 nguồn muối khoáng được sử dụng, hệ sợi chủng nấm hoàng chi Toc1 sinh trưởng nhanh và mạnh nhất trên môi trường bổ sung K_2HPO_4 , TĐTBHS ghi nhận được là 16,6 mm/ngày. Trong khi đó, trên các môi trường bổ sung MgSO_4 , KCl , KH_2PO_4 và KNO_3 , hệ sợi chủng nấm sinh trưởng khá nhanh, TĐTBHS lần lượt đạt 15,67 mm/ngày; 15,60 mm/ngày; 14,95 mm/ngày và 14,11 mm/ngày. Môi trường bổ sung NaNO_3 ghi nhận được TĐTBHS chậm nhất, đạt 13,78 mm/ngày.

Có sự khác biệt rõ ràng về sự phát triển hệ sợi và mật độ hệ sợi trên các môi trường muối khoáng khác nhau. So với 5 nguồn muối khoáng cùng nghiên cứu thì trên nền môi trường bổ sung K_2HPO_4 , hệ sợi chủng nấm hoàng chi sinh trưởng đồng đều, hệ sợi trắng mượt, mật độ hệ sợi dày hơn. Khi nuôi trên các môi trường bổ sung $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KCl , KH_2PO_4 và NaNO_3 hệ sợi chủng nấm không có sự khác biệt, hệ sợi sinh trưởng đồng đều, mật độ hệ sợi trung bình. Trong khi đó, khi bổ sung KNO_3 vào môi trường nuôi cấy, hệ sợi sinh trưởng nhanh nhưng yếu, mật độ hệ sợi thưa mỏng (Hình 3). Căn cứ vào kết quả về TĐTBHS và mật độ hệ sợi, có thể kết luận K_2HPO_4 là nguồn muối khoáng phù hợp nhất đối với sinh trưởng hệ sợi nấm hoàng chi Toc1.

Bên cạnh hai thành phần thiết yếu cấu tạo nên tế bào là cacbon và nitơ, vitamine cùng muối khoáng cũng đóng vai trò quan trọng trong quá trình sinh trưởng của hệ sợi nấm. Trên môi trường nền YM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 và NaCl là các loại muối khoáng rất tốt đối với sinh trưởng hệ sợi của nấm Linh chi *G. applanatum*, ngược lại $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ khi bổ sung vào môi trường nền lại gây ức chế hệ sợi (Woo-Sik & cs., 2009). Woo-Sik & cs. (2006) báo cáo rằng chủng nấm *Phellinus* spp. sinh trưởng tốt nhất khi môi trường nuôi cấy nền YM bổ sung $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, hoặc KH_2PO_4 , nhưng khi sử dụng $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, hệ sợi nấm không có dấu hiệu sinh trưởng. Kết quả của những nghiên cứu trên hoàn toàn phù hợp với khẳng định khả năng hấp thụ chất khoáng của hệ sợi phụ thuộc vào chủng loại và giai đoạn phát triển của chúng (Mallikarjuna & cs., 2013).

Bảng 3. Sinh trưởng hệ sợi chủng nấm hoàng chi Toc1 trên môi trường bổ sung nguồn nitơ khác nhau

Nguồn nitơ	ĐDHS sau 3 ngày (mm)	ĐDHS sau 6 ngày (mm)	TĐTBHS (mm/ngày)	Thời gian hệ sợi mọc kín (ngày)
Peptone	39,67	80,33	14,07	6,00
Cao nấm men	39,00	82,67	16,53	5,00
NH ₄ NO ₃	40,67	82,17	13,69	6,00
(NH ₄) ₂ SO ₄	36,40	83,17	14,78	5,67
NH ₄ Cl	41,17	82,67	14,71	5,67
CV%	10,20	2,60	10,00	9,70
LSD _{0,05}	7,56	4,08	2,78	1,03

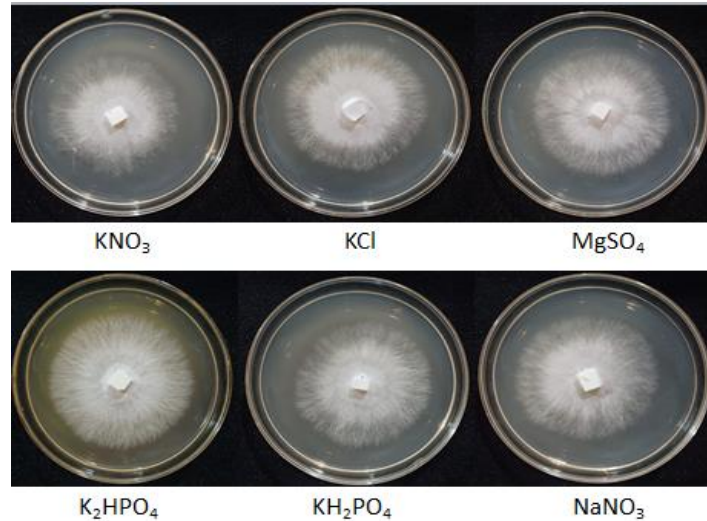


Hình 2. Ảnh hưởng của nguồn cacbon (A) và nguồn nitơ (B) đến sinh trưởng hệ sợi chủng nấm hoàng chi Toc1 sau 4 ngày cấy giống

Bảng 4. Ảnh hưởng của nguồn muối khoáng khác nhau đến sinh trưởng hệ sợi chủng nấm hoàng chi Toc1

Nguồn muối khoáng	ĐDHS sau 3 ngày (mm)	ĐDHS sau 6 ngày (mm)	TĐTBHS (mm/ngày)	Thời gian kín đĩa (ngày)
MgSO ₄ .7H ₂ O	43,33	83,00	15,67	5,33
K ₂ HPO ₄	45,00	83,33	16,60	5,00
KCl	47,17	82,57	15,60	5,33
NaNO ₃	43,83	82,67	13,78	6,00
KNO ₃	44,33	83,00	14,11	6,00
KH ₂ PO ₄	45,33	84,17	14,95	5,67
CV%	5,20	0,60	10,10	10,70
LSD _{0,05}	4,21	0,95	2,78	1,08

Nghiên cứu đặc điểm sinh trưởng hệ sợi và ảnh hưởng của tỷ lệ cám mạch đến sự hình thành, phát triển quả thể của nấm hoàng chi (*Tomophagus cattienensis*)



Hình 3. Sinh trưởng của hệ sợi chủng nấm hoàng chi Toc1 sau 4 ngày cấy giống trên môi trường bổ sung nguồn muối khoáng khác nhau

Bảng 5. Sinh trưởng của hệ sợi chủng nấm hoàng chi Toc1 trên cơ chất bổ sung tỷ lệ cám mạch khác nhau

CT	ĐDHS sau 7 ngày (mm)	ĐDHS sau 14 ngày (mm)	ĐDHS sau 21 ngày (mm)	ĐDHS sau 28 ngày (mm)	Thời gian kín bịch (ngày)	TĐTBHS (mm/ngày)
1	17,11	51,67	99,61	136,11	27,22	5,00
2	24,83	58,56	103,94	137,50	27,00	5,09
3	19,28	51,51	86,89	112,94	36,22	4,03
4	10,83	42,44	75,17	103,00	37,11	3,68
CV%	12,4	7,7	4,3	2,3	1,8	3,8
LSD _{0,05}	4,46	7,89	7,91	5,51	1,12	0,29

3.5. Ảnh hưởng của tỷ lệ cám mạch đến khả năng sinh trưởng và phát triển quả thể nấm hoàng chi Toc1

* Giai đoạn sinh trưởng của hệ sợi

Trong 4 công thức (CT) cơ chất nuôi trồng, hệ sợi chủng nấm sinh trưởng nhanh nhất trên cơ chất CT2 và CT1, TĐTBHS lần lượt đạt 5,09 mm/ngày và 5,00 mm/ngày. Khi bổ sung hàm lượng cám mạch cao hơn tương ứng 10% (CT3) và 15% (CT4), hệ sợi chủng nấm sinh trưởng chậm lại, TĐTBHS lần lượt ghi nhận được là 4,03 mm/ngày và 3,68 mm/ngày (Bảng 5).

Mật độ hệ sợi giữa các CT có sự sai khác ở giai đoạn đầu sinh trưởng. Kết quả ghi nhận cho thấy trên nền cơ chất bổ sung tỷ lệ cám mạch thấp (0% và 5%), hệ sợi sinh trưởng nhanh

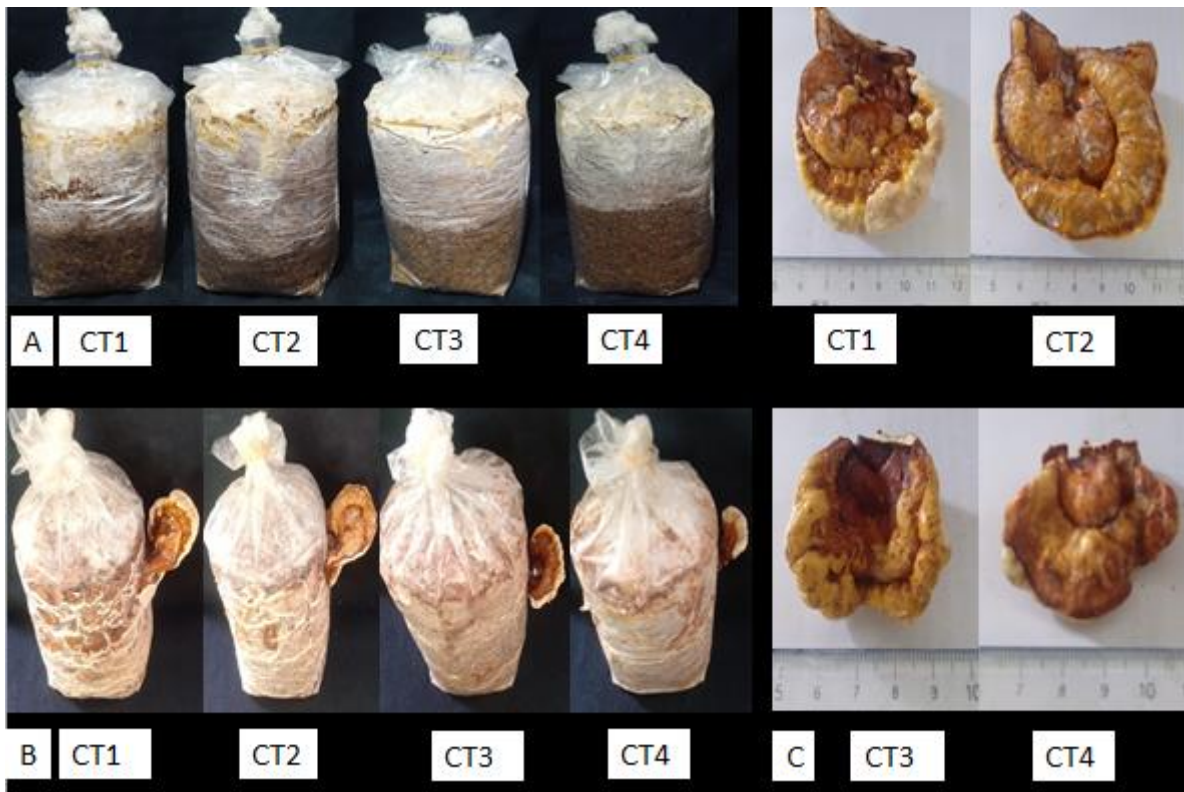
nhưng mảnh. Ngược lại, khi nuôi cấy trên các cơ chất bổ sung nhiều cám mạch (10% và 15%), hệ sợi sinh trưởng dày nhưng tốc độ sinh trưởng chậm. Tuy nhiên, đến giai đoạn sau, khi hệ sợi phát triển qua 1/3 bịch, dường như không quan sát rõ sự khác biệt về mật độ hệ sợi giữa các CT (Hình 4A). Như vậy, trong giai đoạn sinh trưởng hệ sợi, tỷ lệ cám mạch làm cho mật độ hệ sợi và TĐTBHS có tương quan tỷ lệ nghịch với nhau.

Rõ ràng, hàm lượng cám mạch trong cơ chất có ảnh hưởng đến TĐTBHS. Việc bổ sung cám mạch vào cơ chất nuôi trồng làm tăng hàm lượng nitơ trong cơ chất, thúc đẩy quá trình sinh tổng hợp protein và enzyme thuận lợi hơn (Nguyễn Thị Huyền Trang & cs., 2022). Tuy nhiên, nếu hàm lượng nitơ quá cao có thể gây ức chế sự sinh trưởng hệ sợi (Singer & cs., 2011) và giảm hiệu suất nấm (Fanadzo & cs., 2010).

Bảng 6. Chỉ tiêu quả thể nấm hoàng chi Toc1 thu được trên các công thức cơ chất khác nhau

CT	TGXHQT (ngày)	TGTHQT (ngày)	KLTBQT (g)	ĐKMQT (mm)	HSSH (%)
1	35,80	85,40	56,50	59,80	14,87
2	35,50	85,80	60,70	63,30	15,97
3	45,30	100,10	31,00	42,70	8,16
4	52,80	114,10	29,80	40,10	7,84
LSD _{0,05}	0,91	1,68	4,24	3,95	1,12
CV%	2,3	1,9	10,4	7,6	10,4

Ghi chú: CT: Công thức; ĐDHS: Độ dài hệ sợi nấm mọc được; TĐTBHS: Tốc độ trung bình hệ sợi; TGXHQT: Thời gian xuất hiện quả thể; TGTHQT: Thời gian thu hái quả thể; KLTBQT: Khối lượng trung bình quả thể; ĐKMQT: Đường kính mũ quả thể; HSSH: Hiệu suất sinh học.



Hình 4. Hệ sợi (A), hình thái quả thể sau 85 ngày (B) và kích thước quả thể (C) của nấm hoàng chi Toc1 trên các công thức nuôi trồng khác nhau

* Giai đoạn hình thành và phát triển quả thể

Tỷ lệ cám mạch bổ sung vào cơ chất nuôi trồng không chỉ tác động đến sinh trưởng hệ sợi mà còn tác động đến quá trình hình thành quả thể cũng như kích thước và hiệu suất nấm thu được. Trong 4 CT nghiên cứu, CT2 và CT1 cho kết quả TGXHQT nhanh nhất, lần lượt ghi nhận là 35,50 và 35,80 ngày, tiếp sau đó là CT3

(45,30 ngày), cuối cùng CT4 có TGXHQT chậm nhất, sau 52,80 ngày. Tương tự như thế, TGTHQT giữa các CT cũng khác nhau rõ rệt. Nếu như CT1 và CT2 có TGTHQT trung bình là 85 ngày thì TGTHQT của CT3 là 100,10 ngày, CT4 là 114,10 ngày. Như vậy, cơ chất nuôi trồng được bổ sung tỷ lệ cám mạch càng lớn, TGXHQT và TGTHQT sẽ càng kéo dài.

Nghiên cứu đặc điểm sinh trưởng hệ sợi và ảnh hưởng của tỷ lệ cám mạch đến sự hình thành, phát triển quả thể của nấm hoàng chi (*Tomophagus cattienensis*)

CT2 cho thấy kết quả tốt nhất về HSSH, KLTBQT và ĐKMQT, lần lượt đạt 15,97%; 60,70g và 63,30mm. Theo sau đó là CT1 với kết quả về HSSH, KLTBQT, ĐKMQT đạt lần lượt là 14,87%; 56,50g và 59,80mm. HSSH và kích thước quả thể nấm đạt thấp nhất trên CT4 với kết quả ghi nhận được HSSH (7,84%), KLTBQT (29,80g), ĐKMQT (40,10mm). Như vậy, hàm lượng cám mạch bổ sung càng nhiều, hiệu suất nấm cũng như kích thước quả thể thu được càng thấp. Nguyên nhân có thể do hàm lượng cám mạch cao gây ra sự mất cân bằng dinh dưỡng giữa các yếu tố cacbon và nitơ trong cơ chất. Sự sinh trưởng và phát triển của hệ sợi nấm phụ thuộc vào tỷ lệ C/N trong cơ chất (Narain & cs., 2008). Theo Nguyễn Thị Huyền Trang & cs. (2022), việc bổ sung hàm lượng cám mạch khác nhau dẫn đến hàm lượng nitơ trong cơ chất khác nhau và làm cho tỷ lệ C/N giữa các cơ chất cũng khác nhau.

4. KẾT LUẬN

Môi trường dinh dưỡng và điều kiện nuôi cấy có tác động lớn đến sinh trưởng hệ sợi của nấm hoàng chi Toc1. Nghiên cứu đã chỉ ra nhiệt độ tối ưu để hệ sợi nấm hoàng chi sinh trưởng là $25^{\circ}\text{C} \pm 1$. Glucose, cao nấm men và K_2HPO_4 lần lượt là những nguồn cacbon, nitơ và muối khoáng thích hợp nhất đối với sự phát triển của hệ sợi chủng nấm. Cơ chất nền nuôi trồng gồm 89% mùn cưa + 5% bột ngô + 1% CaCO_3 bổ sung 5% cám mạch thu được hiệu suất sinh học nấm cao nhất đạt 15,97%.

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành bài báo, nhóm nghiên cứu trân trọng cảm ơn TS. Lê Xuân Thám đã cung cấp nguồn gen chủng nấm hoàng chi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Andrew L. Loyd, Eric R. Linder, Matthew E. Smith, Robert A. Blanchette & Jason A. Smith (2019). Cultural characterization and chlamydospore function of the *Ganodermataceae* present in the eastern United States. *Mycologia*. 111(1): 1-12. doi: 10.1080/00275514.2018.1543509.

Bui Thi Thu Hien, Le Thi Phuong Hoa, Le Xuan Tham & Dang Ngoc Quang (2013). Cattienoids A-C, three novel steroids from the mushroom *Tomophagus cattienensis*. *Fitoterapia*. 9: 125-127. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2013.08.020>

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.

Elhami B., Ansari N.A. & Dehcordie F.S. (2008). Effect of substrate type, different level of nitrogen and maganese on growth and development of oyster mushroom (*Pleurotus florida*). *Dyn. Biochem. Process Biotechnol. Mol. Biol.* 2(1): 34-37.

Fanadzo M., Zireva D.T., Dube E. & Mashingaidze A.B. (2010). Evaluation of various substrates and supplements for biological efficiency of *Pleurotus sajor-caju* and *Pleurotus ostreatus*. *African Journal of Biotechnology*. 9(19): 2756-2761

George G. Songulashvili, Vladimir Elisashvili, Solomon P. Wasser, Yitzhak Hadar & Eviatar Nevo (2008). Effect of the cacbon 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. (Aphylllophoromycetidae). *International Journal of Medicinal mushrooms*. 10(1): 79-86.

Ian Fletcher, Aisha Freer, Ash Ahmed & Pauline Fitzgerald. (2019). Effect of temperature and growth media on mycelium growth of *Pleurotus ostreatus* and *Ganoderma Lucidum* strains. *Cohesive Journal of Microbiology and infectious disease*.

Ito Z.A. & Reshi Z.A. (2014). Effect of different nitrogen and carbon sources and concentrations on the mycelial growth of ectomycorrhizal fungi under *in-vitro* conditions. *Scandinavian Journal of Forest Research*. 29(7): 619-628.

Jeong Y.T., Yang B.K., Jeong S.C., Gu Y.A., Kim G.N., Jeong H. & Song C.H. (2005). "Optimum conditions for the mycelial growth and exo-biopolymer production by a submerged culture of *Elfvigia applanata*". *Korean J Mycol News Letter*. 17: 97.

Le Xuan Tham, Quoc Hung Nguyen Le, Ngoc Duong Pham, Van Hop Duong, Dentinger B.T.M. & Moncalvo J.M. (2012). *Tomophagus cattienensis* sp. nov., a new Ganodermataceae species from Vietnam: Evidence from morphology and ITS DNA barcodes. *Mycological Progress*. 11(3): 777.

Mallikarjuna S.E, Ranjini A, Haware D.J, Vijaylakshmi M.R, Shashirekha M.N. & Rajarathnam S. (2013).

- Mineral composition of four edible mushrooms. *Journal of chemistry*. pp. 1-5
- Miles P.G. & Chang S.T. (1997). Mushroom biology: Concise basics and current developments. In P.G. Miles (Ed.), *Mushroom biology: Concise basics and current developments*. World scientific publishing company.
- Murrill WA. (1905). *Tomophagus* for *Dendrophagus*. *Torrea*. 5: 197
- Narain R., Sahu R., Kumar K.S., Garg S.K., Singh C.S. & Kanaujia R.S. (2008). Influence of different nitrogen rich supplements during cultivation of *Pleurotus florida* on maize cobs substrate. *Environmentalist*. 29: 1-7.
- Nguyen B.T.T., Van Le V., Nguyen H.T.T., Nguyen L.T., Tran T.T.T. & Ngo N.X. (2021b). Nutritional requirements for the enhanced mycelial growth and yield performance of *Trametes versicolor*. *J. Appl. Biol. Biotechnol.* 9: 1-7. doi.org/10.7324/JABB.2021.9101.
- Nguyễn Thị Huyền Trang, Lê Văn Vè, Phan Thị Huyền Trang, Nguyễn Thị Luyện, Ngô Xuân Nghiễn & Nguyễn Thị Bích Thùy (2022). Sinh trưởng của hệ sợi và phát triển của 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.
- Singer B., Moonmoon M., Jahan N., Khan A., Uddin N., Hossain K., Tania M. & Ahmed S. (2011). Effects of different levels of wheat bran, rice bran, and maize powder supplementation with sawdust on the production of shiitake mushroom. *Saudi Journal of Biological sciences*. 18(4): 323-328.
- Trịnh Tam Kiệt (2012). *Nấm lớn ở Việt Nam (Tập 2)*. Nhà xuất bản Khoa học tự nhiên và Công nghệ.
- Woo-Sik Jo, Young-Hyun Rew, Sung-Guk Choi, Geon-Sik Seo, Jae-Mo Sung & Jae-Youl Uhm. (2006). The culture conditions for the mycelial growth of *Phellinus* spp. *Mycobiology*. 34(4): 200-205.
- Woo-Sik Jo, Yun-Ju Cho, Doo-Hyun 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
- Zadrazil F. (1976). The ecology and industrial production of *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus florida*, *Pleurotus cornucopiae*, and *Pleurotus eryngii*. *Mushroom Sci.* 9: 621-652.