

## CẢI THIỆN NĂNG SUẤT, CHẤT LƯỢNG GIỐNG NẤM LINH CHI (*Ganoderma* spp.) BẰNG PHƯƠNG PHÁP GÂY ĐỘT BIẾN SỬ DỤNG TIA GAMMA (Cobalt 60)

Nguyễn Thị Giang\*, Phạm Xuân Hội, Nguyễn Thị Hồng Hải, Nguyễn Thị Hằng

*Viện Di truyền Nông nghiệp*

\*Tác giả liên hệ: huonggiang\_234@yahoo.com

Ngày nhận bài: 14.09.2023

Ngày chấp nhận đăng: 25.12.2023

### TÓM TẮT

Nhằm cải tiến năng suất và chất lượng nấm Linh chi nuôi trồng tại Việt Nam, một số giống nấm Linh chi DT, D18 và D20 được chiếu xạ tia gamma (Co60) trên sợi nấm ở các liều chiếu xạ 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,5 và 2kGy. Kết quả đã chọn lọc được 05 chủng nấm Linh chi đột biến là DTL<sub>0,5</sub>; DTL<sub>0,75</sub>; DTL<sub>1</sub>; DTL<sub>1,25</sub> và D18L<sub>0,75</sub> có khả năng sinh trưởng hệ sợi khỏe, thời gian hình thành quả thể và thời gian thu hoạch sớm; năng suất nấm khô tăng từ 13-16% so với bố mẹ ban đầu; trong đó có 03 chủng là DTL<sub>0,75</sub>; DTL<sub>1</sub>; DTL<sub>1,25</sub> có hàm lượng polysaccharide tổng số và 02 chủng là DTL<sub>1,25</sub> và D18L<sub>0,75</sub> có hàm lượng triterpenoid cao hơn so với chủng ban đầu. Kết quả nghiên cứu cho thấy cường độ chiếu xạ có ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng sinh trưởng, phát triển cũng như hoạt chất dược liệu của các chủng đột biến, cụ thể liều chiếu từ 0,5-1,25kGray có tác dụng tích cực trong việc cải thiện khả năng sinh trưởng, năng suất và chất lượng của các giống nấm Linh chi; còn khi liều chiếu  $\geq 1.5$ kGray không có lợi cho sự phát triển hệ sợi của các chủng nấm Linh chi.

Từ khóa: Linh chi, chiếu xạ, tia gamma, polysaccharide, triterpenoid.

### Improvement the Yield and Quality of Lingzhi (*Ganoderma* spp.) by Mutation using Gamma Ray (Cobalt 60)

### ABSTRACT

In this work, in order to improve the yield and quality of *Ganoderma lingzhis* in Vietnam, three lingzhi varieties, DT, D18 and D20, were irradiated with gamma rays (<sup>60</sup>Co) on the mycelium at different doses (0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5 and 2kGy). The evaluation results selected five mutant strains DTL<sub>0,5</sub>; DTL<sub>0,75</sub>; DTL<sub>1</sub>; DTL<sub>1,25</sub> and D18L<sub>0,75</sub>, these strains showed strong mycelium, early fruiting body formation, and early harvest maturity and dry mushroom yield increased by 13-16% compared to the control. The polysaccharide content of DTL<sub>0,75</sub>; DTL<sub>1</sub>; DTL<sub>1,25</sub> and the triterpenoid content of DTL<sub>1,25</sub> and D18L<sub>0,75</sub> were considerably higher than the parental strains. The results indicated that the irradiation intensity had significantly effect on the development as well as the active pharmaceutical ingredients of the mutant strains, specifically, the irradiation doses from 0.5-1.25kGray had a positive effect growth, productivity and quality of mutant strains; and irradiation dose  $\geq 1.5$ kGray is not beneficial for the mycelial development of mutant strains.

Keywords: Lingzhi (*Ganoderma lucidum*), irradiation, gamma ray, polysaccharide, triterpenoid.

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nấm Linh chi (*Ganoderma* spp.) được coi là vị vua của các loại thảo mộc và được sử dụng như một vị thuốc y học cổ truyền trong nhiều thế kỷ. Do sự hiện diện của các hợp chất hoạt tính sinh học có giá trị lớn trong y học như terpenoids, polyphenol, sesquiterpen, alkaloids,

lactones, sterol, glycoprotein và polysaccharide mà nấm Linh chi được sử dụng như chất chống ung thư, thuốc kháng virus, thuốc bảo vệ gan, thuốc tăng cường miễn dịch và thuốc hạ đường huyết... (El-Ramady & cs., 2022). Chính vì thế, trong nhiều thập kỷ qua, nấm Linh chi đã thu hút rất nhiều nghiên cứu thuộc các lĩnh vực như hóa sinh; di truyền học và sinh học phân tử; khoa

Cải thiện năng suất, chất lượng giống nấm Linh chi (*Ganoderma* spp.) bằng phương pháp gây đột biến sử dụng tia gamma (Cobalt 60)

học sinh học nông nghiệp; dược học, độc dược học, dược phẩm và y học (El Sheikha, 2022).

Chọn giống đột biến là một trong những phương pháp hiệu quả nhất và được sử dụng rộng rãi để cải tiến cây trồng, đồng thời đóng một vai trò quan trọng trong nông nghiệp, đặc biệt là trong sản xuất cây lương thực (Liu & cs., 2004). Trong các tác nhân gây đột biến thì chiếu xạ bằng tia Gamma (Cobalt-60) có hiệu quả tạo đột biến cao. Tia gamma là một bức xạ ion hóa hiệu quả, có khả năng thâm nhập tốt hơn vào tế bào vách sợi nấm và các tế bào đích. Đây là một loại bức xạ điện từ hay quang tử có tần số cực cao. Do có năng lượng cao nên tia gamma có khả năng ion hóa mạnh trong môi trường vật chất. Để phát triển các giống nấm mới với tính trạng chất lượng và năng suất tốt hơn, đột biến do chiếu xạ gamma là một trong những các phương pháp thuận tiện và rất hiệu quả (Esser, 1971).

Trong những năm qua, cùng với sự phát triển của khoa học kỹ thuật, công nghệ nhân giống và nuôi trồng nấm Linh chi ở nước ta đã có những bước tiến nhất định. Tuy nhiên, do quá trình khai thác giống nấm Linh chi trong thời gian dài đã làm ảnh hưởng đến sức sinh trưởng, khả năng chống chịu và xuất hiện hiện tượng thoái hóa giống. Cho đến nay, công tác chọn tạo giống để thu được các chủng giống linh chi với nhiều tính trạng ưu việt (năng suất cao, giá trị dược liệu tốt, thích nghi và phát triển ở nhiều vùng sinh thái, trong các điều kiện bất thuận...) vẫn còn nhiều hạn chế và chưa đạt được những kết quả đáng kể. Với mục tiêu tạo ra các biến dị mới nhằm cải tiến năng suất và chất lượng nấm Linh chi, Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Nấm đã tiến hành gây đột biến bằng phương pháp chiếu xạ tia gamma (Co60) trên hệ sợi nấm của một số giống nấm Linh chi đang nuôi trồng tại Việt Nam nhằm chọn tạo được những chủng nấm Linh chi cho năng suất cao, ổn định và chất lượng tốt để đưa vào sản xuất.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu

Các giống nấm Linh chi được sử dụng làm vật liệu ban đầu trong nghiên cứu này là chủng

DT, D18 và D20 hiện đang được lưu giữ tại Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Nấm, Viện Di truyền Nông nghiệp. Trong đó:

Giống DT là giống nấm bản địa được thu thập tại Quảng Ninh từ năm 2002, đã được công nhận giống chính thức và đưa vào sản xuất từ năm 2012, tuy nhiên do quá trình lưu giữ, khai thác và sử dụng, sinh lực và đặc tính của giống đã dần bị thoái hóa, năng suất giảm rõ rệt.

Chủng giống D20 được thu thập tại Bắc Giang và chủng giống D18 thu thập tại Quảng Nam, cả hai chủng giống này được nuôi trồng tại một số cơ sở sản xuất tuy nhiên năng suất nấm khô không ổn định, năng suất có xu hướng giảm.

Giống đối chứng sử dụng trong nghiên cứu này là giống bố mẹ chưa qua xử lý đột biến bởi tia gamma, kí hiệu là  $L_{0(d/e)}$ .

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

\* *Chuẩn bị môi trường PDA*: 200g khoai tây gọt vỏ rửa sạch cắt nhỏ cho vào nồi, bổ sung 500ml nước, đun sôi (10-15 phút) đến khi khoai nhừ nhưng không bị nát là được, lọc lấy dịch chiết. Cho 20g agar vào dịch đã lọc, vừa cho agar vừa khuấy đều hỗn hợp để agar tan đều, không bị vón cục, sau đó đun cho tan agar. Hòa tan 20g đường destrose vào 200ml nước khuấy tan hoàn toàn và đổ vào môi trường đang sôi. Bổ sung thêm nước cho đủ 1l. Để môi trường sôi lại 1-2 phút, sau đó đổ môi trường đã chuẩn bị vào 03 bình tam giác dung tích 500ml (mỗi bình chứa khoảng 330ml môi trường); nút bông lại và bọc giấy bạc kín trước khi đem hấp khử trùng ở chế độ 121°C trong vòng 60 phút. Môi trường sau đó để nguội trong hộp vô trùng, khi nhiệt độ xuống còn 55-60°C thì tiến hành đổ môi trường ra đĩa petri, mỗi đĩa đổ khoảng 15ml.

\* *Chuẩn bị mẫu để chiếu xạ* (Áp dụng theo phương pháp của Sermkiattipong & cs. (2014) có chút cải tiến):

Tùng chủng nấm Linh chi DT, D20, D18 được nuôi cấy trên môi trường PDA (200g khoai tây + 20g đường destrose + 20g thạch agar) ở 28°C trong 7-10 ngày. Thu sợi nấm trên bề mặt đĩa và cho vào ống tube chứa 15ml hỗn hợp dung dịch gồm 0,01% Tween 20 và 0,85% NaCl.

Các sợi nấm lơ lửng trong dung dịch được đồng nhất hóa 3 lần trong 1 phút để cắt thành các mảnh nhỏ. Sau đó, các mảnh nhỏ được lắc đều sử dụng máy vortex và chuyển vào 6 ống nghiệm. Mỗi ống nghiệm chứa 2,5ml mảnh sợi nấm lơ lửng và được đặt vào giá nhôm để gửi đi chiếu xạ. Tác nhân gây đột biến: Tia gamma A (Co - 60) (Gamma cell-220) tại trung tâm chiếu xạ Hà Nội được sử dụng cho nghiên cứu này. Tỷ lệ liều lượng chiếu được xác định bằng liều kế gamma chrome và phim chứa nhiễm sắc thể phóng xạ là 11,52 kilôgray trên giờ (kGy/hr). Các liều dùng để gây đột biến là 0; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,5 và 2kGy.

*\* Phân lập các chủng đột biến*

Hệ sợi nấm sau khi chiếu xạ được pha loãng 1/4 trong hỗn hợp 10ml dung dịch gồm 0,01% Tween 20 và 0,85% NaCl. Hút 0,1ml dung dịch sau khi pha loãng và trang đều trên đĩa môi trường PGA (dịch chiết từ 200g khoai tây + 20g đường Glucose + 20g thạch agar), đem nuôi ở 28°C từ 7-10 ngày. Tiến hành theo dõi hình thái khuẩn lạc, đánh giá đặc điểm sinh trưởng của hệ sợi nấm sau khi chiếu xạ trên môi trường PGA.

*\* Phương pháp đánh giá sự hình thành và phát triển quả thể*

- Chuẩn bị giống Linh chi trên hạt: Các chủng nấm Linh chi đột biến sau 7-10 ngày cấy trên môi trường PGA, sinh trưởng khỏe, không bị nhiễm sẽ được cấy chuyển nuôi trên chai môi trường thóc cấp 2 (khối lượng 300 g/chai; với tỷ lệ phối trộn: 99% thóc hạt + 1% bột CaCO<sub>3</sub>), nhiệt độ nuôi 26 ± 1°C, thời gian nuôi là 15-17 ngày.

- Chuẩn bị bịch nuôi trồng: Mùn cưa sau khi được đảo ủ khoảng 15 ngày sẽ được bổ sung thêm dinh dưỡng và bột nhẹ theo tỷ lệ phối trộn: 79% mùn cưa + 10% cám gạo + 10% cám ngô + 1% bột CaCO<sub>3</sub>; độ ẩm nguyên liệu đạt: 60-65% và đóng vào túi kích thước 19 × 37cm sao cho trọng lượng túi đạt 1,4kg đưa vào hấp khử trùng ở nhiệt độ 100°C trong thời gian là 6 giờ. Bịch nguyên liệu sau khi hấp, để nguội rồi tiến hành cấy giống, sử dụng giống linh chi trên hạt với lượng 15g cho 1 bịch nguyên liệu.

- Ươm bịch nuôi sợi nấm: Chuyển nhẹ nhàng các bịch nấm đã cấy giống nấm vào nhà

ươm (Nhà ươm phải đảm bảo sạch sẽ, thông thoáng, độ ẩm từ 62-65%, ánh sáng yếu hoặc không cần ánh sáng, ở nhiệt độ 25 ± 11°C, có giàn để xếp bịch) và đặt bịch lên giàn nuôi, miệng bịch lên phía trên hoặc treo bịch sao cho miệng bịch quay ngang. Khoảng cách giữa các bịch từ 2-3cm. Giữa các giàn nuôi có lối đi để kiểm tra. Sau khoảng 20 ngày khi sợi nấm mọc khoảng 2/3 bịch cơ chất, có sự hình thành quả thể ở miệng nút bông cần tiến hành nối nút bông ở cổ nút chỉ để lại 1/5 lượng bông nút ban đầu cho nấm mọc qua cổ nút. Trong quá trình sợi nấm phát triển nếu thấy có bịch nấm bị nhiễm cần phải loại bỏ ngay khỏi khu vực ươm tránh lây sang các bịch khác.

- Chăm sóc, thu hái: Nhà trồng nấm phải đảm bảo sạch sẽ thông thoáng, nhiệt độ từ 23-26°C, độ ẩm không khí đạt 80-85%, nồng độ CO<sub>2</sub> ≤ 0,1% và ánh sáng khuếch tán (200-500lux) và chiếu đều từ mọi phía. Tưới phun sương nhẹ vào mặt trên mũ quả thể mỗi ngày từ 1-3 lần để đảm bảo độ ẩm không khí luôn đạt 80-85%. Chế độ chăm sóc như trên được duy trì liên tục cho đến khi viên trắng trên vành mũ quả thể không còn nữa. Tiến hành thu hái nấm khi màu sắc mũ nấm và chân nấm có màu đồng nhất (màu nâu bóng).

*\* Phương pháp đánh giá chỉ tiêu chất lượng quả thể nấm*

- Đánh giá cảm quan: Sử dụng phép thử so sánh cặp đôi để đánh giá mức độ khác biệt (về màu sắc, mùi vị, trạng thái...) giữa các mẫu để đánh chất lượng thành phẩm.

- Hàm lượng polysaccharide tổng số và hàm lượng triterpenoid có trong quả thể nấm Linh chi được định lượng theo phương pháp thử KN/QTKT/10.6 và KN/QTPTNL/T.4 của Viện Thực phẩm Chức năng.

### 2.3. Các chỉ tiêu theo dõi

Đường kính khuẩn lạc (cm) là phân đường kính hệ sợi nấm mọc trên bề mặt môi trường thạch sau 2, 4, 6 ngày nuôi sợi.

Tốc độ sinh trưởng của hệ sợi được tính theo công thức:  $V = D/T$ , trong đó V là tốc độ sinh trưởng của sợi (mm/ngày), D là đường kính hệ

sợi nấm (mm) và T là thời gian sợi nấm sinh trưởng (ngày). Thời gian sinh trưởng của sợi nấm (ngày) được xác định là thời gian cần thiết để sợi nấm sinh trưởng trên khắp bề mặt môi trường hoặc túi giống (Bich Thuy Thi Nguyen & cs., 2019).

Mật độ hệ sợi: Là mức độ phân bố của hệ sợi trên môi trường nhân giống/giá thể nhiều hay ít. Mật độ hệ sợi nấm được quan sát và đánh giá cho điểm theo thang điểm của Dakin & cs. (1990) như sau: -) Hệ sợi không phát triển; +) Hệ sợi mỏng; ++) Hệ sợi trung bình; +++) Hệ sợi dày.

Thời gian hình thành quả thể được tính từ khi cấy giống đến khi mầm quả thể nấm bắt đầu xuất hiện (ngày).

Thời gian thu hoạch quả thể được tính từ khi cấy giống đến khi thu hoạch quả thể nấm (ngày).

Năng suất nấm khô: Số kilogam nấm khô/tấn nguyên liệu khô (kg/tấn nguyên liệu khô).

## 2.4. Phân tích và xử lý số liệu

Số liệu nghiên cứu được phân tích, xử lý dựa trên nền các phần mềm Excel 2013 và phần mềm Graph prism 9.0. Phân tích giá trị thống kê theo ANOVA và các giá trị trung bình được so sánh bằng LSD ở mức ý nghĩa bằng 0,05.

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Ảnh hưởng của chiếu xạ tia gamma đến sinh trưởng hệ sợi của các chủng nấm Linh chi trên môi trường PGA

Tốc độ mọc sợi của mỗi chủng nấm phụ thuộc vào nhiều yếu tố như dinh dưỡng, nhiệt độ, ánh sáng, độ ẩm, pH... (Nguyen & cs., 2019).

Từ kết quả bảng 1 có thể thấy cường độ chiếu xạ ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng sinh trưởng hệ sợi của các chủng nấm Linh chi đột biến. Một số liều chiếu xạ đã kích thích hệ sợi chủng đột biến sinh trưởng tốt hơn hệ sợi của giống đối chứng, cụ thể: sau 7 ngày cấy đường kính khuẩn lạc của chủng D18L<sub>0,25</sub> đạt 7,23cm, của chủng D20L<sub>0,25</sub> đạt 8,73cm và của hai chủng đột biến DTL<sub>0,75</sub> và DTL<sub>1</sub> lần lượt là 8,83 và 8,6cm đều vượt so với đường kính khuẩn lạc của giống

đối chứng. Mật độ hệ sợi của các chủng đột biến này dày tương đương so với mật độ hệ sợi của giống đối chứng. Bên cạnh một số liều chiếu có ảnh hưởng tích cực đến sinh trưởng hệ sợi nấm thì ở một số liều chiếu như L<sub>0,5</sub> đối với các chủng đột biến là D18L<sub>0,5</sub>; DTL<sub>0,5</sub> có đường kính khuẩn lạc lần lượt là 2,75cm và 4,17cm nhỏ hơn so với đường kính các chủng ở liều chiếu liền kề (D18L<sub>0,25</sub>; D18L<sub>0,75</sub> và DTL<sub>0,25</sub>; DTL<sub>0,75</sub>), điều này có thể lý giải là do kỹ thuật gây đột biến thường rất ngẫu nhiên với nhiều vị trí bị đột biến không được kiểm soát (Dong & cs., 2022), thêm vào đó tế bào sợi nấm lại được cấu tạo bởi các túi tiết nhiều loại enzyme hỗ trợ cho sự phát triển ở đầu sợi nấm (Anitha, 1998), mà tia gamma lại có khả năng ion hóa mạnh, có thể phá vỡ cấu trúc của phân tử DNA, làm chết tế bào ở các vị trí hoàn toàn ngẫu nhiên (Esser, 1971). Tất cả những điều này có thể là nguyên nhân dẫn đến sự ảnh hưởng của nó ở các liều chiếu khác nhau đối với hệ sợi nấm Linh chi cũng hoàn toàn ngẫu nhiên. Cũng chính vì điều này mà khi liều lượng chiếu xạ  $\geq 1,5\text{kGy}$ , hệ sợi của các chủng nấm được chiếu xạ sinh trưởng kém hoặc không sinh trưởng. Từ kết quả nghiên cứu có thể thấy, cường độ chiếu xạ càng cao càng không có lợi cho sự phát triển hệ sợi của các chủng nấm Linh chi (Hình 1).

Từ kết quả đánh giá khả năng sinh trưởng hệ sợi của các chủng linh chi đột biến trên môi trường nhân giống cơ bản PGA, 10 chủng đột biến gồm D18L<sub>0,25</sub>; D18L<sub>0,75</sub>; D20L<sub>0,25</sub>; D20L<sub>0,5</sub>; D20L<sub>0,75</sub>; DTL<sub>0,25</sub>; DTL<sub>0,5</sub>; DTL<sub>0,75</sub>; DTL<sub>1</sub>; DTL<sub>1,25</sub> mặc dù khả năng sinh trưởng hệ sợi không có sự sai khác nhiều so với đối chứng, nhưng chúng đều có mật độ sợi dày, hệ sợi nấm trắng mịn nên cả 10 chủng đột biến này sẽ tiếp tục được chọn để đánh giá khả năng hình thành và phát triển quả thể trong giai đoạn nuôi trồng.

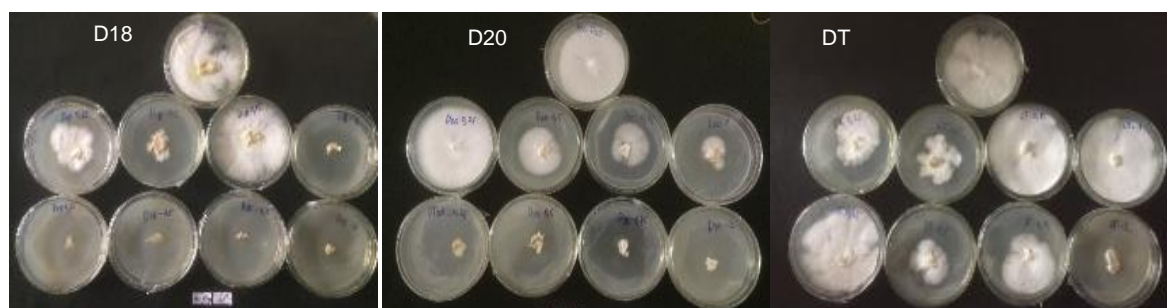
### 3.2. Kết quả đánh giá khả năng hình thành và phát triển quả thể của các chủng nấm Linh chi đột biến trên giá thể nuôi trồng

10 chủng linh chi đột biến gồm D18L<sub>0,25</sub>; D18L<sub>0,75</sub>; D20L<sub>0,25</sub>; D20L<sub>0,5</sub>; D20L<sub>0,75</sub>; DTL<sub>0,25</sub>; DTL<sub>0,5</sub>; DTL<sub>0,75</sub>; DTL<sub>1</sub>; DTL<sub>1,25</sub> được nuôi trồng trên giá thể mùn cưa có bổ sung 10% dinh dưỡng. Tốc độ mọc sợi được ghi nhận ở hình 2 cho thấy:

**Bảng 1. Sinh trưởng hệ sợi của các chủng linh chi đột biến trên môi trường PGA sau 7 ngày**

Liều chiếu xạ	D18		D20		DT	
	Đường kính khuẩn lạc (cm)	Mật độ hệ sợi	Đường kính khuẩn lạc (cm)	Mật độ hệ sợi	Đường kính khuẩn lạc (cm)	Mật độ hệ sợi
L0 <sub>D/C</sub>	6,63	+++	8,63	+++	8,43	+++
L0,25	6,07	+++	8,73	+++	5,26	+++
L0,5	2,75	+	5,90	+++	4,17	+++
L0,75	7,23	+++	5,26	+++	8,83	+++
L1,0	1,20	-	4,16	+++	8,60	+++
L1,25	1,07	-	2,43	++	7,87	+++
L1,5	1,03	-	1,27	-	2,90	++
L1,75	1,03	-	1,30	-	4,63	+++
L2,0	1,07	-	1,23	-	2,67	++
CV(%)	1,7		1,2		1,10	
LSD0,05	0,10		0,10		0,12	

Ghi chú: - : Sợi nấm không phát triển; + : Sợi nấm phát triển kém; ++ : Sợi nấm phát triển bình thường; +++ : Sợi nấm phát triển tốt.



**Hình 1. Hình thái khuẩn lạc của các chủng linh chi đột biến ở các liều chiếu khác nhau sau 7 ngày**

Các chủng đột biến từ giống linh chi DT là DTL<sub>0,5</sub>; DTL<sub>1</sub>; DTL<sub>1,25</sub> có tốc độ sinh trưởng hệ sợi lần lượt là 9,62; 9,0 và 9,22 mm/ngày nhanh hơn tốc độ sinh trưởng hệ sợi của giống đối chứng DT (8,74 mm/ngày), chủng có tốc độ sinh trưởng chậm nhất là DTL<sub>0,75</sub> chỉ đạt 6,30 mm/ngày; hệ sợi của tất cả các chủng giống DT đột biến có màu trắng, mật độ hệ sợi dày giống với chủng giống DT ban đầu, riêng chủng đột biến DTL<sub>1,25</sub> hệ sợi nấm bông sợi hơn so với các chủng còn lại.

Các chủng nấm đột biến có nguồn gốc từ giống nấm Linh chi D20 là D20L<sub>0,5</sub>; D20L<sub>0,75</sub> có tốc độ sinh trưởng hệ sợi lần lượt là 8,48 và

9,63 mm/ngày cao hơn hẳn so với tốc độ sinh trưởng của giống gốc D20L<sub>0</sub> (7,94 mm/ngày), hệ sợi nấm đều có màu trắng nhạt, mật độ hệ sợi dày; chủng D20L<sub>0,25</sub> có tốc độ mọc sợi thấp hơn so với đối chứng.

Tốc độ sinh trưởng hệ sợi của ác chủng nấm đột biến D18L<sub>0,25</sub> và D18L<sub>0,75</sub> không có sự sai khác so với tốc độ mọc sợi của giống đối chứng D18L<sub>0</sub>.

Sự hình thành, phát triển và năng suất của nấm Linh chi phụ thuộc chặt chẽ vào nhiều yếu tố ngoại cảnh: nhiệt độ, độ ẩm, oxy, ánh sáng và nồng độ CO<sub>2</sub> (Boh & cs., 2007; Zhou & cs., 2012). Trong thí nghiệm này, các chủng linh chi đột biến và giống đối chứng được nuôi trồng trong

Cải thiện năng suất, chất lượng giống nấm Linh chi (*Ganoderma* spp.) bằng phương pháp gây đột biến sử dụng tia gamma (Cobalt 60)

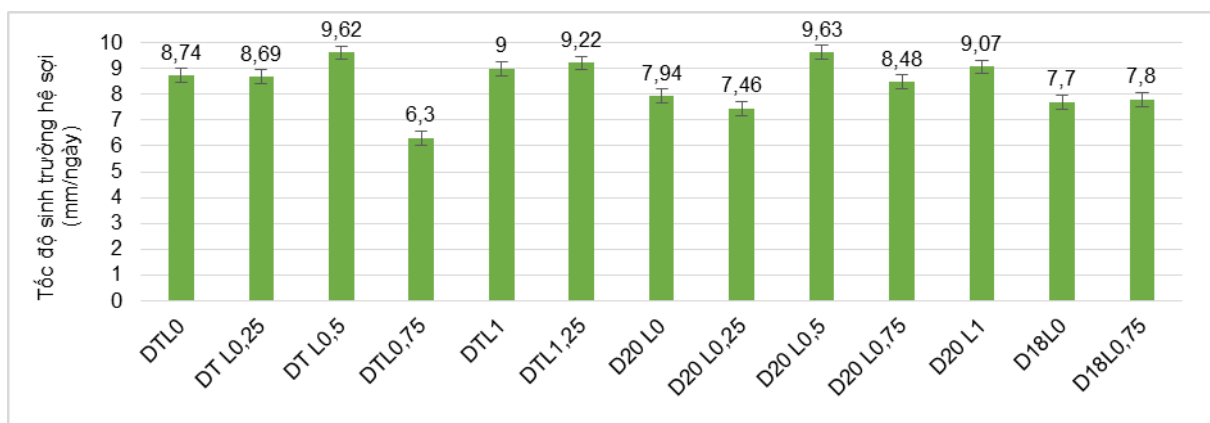
cùng một điều kiện. Kết quả ở hình 3 và 4 cho thấy: thời gian sinh trưởng và năng suất nấm khô của các chủng nấm Linh chi đột biến được chọn có sự khác nhau rõ rệt:

Các chủng linh chi đột biến  $DT_{L_{0,25}}$ ;  $DT_{L_{0,5}}$ ;  $DT_{L_{0,75}}$ ;  $DT_{L_1}$  và  $DT_{L_{1,25}}$  có thời gian xuất hiện và thời gian thu hoạch quả thể chênh lệch nhau không đáng kể dao động từ 33-34 ngày và 55-57 ngày, tương đương với giống đối chứng  $DTL_0$  (tương ứng 33 ngày và 57 ngày). Tuy nhiên, năng suất nấm khô của các chủng đột biến lại cao hơn so với chủng giống đối chứng DT (với 26,3 kg/tấn nguyên liệu) từ 13-16%, dao động từ 28,4-30,51 kg/tấn nguyên liệu, trong đó chủng có năng suất đạt cao nhất là chủng  $DT_{L_{1,25}}$  với 30,51 kg/tấn nguyên liệu.

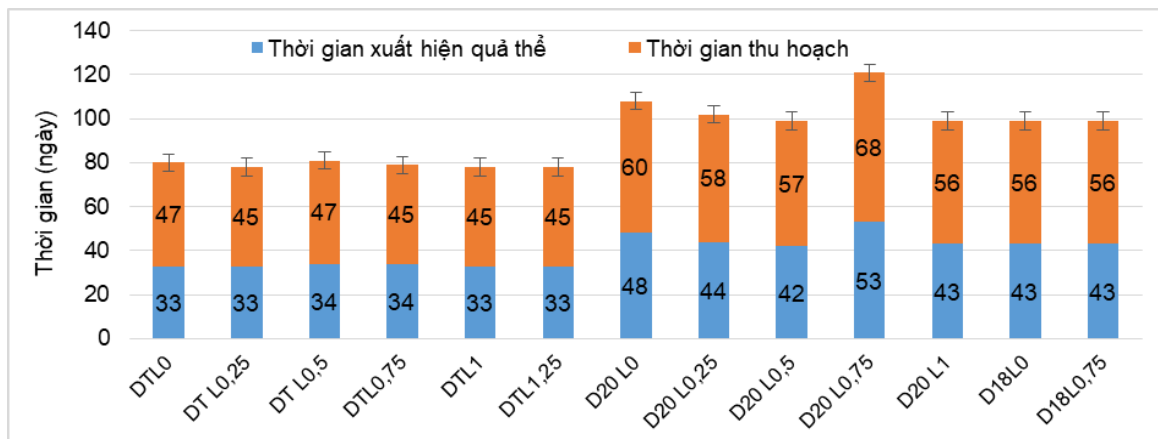
Thời gian hình thành và thu hoạch quả thể của các chủng đột biến từ giống nấm Linh chi

D20 có sự khác nhau. Các chủng đột biến  $D20_{L_{0,25}}$ ;  $D20_{L_{0,5}}$  có thời gian xuất hiện và thời gian thu hoạch quả thể dao động từ 42-44 và 67-68 ngày, sớm hơn so với giống đối chứng  $D20L_0$  (tương ứng 48 và 70 ngày), riêng chủng  $D20L_{0,75}$  có thời gian xuất hiện quả thể và thời gian thu hoạch muộn nhất (lần lượt là 53 và 78 ngày). Năng suất nấm khô thu được từ các chủng nấm D20 đột biến dao động từ 24,81-26,62 kg/tấn nguyên liệu, không có sự sai khác có ý nghĩa so với giống đối chứng  $D20L_0$  (với 25,6 kg/tấn nguyên liệu) ở độ tin cậy 95%.

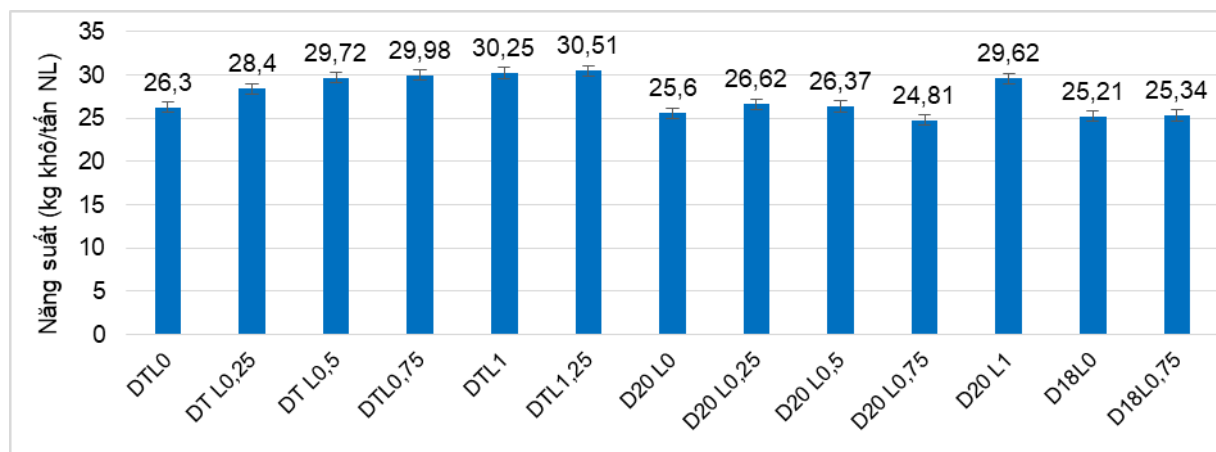
Thời gian hình thành và thu hoạch quả thể của các chủng đột biến  $D18L_{0,25}$  và  $D18L_{0,75}$  không có sự sai khác so với giống đối chứng D18, nhưng năng suất nấm khô của chủng  $D18L_{0,75}$  đạt 28,62 kg/tấn nguyên liệu khô cao hơn so với giống đối chứng  $D18L_0$  với độ tin cậy 95%.



Hình 2. Tốc độ mọc sợi của các chủng đột biến trên giá thể nuôi trồng








Hình 3. Thời gian hình thành và thời gian thu hoạch quả thể của các chủng nấm Linh chi đột biến



**Hình 4. Năng suất nấm khô của các chủng nấm Linh chi đột biến**









**Bảng 3. Đặc điểm hình thái quả thể của các chủng nấm Linh chi đột biến**

Chủng đột biến	Đặc điểm hình thái quả thể	Hình ảnh
DT <sub>LDC</sub>	Quả thể nấm hình thận, cuống dài, màu quả thể chuyển dần từ màu vàng chanh sang màu vàng cánh gián theo sự tăng trưởng kích thước quả thể.	
DT <sub>L0,25</sub>	Quả thể nấm hình thận, cuống ngắn, mỗi cuống phát triển thành 1 quả thể, màu quả thể chuyển dần từ màu vàng chanh sang màu vàng cánh gián theo sự tăng trưởng kích thước quả thể.	
DT <sub>L0,5</sub>	Quả thể nấm hình thận, cuống dài trung bình, quả thể đều, đẹp, có màu vàng đậm.	
DT <sub>L0,75</sub>	Quả thể nấm hình thận, cuống dài, quả thể đều, đẹp, có màu vàng đậm.	
DT <sub>L1</sub>	Quả thể nấm hình thận, cuống dài trung bình, quả thể đều, đẹp, có màu vàng đậm.	



Cải thiện năng suất, chất lượng giống nấm Linh chi (*Ganoderma* spp.) bằng phương pháp gây đột biến sử dụng tia gamma (Cobalt 60)

**Bảng 3. Đặc điểm hình thái quả thể của các chủng nấm Linh chi đột biến**

Chủng đột biến	Đặc điểm hình thái quả thể	Hình ảnh
DTL <sub>1,25</sub>	Quả thể nấm hình thận, cuống dài trung bình, quả thể đều, đẹp, có màu vàng đậm, kích thước quả lớn hơn đối chứng từ 2-3 cm.	
D <sub>20</sub> L <sub>0</sub>	Quả thể nấm hình quạt, màu vàng sáng cuống ngắn, hầu như không có cuống, nhiều quả thể.	
D <sub>20</sub> L <sub>0,25</sub>	Quả thể nấm hình quạt, màu vàng sáng, cuống ngắn, hầu như không có cuống, nhiều quả thể.	
D <sub>20</sub> L <sub>0,5</sub>	Quả thể nấm hình quạt, màu vàng sáng cuống ngắn, hầu như không có cuống, nhiều quả thể.	
D <sub>20</sub> L <sub>0,75</sub>	Quả thể nấm hình quạt, màu vàng sáng cuống ngắn, hầu như không có cuống, nhiều quả thể, hình thái quả thể không đều, thời gian ra quả chậm hơn đối chứng.	
D <sub>18</sub> L <sub>0</sub>	Quả thể có hình chiếc thìa, cuống nấm dài có màu cánh gián trơn bóng, mũ nấm có màu vàng nhạt hơn. Quả thể không đều.	
D <sub>18</sub> L <sub>0,25</sub>	Quả thể có hình chiếc thìa, cuống nấm dài có màu cánh gián, mũ nấm có màu vàng nhạt hơn. Quả thể không đều.	
D <sub>18</sub> L <sub>0,75</sub>	Quả thể có hình chiếc thìa, cuống nấm dài và mũ nấm có màu vàng nhạt, sau chuyển dần thành vàng đậm khi trưởng thành. Quả thể không đều.	



**Bảng 4. Một số chỉ tiêu chất lượng quả thể của các chủng nấm Linh chi đột biến**

Chủng nấm	Đánh giá bằng cảm quan		Kết quả phân tích hoạt chất	
	Màu sắc	Mùi vị	Hàm lượng polysaccharide tổng số (%)	Hàm lượng triterpenoid (mg/g)
DTL <sub>0</sub>	Nâu sẫm	Có vị rất đắng mùi thơm đặc trưng, nước nấm trong màu vàng sáng	0,49	6,60
DTL <sub>0,5</sub>	Nâu sẫm	Có vị đắng mùi thơm đặc trưng, nước nấm trong màu vàng sáng	0,45	6,51
DTL <sub>0,75</sub>	Nâu sẫm	Có vị đắng mùi thơm đặc trưng, nước nấm trong màu vàng sáng	0,57	6,51
DTL <sub>1</sub>	Nâu sẫm	Có vị đắng mùi thơm đặc trưng, nước nấm trong màu vàng sáng	0,60	5,13
DTL <sub>1,25</sub>	Nâu sẫm	Có vị rất đắng mùi thơm đặc trưng, nước nấm trong màu vàng sáng	0,60	7,48
D18L <sub>0</sub>	Vàng cánh gián	Có vị đắng nhẹ, mùi thơm đặc trưng, nước nấm trong màu vàng nhạt	0,46	4,59
D18L <sub>0,75</sub>	Vàng cánh gián	Có vị đắng nhẹ, mùi thơm đặc trưng, nước nấm trong màu vàng nhạt	0,44	5,47

Các đặc điểm hình thái quả thể của các chủng Linh chi đột biến được thể hiện qua bảng 3. Quả thể của hầu hết các chủng linh chi đột biến đều có hình thái giống với hình thái quả thể của chủng ban đầu.

Chủng nấm Linh chi DT và các chủng đột biến từ chủng DT hầu hết quả thể có hình thận, cuống nấm dài trung bình, màu quả thể lúc đầu có màu vàng chanh, sau chuyển dần sang màu vàng cánh gián hoặc vàng đậm theo sự tăng trưởng kích thước quả thể. Mỗi cuống nấm chỉ phát triển thành 1 quả thể, quả thể cân đối, không bị xẻ thùy. Đặc biệt chủng DTL<sub>1,25</sub> có cuống ngắn hơn so với chủng đối chứng nhưng kích thước quả thể to hơn từ 2-3cm.

Quả thể của hũng nấm Linh chi D20 và các chủng đột biến từ chủng D20 quả thể nấm đều có hình quạt, màu vàng sáng, hầu như không có cuống vì cuống rất ngắn, xuất hiện nhiều quả thể trên mỗi cuống nấm.

Chủng đột biến D18L<sub>0,75</sub> và chủng D18 đều có quả thể hình chiếc thìa, cuống nấm dài, mỗi cuống hình thành nhiều quả thể, quả thể có kích thước không đều. Mũ nấm có màu vàng nhạt lúc nhỏ, sau chuyển dần thành vàng đậm khi trưởng thành

Các kết quả đánh giá khả năng hình thành và phát triển quả thể của 10 chủng nấm Linh chi đột biến cho thấy: 05 chủng gồm DTL<sub>0,5</sub>; DTL<sub>0,75</sub>; DTL<sub>1</sub>; DTL<sub>1,25</sub> và D18L<sub>0,75</sub> có thời gian hình thành quả thể và thời gian thu hoạch sớm hơn hoặc tương đương so với đối chứng; năng

suất nấm khô tăng từ 13-16% so với chủng đối chứng. Vì vậy 05 chủng nấm Linh chi này được lựa chọn để đánh giá chỉ tiêu chất lượng quả thể và tiếp tục so sánh tuyển chọn để tìm ra chủng giống nấm Linh chi triển vọng nhất.

### 3.3. Kết quả đánh giá chỉ tiêu chất lượng quả thể các chủng nấm Linh chi đột biến

Để đánh giá ảnh hưởng của tia gamma đến chất lượng của các chủng nấm Linh chi đột biến, 05 chủng gồm DTL<sub>0,5</sub>; DTL<sub>0,75</sub>; DTL<sub>1</sub>; DTL<sub>1,25</sub> và D18L<sub>0,75</sub> đã được tiến hành đánh giá cảm quan và gửi mẫu đi phân tích hai thành phần hoạt chất chính là polysaccharide và triterpenoid tại Viện Thực phẩm chức năng, kết quả thu được như bảng 4.

Kết quả đánh giá bằng cảm quan chỉ ra: các chủng nấm đều có vị đắng, mùi thơm đặc trưng của linh chi, nước có màu vàng sáng, hợp thị hiếu người tiêu dùng.

Kết quả phân tích hàm lượng các hoạt chất (hàm lượng polysaccharide và triterpenoid tổng số) cho thấy: Chủng đột biến từ giống nấm Linh chi DT có hàm lượng Polysaccharide cao hơn so với đối chứng DTL<sub>0</sub> (với 0,49%) từ 16,3-22,5% đó là các chủng DT<sub>L0,75</sub>; DT<sub>L1</sub> và DTL<sub>1,25</sub> dao động từ 0,57-0,6%. Các chủng còn lại có hàm lượng polysaccharide tổng số nhỏ hơn chủng đối chứng ban đầu nhưng không đáng kể. Hàm lượng triterpenoid cũng có sự khác biệt rõ rệt ở các chủng đột biến từ DT. Chủng có hàm lượng triterpenoid đạt cao nhất là

DT<sub>L1,25</sub> với 7,48 mg/g, cao hơn giống đối chứng DT<sub>Ld/c</sub> (với 6,60 mg/g) là 13,3%. Các chủng còn lại có hàm lượng triterpenoid nhỏ hơn so với chủng đối chứng DT<sub>Ld/c</sub>.

Chủng đột biến D18<sub>L0,75</sub> mặc dù có hàm lượng polysaccharide là 0,44% thấp hơn không đáng kể nhưng lại có hàm lượng triterpenoid là 5,47 mg/g cao hơn khoảng 19,2% so với giống đối chứng D18<sub>LDC</sub> (có hàm lượng hai hoạt chất này lần lượt là 0,46% và 4,59 mg/g).

Hàm lượng polysaccharide và triterpenoid là hai thành phần hoạt động sinh lý chính trong nấm Linh chi *Ganoderma* spp. (Boh & cs., 2007; Zhou & cs., 2007). Tuy nhiên, số lượng và tỷ lệ phần trăm của từng thành phần rất đa dạng trong các sản phẩm tự nhiên và thương mại. Theo được điển Trung Quốc (2005) các giống Linh chi có hoạt tính khi hàm lượng polysaccharide  $\geq 0,5\%$ . Từ kết quả phân tích hàm lượng polysaccharide và triterpenoid của các chủng nấm Linh chi đột biến cho thấy: cường độ chiếu của tia gamma có ảnh hưởng rõ rệt đến hàm lượng polysaccharide và triterpenoid của các chủng giống nấm Linh chi nghiên cứu. Việc áp dụng các kỹ thuật gây đột biến nhằm cải thiện hàm lượng hoạt chất của linh chi cũng đã được báo cáo và thu được nhiều thành tựu đáng kể. Peng & cs. (2016) tiến hành gây đột biến tế bào chất (protoplast) của giống linh chi *G. Lucidum* sử dụng liti clorua và kết hợp liti clorua với riton X-100, kết quả thu được hai chủng đột biến có hàm lượng polysaccharid và triterpenoid nội bào cao nhất là 37,50 và 40,81 mg/g, tăng lần lượt là 568,45% và 373,43% so với chủng ban đầu. Hơn nữa, hàm lượng polysaccharit và triterpenoid nội bào ở thế hệ thứ hai và thế hệ thứ ba của các chủng đột biến tương đương với sản lượng của thế hệ thứ nhất, điều này cho thấy sự ổn định di truyền của các đột biến để sản xuất polysaccharit và triterpenoid. Những kết quả tương tự cũng được chỉ ra bởi Liu & cs. (2017) và Ma & cs. (2018). Ngoài kết quả nghiên cứu về cải thiện hoạt chất, thì các nghiên cứu về phương pháp tách chiết các hoạt chất này cũng được các nhà khoa học trên thế giới quan tâm và thu được thành tựu đáng kể. Chen & cs. (2007) sử dụng phương pháp chiết

xuất có hỗ trợ vi sóng (MAE) đã chiết xuất được hàm lượng triterpenoid từ nấm Linh chi *G. lucidum* đạt tối ưu với  $\sim 1,0\%$  đến năm 2014, Chen & cs. (2014) đã chiết xuất polysaccharide bằng phương pháp tuần hoàn siêu âm loại bỏ gốc DPPH đã thu được hàm lượng polysaccharid cao nhất đạt  $\sim 0,5\%$ . Tuy nhiên, đến năm 2020, Zheng & cs. (2020) đã tiến hành chiết xuất đồng thời polysaccharide và triterpenoids từ *G. lucidum* sử dụng phương pháp hỗ trợ bằng siêu âm (UACE) đã được tối ưu hóa, kết quả thu được polysaccharid và triterpenoid cao hơn lần lượt đạt 0,63% và 0,38%.

#### 4. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu đã chọn lọc được 05 chủng nấm Linh chi đột biến là DT<sub>L0,5</sub>; DT<sub>L0,75</sub>; DT<sub>L1</sub>; DT<sub>L1,25</sub> và D18<sub>L0,75</sub> có khả năng sinh trưởng hệ sợi khỏe, thời gian hình thành quả thể và thời gian thu hoạch sớm và năng suất nấm khô tăng từ 13-16% so với chủng bố mẹ ban đầu. Trong đó có 03 chủng là DT<sub>L0,75</sub>; DT<sub>L1</sub>; DT<sub>L1,25</sub> có hàm lượng polysaccharide tổng số và 02 chủng là DT<sub>L1,25</sub> và D18<sub>L0,75</sub> có hàm lượng triterpenoid cao hơn so với chủng ban đầu.

Kết quả nghiên cứu cho thấy: Chiếu xạ tia gamma nguồn Co60 trên hệ sợi nấm Linh chi có ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng sinh trưởng, phát triển cũng như hoạt chất dược liệu của các chủng đột biến, cụ thể với liều chiếu xạ từ 0,5-1,25kGray có tác dụng tích cực trong việc cải thiện khả năng sinh trưởng, phát triển và chất lượng của các giống nấm Linh chi; còn với liều chiếu  $\geq 1,5$ kGray không có lợi cho sự phát triển hệ sợi của các chủng nấm Linh chi.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Anitha R. (1998). Strain improvement in *Oyster* mushroom (*Pleurotus* spp.). MSc (Ag) thesis, Kerala Agricultural University, Thrissur. 92p.
- Boh B., Berovic M., Zhang J. & Zhi-Bin L. (2007). *Ganoderma lucidum* and its pharmaceutically active compounds. National Library of Medicine. 13: 265-301. doi: 10.1016/S1387-2656(07)13010-6.
- Chen Yi, Ming-Yong Xie & Xiao-Feng Gong (2007). Microwave-assisted extraction used for the isolation of total triterpenoid saponins from

- Ganoderma atrum*. Journal of Food Engineering. 81(1): 162-170.
- Dong Y., Miao R., Feng R., Wang T., Yan J., Zhao X., Han X., Gan Y., Lin J., Li Y., Gan B. & Zhao J. (2022). Edible and medicinal fungi breeding techniques, a review: Current status and future prospects. Current Research in Food Science.
- El Sheikh A.F. (2022). Nutritional profile and health benefits of *Ganoderma lucidum* “Lingzhi, Reishi, or Mannentake” as functional foods: Current scenario and future perspectives. Foods. 11(7): 1030.
- El-Ramady H., Abdalla N., Badgar K., Llanaj X., Törös G., Hajdú P., Eid Y. & Prokisch J. (2022). Edible mushrooms for sustainable and healthy human food: Nutritional and medicinal attributes. Sustainability. 14(9): 4941.
- Esser K. (1971). Application and importance of fungal genetics for industrial research. In: Proceedings of the symposium on use of radiation and radioisotopes for industrial microorganisms, 29 March - 1 April, Vienna, Austria. pp. 83-91.
- IAEA (International Atomic Energy Agency) (1992). Irradiation of spices herbs and other vegetable seasonings. A compilation of technical data for its authorization and control. IAEA-TECDOC. 639: 16-17.
- IAEA (International Atomic Energy Agency) (2009). Developments in mutation assisted plant breeding. Retrieved from [http://www.iaea.org/About/Policy/GC/GC53/GC53InfDocuments/English/gc53inf-3-att1\\_en.pdf](http://www.iaea.org/About/Policy/GC/GC53/GC53InfDocuments/English/gc53inf-3-att1_en.pdf). on Aug 18, 2023.
- Liu L., Van-Zanten L., Shu Q.Y. & Maluszynski M. (2004). Officially released mutant varieties in China. Mutation Breeding Review (IAEA Newsletter). 14: 1-64.
- Liu S.R., Ke B.R., Zhang W.R., Liu X.R. & Wu X.P. (2017). Breeding of new *Ganoderma lucidum* strains simultaneously rich in polysaccharides and triterpenes by mating basidiospore-derived monokaryons of two commercial cultivars. Scientia Horticulturae. 216: 58-65.
- Ma, Y., Zhang, Q., Zhang, Q., He, H., Chen, Z., Zhao Y., Wei D., Kong M. & Huang Q. (2018). Improved production of polysaccharides in *Ganoderma lingzhi* mycelia by plasma mutagenesis and rapid screening of mutated strains through infrared spectroscopy. PLoS One. 13(9): e0204266
- Nakagawa H. (2009). Induced mutations in plant breeding and biological researches in Japan. Induced Plant Mutations in the Genomics Era. pp. 51-58. Retrieved from <http://www.fnca.mext.go.jp/english/mb/docdb/data/jpn035.pdf> on Aug 18, 2023.
- Nguyen B.T.T., Ngo N.X., Van Le V., Nguyen L.T., Kana R. & Nguyen H.D. (2019). Optimal culture conditions for mycelial growth and fruiting body formation of Ling Zhi mushroom *Ganoderma lucidum* strain GA3. Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering. 61(1): 62-67.
- Peng R., Fu Y.Z., Zou J., Qiu H., Gan L.T., Yi H.L. & Luo X.Y. (2016). Improvement of polysaccharide and triterpenoid production of *Ganoderma lucidum* through mutagenesis of protoplasts. Biotechnol. Biotechnol. Equip. 30(2): 381-387. doi.org/10.1080/13102818.2015.1133254.
- Zheng S., Zhang W. & Liu S. (2020). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of polysaccharides and triterpenoids from the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* and evaluation of their *in vitro* antioxidant capacities. PLoS One. 15(12): e0244749.