

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (2009) Báo cáo hàng năm. <http://www.agroviet.gov.vn>.
2. Nguyễn Văn Đồng và CS(2009) *Kết quả bước đầu nghiên cứu chuyển gen kháng sâu cryIA(c)vào phôi non các dòng ngô mô hình*. Tạp chí Công nghệ Sinh học 8(1): 1-8.
3. Phạm Thị Lý Thu (2007) *Nghiên cứu xây dựng hệ thống tái sinh từ phôi non và xác định phương pháp chuyển gen thích hợp ở ngô*. Luận án tiến sĩ Sinh học, Viện Công nghệ Sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.
4. Assem S., Hussein E., Hussein H., Basry M. (2009) *Genetic Transformation of the Nicotiana Protein Kinase (NPK1) Gene Confers Osmotic Tolerance in Egyptian Maize*. Australian Journal of Basic and Applied Sciences,3(2): 828-835.
5. Hensel G., Kastner C., Oleszczuk S., Riechen J., Kumlehn J. (2009) *Agrobacterium-Mediated Gene Transfer to Cereal Crop Plants: Current Protocols for Barley, Wheat, Triticale, and Maize*. International Journal of Plant Genomics 2009.

Ngày nhận bài: 10/4/2013

Người phản biện: GS. TSKH. Trần Duy Quý,
ngày 4/5/2013

Ngày duyệt đăng: 3/6/2013

**NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG NẤM VÂN CHI (*TRAMETES VESICOLOR*)
DẠNG DỊCH THỂ**

Nguyễn Thị Bích Thùy, Cồ Thị Thùy Vân,
Đinh Xuân Linh, Trịnh Tam Kiệt,
Nguyễn Trung Thành

SUMMARY

**Study on the technological condition for submerged fermenter culture
of *Trametes versicolor* strain**

The Turkey tail *Trametes versicolor* has been considered the major medicinal mushroom worldwide, mainly due to its traditional usage, polysaccharopeptides have been purified from this species, showing experimental immunomodulatory and anti-cancer effects.

The growth of *Trametes versicolor* strain under liquid fermentation conditions was examined. The experiment results indicated that the turkey tail mushroom mycelium grew best on (2 gam Pepton + 2 gam yeast extract + 0,2 gam MgSO₄.7H₂O + 1gam KH₂PO₄ + 15gam glucose + 1,5 mg vitamin B1 + 1000ml distilled water) medium. On this medium, turkey tail mycelium was growing fast, mycelial dry weight is 35,2 g/ 1000ml, the highest number of mycelial pellet. Turkey tails mushroom mycelium grew best on in temperatures as 26 - 30 ° C. Different oxygen supply modes can significantly affect to the morphology and mycelia biomass, the optimal concentration of oxygen is 0,6 liters/ 1 liters liquid / minute. The suitable time to obtained the mycelium grew well at 72 - 84 hour.

Keywords: Submerged fermenter culture, Turkey tail.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nấm Vân chi có tên khoa học *Trametes versicolor* (Linnaeus.Fries) Pilat; thuộc họ

Polyporaceae, bộ Aphyllophorales, lớp Hymenomycetes, ngành Basidiomycota. Trong Y học cổ truyền Trung Quốc, nấm Vân chi được sử dụng để làm giảm trầm

cảm, giảm đờm, chữa lành rối loạn phổi, tăng cường vóc dáng và năng lượng, có ích với các bệnh mãn tính (Yang & Yong, 1989).

Hiện nay nấm Vân chi được nuôi trồng nhiều ở Nhật Bản, Trung Quốc, Hồng Kông... và được sử dụng chế biến thành dược phẩm để chữa bệnh. Ở Việt Nam đã có những nghiên cứu về nấm Vân chi ở quy mô phòng thí nghiệm, hoặc một vài nơi nuôi trồng tự phát, nhỏ lẻ, mang tính thủ công theo công nghệ truyền thống nên chưa phù hợp với thực tế. Các cơ sở nuôi trồng nấm ở nước ta đều đang áp dụng công nghệ nhân giống ở dạng rắn, nên còn tồn tại một số nhược điểm như: Tỷ lệ giống nhiễm bệnh khá nhiều (trên 10%), thời gian nuôi giống kéo dài (10 -25 ngày) cho một cấp giống, thời gian từ khi cấy giống vào cơ chất nuôi trồng đến khi thu hái nấm thương phẩm dài (55-65 ngày), dẫn đến giá thành giống nấm và nấm thương phẩm cao. Trong khi đó việc nghiên cứu và sản xuất giống dịch thể trên thế giới đã đạt được một số thành tựu đáng kể. Việc ứng dụng sản xuất giống dịch thể có hiệu quả rõ rệt so với giống thể rắn như rút ngắn thời gian sinh trưởng chỉ còn 3 - 5 ngày cho một cấp giống, độ thuần cao, chất lượng tốt, tỷ lệ nhiễm bệnh giảm, thích hợp cho sản xuất giống nấm và nuôi trồng nấm theo quy mô công nghiệp...

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu nghiên cứu

Giống nấm Vân chi được sử dụng trong thí nghiệm có nguồn gốc từ Hàn Quốc được tuyển chọn từ tập đoàn giống nấm đang được lưu giữ tại Trung tâm Công nghệ sinh học thực vật - Viện Di truyền Nông nghiệp.

2. Phương pháp nghiên cứu

Trong các nghiên cứu này, sử dụng phương pháp nhân giống nấm dịch thể theo Yan Chang-wei, 2003.

* Phương pháp bố trí thí nghiệm.

- Các thí nghiệm được bố trí như sau: Trong mỗi công thức thí nghiệm sử dụng 5 bình tam giác, thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Tổng cộng 15 bình tam giác/1 công thức thí nghiệm.

CT1: 200 g khoai tây + 0,2 g $MgSO_4.7H_2O$ + 1 g KH_2PO_4 + 15 g glucose + 25 g bột ngô + 20 g cám gạo + 1,5mg thiamin

CT2: 1,5 g cao nấm men + 1,5 g pepton + 0,2 g $MgSO_4.7H_2O$ + 1 g KH_2PO_4 + 15 g glucose + 1,5mg thiamin

CT3: 2 g cao nấm men + 2 g pepton + 0,2 g $MgSO_4.7H_2O$ + 1 g KH_2PO_4 + 15 glucose + 1,5mg thiamin.

CT4: 2,5 g cao nấm men + 2,5 g pepton + 0,2 g $MgSO_4.7H_2O$ + 1 g KH_2PO_4 + 15 glucose + 1,5mg thiamin.

CT5: 3 g cao nấm men + 3 g pepton + 0,2 g $MgSO_4.7H_2O$ + 1 g KH_2PO_4 + 15 g glucose + 1,5mg thiamin.

- Cấy giống: Các bình dung dịch cây giống gốc (lồng giống gốc nghiền trong 100ml nước cất bằng máy nghiền homogenizer).

- Các thí nghiệm nuôi giống nấm được tiến hành trong điều kiện tối.

* *Phương pháp xác định số lượng, kích thước pellet trong dịch nuôi nấm*

Trong quá trình nuôi giống nấm trong môi trường dịch thể, ban đầu hình thành các mảnh sợi nấm nhỏ li ti, sau đó sợi nấm lớn lên, liên kết lại với nhau tạo thành viên hình cầu có kích thước khác nhau, các thể hình cầu này được gọi là pellet.

Kết thúc quá trình nuôi, tiến hành kiểm tra, quan sát dịch, mật độ pellet, đo kích thước pellet trên kính hiển vi OPITIKA có kết nối với máy tính đã cài phần mềm đo kích thước và chụp ảnh, đồng thời giống dịch thể được ly tâm thu sinh khối sợi.

* Các chỉ tiêu theo dõi:

- Mật độ sợi hình cầu được biểu thị như sau:

(+) Biểu thị lượng sợi hình cầu từ 10 - 30 pellet/ 1ml dịch

(++) Biểu thị lượng sợi hình cầu từ 31 - 60 pellet/ 1ml dịch

(+++)
Biểu thị lượng sợi hình cầu từ 61 - 90 pellet/ 1ml dịch

(++++)
Biểu thị lượng sợi hình cầu từ 91 - 120 pellet/ 1ml dịch

- Sinh khối sợi (g/1000ml).

- Kích thước pellet (mm).

* Phương pháp xử lý số liệu

Kết quả nghiên cứu được xử lý theo phương pháp thống kê sinh học bằng phần mềm Excel và phần mềm IRRISTAT 4.0.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Ảnh hưởng của nhiệt độ tới sự sinh trưởng, phát triển của hệ sợi nấm Vân chi

Các bình môi trường đã cấy giống nấm được nuôi trên máy lắc bảo ôn với chế độ nhiệt độ: $22 \pm 1^\circ\text{C}$; $26 \pm 1^\circ\text{C}$; $30 \pm 1^\circ\text{C}$, $34 \pm 1^\circ\text{C}$, tốc độ lắc 150 vòng/ phút, thời gian nuôi giống 4 ngày.

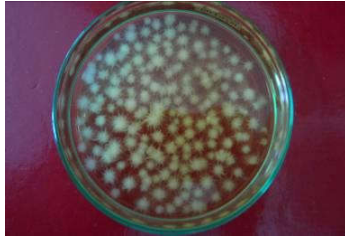
Kết quả thí nghiệm trình bày ở bảng 1 cho thấy, trong khoảng nhiệt độ $30 \pm 1^\circ\text{C}$ là nhiệt độ thích hợp nhất để nuôi cấy giống nấm Vân chi, trong phạm vi nhiệt độ này, mật độ pellet nhiều nhất, sinh khối sợi đạt 21,5 gam/1000ml. Trong phạm vi nhiệt độ thấp hơn hoặc cao hơn mật độ sợi nấm Vân chi ít, sinh khối sợi giảm.

Bảng 1. Sự sinh trưởng hệ sợi nấm Vân chi trong các điều kiện nhiệt độ khác nhau

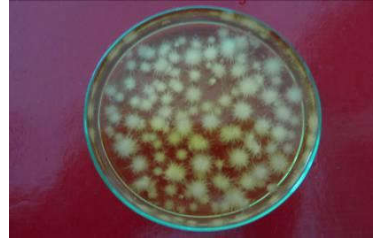
Nhiệt độ	Chỉ tiêu	Kích thước pellet (mm)	Mật độ pellet	Sinh khối sợi (g/1000ml)
$22 \pm 1^\circ\text{C}$		0,72	+	13,8
$26 \pm 1^\circ\text{C}$		0,94	++	17,6
$30 \pm 1^\circ\text{C}$		1,18	++++	21,5
$34 \pm 1^\circ\text{C}$		1,26	++	15,6
	CV(%)	2,7		3,8
	LSD.05	0,52		1,24

Trong khoảng nhiệt độ $22 \pm 1^\circ\text{C}$, mật độ pellet sợi nấm thưa, kích thước pellet nhỏ, sinh khối sợi nấm thấp. Mật độ pellet ở $34 \pm 1^\circ\text{C}$ không có sự sai khác nhiều so với ở nhiệt độ $26 \pm 1^\circ\text{C}$; kích thước pellet ở $34 \pm 1^\circ\text{C}$ lớn hơn kích thước pellet ở nhiệt độ 26

$\pm 1^\circ\text{C}$ (kích thước tương ứng 1,26mm - 0,94mm) nhưng sinh khối sợi Vân chi tại nhiệt độ $34 \pm 1^\circ\text{C}$ lại nhỏ hơn $26 \pm 1^\circ\text{C}$, điều này chứng tỏ rằng tại nhiệt độ $34 \pm 1^\circ\text{C}$ hệ sợi sinh trưởng quá nhanh, các sợi nấm liên kết với nhau tạo nên pellet thể rỗng.



Hình 1: Pellet nấm Vân chi nuôi trong điều kiện $22 \pm 1^\circ\text{C}$



Hình 2: Pellet nấm Vân chi nuôi trong điều kiện $30 \pm 1^\circ\text{C}$

2. Ảnh hưởng của pH đến sự sinh trưởng, phát triển của hệ nấm Vân chi trong môi trường dịch thể

Các bình môi trường được hiệu chỉnh pH bằng dung dịch NaOH và HCl về các

ngưỡng 3; 4; 5; 6; 7; 8, sau đó khử trùng và cấy giống. Các bình đã cấy giống được nuôi trên máy lắc với tốc độ lắc 150 vòng/ phút, trong điều kiện nhiệt độ $30 \pm 1^\circ\text{C}$, thời gian nuôi giống 4 ngày.

Bảng 2. Ảnh hưởng của pH đến sinh trưởng của hệ sợi nấm Vân chi trong môi trường dịch thể.

pH ban đầu	pH sau khi khử trùng	pH kết thúc quá trình nuôi	Mật độ pellet	Sinh khối sợi (g/1000ml)
3	2,94	1,95	+	10,3
4	3,93	2,74	+	14,2
5	4,96	3,67	++	17,4
6	5,95	4,75	++++	27,6
7	6,96	5,71	++++	26,3
8	7,97	6,66	++	17,8
CV(%)				4,7
LSD ₀₅				1,57

Kết quả theo dõi ảnh hưởng của pH đến quá trình sinh trưởng của giống nấm Vân chi được trình bày ở bảng 2 cho thấy: Trong khoảng pH môi trường ban đầu từ 3 - 4, mật độ pellet nấm Vân chi thưa, sinh khối sợi thấp (10,3 - 14,2 g/1000ml dịch); trong khoảng pH ban đầu từ 5 - 7 mật độ pellet tăng và sinh khối sợi nấm tăng. Khi môi trường có pH ban đầu đạt 6 và 7 thì mật độ pellet dày tương đương nhau, nhưng sinh khối sợi nấm Vân chi có sự sai khác nhiều, sinh khối sợi nấm Vân chi đạt cao nhất khi nuôi trong điều kiện pH là 6 (27,6 g/1000ml). Môi trường có pH ban đầu đạt 8 thì mật độ pellet và sinh khối giảm rõ rệt. Kích thước của pellet không thay đổi nhiều trong các khoảng pH khác nhau.

3. Ảnh hưởng của thành phần môi trường dịch thể đến sự sinh trưởng, phát triển của hệ sợi nấm Vân chi

Kết quả theo dõi sự sinh trưởng của hệ sợi nấm Vân chi trong các môi trường dịch thể có thành phần dinh dưỡng khác nhau được trình bày ở bảng 3. Sau 24 đến 84 giờ quan sát thấy trên tất cả các công thức nuôi cấy, tốc độ sinh trưởng của hệ sợi nấm tăng mạnh, mật độ pellet nhiều, có màu trắng đục, có tua, dịch trong; sau 96 giờ mật độ pellet không thấy tăng mà chỉ thấy sự phình to của pellet, tiếp theo các tua của pellet bị nát ra làm giảm độ trong của dịch.

Bảng 3. Sự sinh trưởng của sợi nấm Vân chi trong môi trường dịch thể

Công thức	Kích thước Pellet (mm)	Mật độ pellet	Sinh khối sợi (g/1000ml)
I	1,43	+	15,4
II	1,32	++	22,8
III	1,28	+++++	35,2
IV	1,3	++++	30,1
V	1,46	++	18,4
CV(%)	4,5		4,8
LSD _{.05}	0,11		2,12

4. Ảnh hưởng của tốc độ lắc tới sự sinh trưởng, phát triển giống nấm Vân chi.

Theo dõi ảnh hưởng của tốc độ lắc đến sinh trưởng và phát triển của giống nấm Vân chi, thí nghiệm được tiến hành như sau: Các bình tam giác đã cấy giống nấm

được nuôi trên máy lắc với 5 mức tốc độ lắc khác nhau: 100 vòng/phút; 120 vòng/phút; 140 vòng/phút; 160 vòng/phút; 180 vòng/phút, nuôi trong điều kiện nhiệt độ 30 ± 1°C, thời gian nuôi giống 4 ngày. Kết quả thí nghiệm thu được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của tốc độ lắc và chế độ sục khí đến sự sinh trưởng của nấm Vân chi

Tốc độ lắc (vòng/ phút)	Chỉ tiêu theo dõi	Kích thước pellet (mm)	Mật độ sợi nấm	Sinh khối sợi (g/1000ml)
100		1,78	+	22,5
120		1,54	++	26,8
140		1,35	+++	36,2
160		1,16	++++	34,8
180		0,78	+++++	30,7
CV(%)		3,7		2,8
LSD _{.05}		0,89		1,54

Kết quả ở bảng 4 cho thấy, tốc độ lắc 140 vòng/phút mật độ sợi hình cầu nhiều, sinh khối sợi lớn nhất (36,2gam/1000ml), nhưng ở tốc độ lắc 160 - 180 vòng/phút lại có xu hướng làm giảm sinh khối sợi nấm (34,8- 30,7 g/1000ml).

5. Ảnh hưởng của tỷ lệ giống cấy tới sự sinh trưởng của giống nấm Vân chi

Các bình môi trường được cấy giống với 4 mức giống khác nhau (10ml giống gốc; 20 ml giống gốc; 30ml giống gốc; 40 ml giống gốc), nuôi trong điều kiện nhiệt độ 30 ± 1°C, tốc độ lắc 140 vòng/phút, nuôi trong thời gian 4 ngày.

Kết quả thí nghiệm ở bảng 5 cho thấy tỷ lệ giống cấy ảnh hưởng nhiều đến mật độ pellet, kích thước pellet và sinh khối sợi. Cấy giống mẹ với tỷ lệ nhỏ (10% dịch ống giống gốc) thu được giống nấm có mật độ pellet thấp, kích thước pellet to (1,55mm), sinh khối sợi nhỏ (22,8 g/1000ml). Khi sử dụng giống mẹ với tỷ lệ 30% dịch ống giống gốc, thu được giống nấm có mật độ pellet cao, kích thước pellet (1,05mm), đặc biệt sinh khối sợi cao nhất so với các mức cấy giống khác (34,7 g/1000ml), khi tăng mức giống mẹ lên 40% dịch ống giống gốc thì sinh khối sợi giảm còn 29,2 g/1000ml.

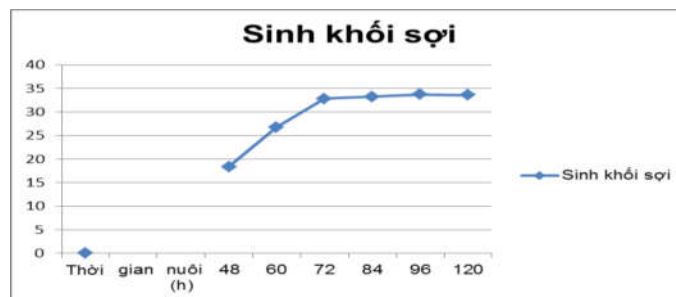
Bảng 5. Ảnh hưởng của tỷ lệ giống cấy đến sinh trưởng của sợi nấm Vân chi

Tỷ lệ giống cấy (% ống gốc)	Chi tiêu	Kích thước pellet (mm)	Mật độ pellet	Sinh khối sợi (g/1000ml)	Đặc điểm
10		1,55	++	22,8	Sợi hình cầu to, phân tán, có tua sợi.
20		1,37	+++	28,6	Sợi hình cầu to, phân tán, có tua sợi.
30		1,05	++++	34,7	Sợi hình cầu trung bình, có sự kết dính, có tua sợi.
40		0,63	+++++	29,2	Sợi hình cầu nhỏ, có sự kết dính mạnh, có tua.
CV(%)		3,1		3,5	
LSD _{.05}		0,67		1,89	

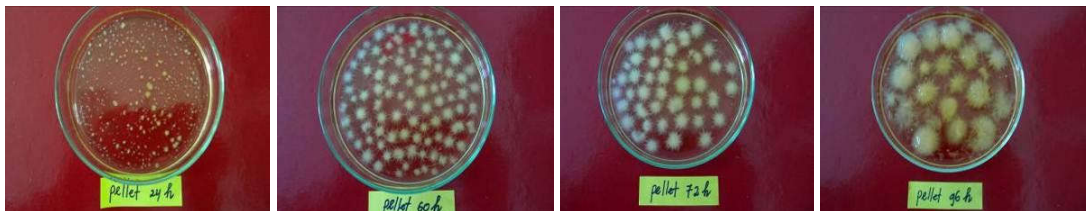
6. Kết quả khảo sát đường cong sinh trưởng của hệ sợi nấm Vân chi

Sử dụng công thức môi trường III, môi trường có pH đạt 6, giống nấm nuôi trong điều kiện nhiệt độ $30 \pm 1^\circ\text{C}$, tốc độ lắc 140 vòng/phút. Định kỳ, lấy giống nấm các giai đoạn tuổi giống khác nhau (48 giờ; 60 giờ; 72 giờ; 84 giờ; 96 giờ; 96 giờ; 120 giờ) để quan sát. Kết quả thí nghiệm cho thấy trong 24 giờ đầu hệ sợi của giống nấm Vân chi sinh trưởng rất chậm, sau 48 -72 giờ đầu, quan sát bằng mắt thường thấy mật độ pellet

và kích thước pellet tăng lên rõ rệt, từ 72 - 120 giờ mật độ pellet của giống nấm Vân chi có tăng trưởng nhưng rất chậm, trong giai đoạn 120 giờ nhìn thấy rõ dịch tăng độ huyền phù, lúc này sự vận chuyển của dịch bị cản trở, pellet bắt đầu biến dạng. Sinh khối sợi nấm Vân chi có sự tăng trưởng rõ trong thời gian 48 giờ đến 72 giờ (18,4 -32,8 gam/1000ml), giống nấm nuôi trong thời gian từ 72 - 96 giờ sinh khối của nấm Vân chi vẫn tăng nhưng tăng rất chậm và đạt cực đại trong 96 giờ (đạt 33,7 g/1000ml).



Hình 3: Đường cong sinh trưởng của hệ sợi nấm Vân chi trong nuôi cấy lỏng



Hình 4: Hệ sợi nấm Vân chi trong thời gian nuôi khác nhau

IV. KẾT LUẬN

- Nhiệt độ thích hợp cho quá trình sinh trưởng và phát triển của giống nấm Vân chi dạng dịch thể là $30 \pm 1^\circ\text{C}$.

- Giống nấm Vân chi sinh trưởng, phát triển tốt nhất trong điều kiện môi trường có pH đạt 6.

- Giống nấm Vân chi nuôi cấy trong công thức môi trường III (Pepton 2g + Cao nấm men 2g + MgSO₄.7H₂O 0,2g + KH₂PO₄ 1g + glucose 15g + Thiamin 1,5 mg + nước cất 1000ml) thu được sinh khối sợi lớn nhất (35,2 g/1000ml dịch), mật độ peller nhiều, kích thước pellet đều.

- Chế độ lắc thích hợp để cho hệ sợi nấm Vân chi sinh trưởng trong môi trường dịch thể là 140 vòng/phút.

- Tỷ lệ giống cấy ở mức 30% ống giống gốc/ 200ml môi trường cho sinh khối sợi cao nhất (34,7 gam/ 1000ml dịch).

- Xây dựng được đường cong sinh trưởng của hệ sợi nấm Vân chi trong nuôi cấy lỏng; Từ đó, cho thấy sinh khối sợi nấm Vân chi tăng mạnh nhất từ 48 - 72 giờ, hoạt lực của pellet mạnh nhất từ 72h - 84 h.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trịnh Tam Kiệt và các tác giả (2001), *Danh lục các loài thực vật Việt Nam*, phần nấm, Nhà xuất bản Nông nghiệp.

2. Jr-Hui Lin, Shang-Shyng Yang, *Mycelium and polysaccharide production of Agaricus blazei Murrill by submerged fermentation*, Graduate Institute of Microbiology and Biochemistry, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, 2006;39:98-108

3. Yang, Q.Y. & S. C. Jong, 1989. "Medicinal Mushrooms in China". Mushroom Science XII (Part 1) 631-643.

4. Yan Chang-wei, Chen he, Qin jun-zhe, Chen yi-ding, 2003. *Studies on Liquid Inoculum Filtration and Cultivated Condition of Flammulina velutipes. Edible Fungi of China*. College of Life Science & Engineering, Shaanxi University of Science & Technology, Xianyang, 71208.

Ngày nhận bài: 25/4/2013

Người phản biện: PGS. TS. Lê Huy Hàm
ngày 15/5/2013

Ngày duyệt đăng: 3/6/2013

NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC VÀ ĐA DẠNG DI TRUYỀN CỦA MỘT SỐ CHỦNG NẤM SÒ VUA (*PLEUROTUS ERYNGII*)

Nguyễn Thị Bích Thủy, Khuất Hữu Trung,
Ngô Xuân Nghiễn, Cồ Thùy Vân,
Trịnh Tam Kiệt

SUMMARY

Studies on biological characteristics and genetic diversity of *Pleurotus eryngii* strains

The King Oyster mushroom strains was cultivated on agar medium. The experiment results indicated that the King Oyster mushroom mycelium grew best at 26 °C± 1. when the temperature is below 22 degrees, body fruit formation is appeared, body fruit formation of E1-E5 strains do not develop into mature body fruit, E6 strains develop into mature fruit.

Studies of genetic diversity in six *Pleurotus eryngii* strains with 23 RAPD primers. Results obtained: The genetic similarity coefficient of the samples ranged from 0.64 to 0.85; coefficient of genetic similarity of E6 strain with other strains is low (0.64 to 0.68); two samples 3 and 4 have the highest similarity coefficient is 0.85.