

KHẢO SÁT ĐIỀU KIỆN NHÂN GIỐNG NẤM QUẾ LINH *Humphreya endertii* TỪ VƯỜN QUỐC GIA PHƯỚC BÌNH

NGUYỄN NGỌC AN¹, NGUYỄN THỊ DIỆU HẠNH¹, TRƯƠNG VÕ ANH DŨNG^{2,3},
GIẢNG DUY TÂN¹, PHẠM TẤN VIỆT^{1*}

¹Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh

²Khoa Sinh học và Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học tự nhiên

³Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh

* Tác giả liên hệ: phamtanviet@iuh.edu.vn

DOIs: <https://doi.org/10.46242/jstiuh.v62i02.4786>

Tóm tắt: Tầm quan trọng của nấm dược liệu được khẳng định trong lĩnh vực y học từ nhiều thế kỷ qua. Các nghiên cứu về giá trị dược liệu của nấm linh chi được thực hiện ngày càng nhiều, điều này tạo cơ sở cho việc phát triển công nghệ nuôi trồng của nhóm nấm này. Nấm quế linh *Humphreya endertii* được phát hiện trong những năm gần đây tại vườn quốc gia Cát Tiên và vườn quốc gia Phước Bình đã được xác định là loài nấm có giá trị dược liệu cao và cần được mở rộng sản xuất. Trong nghiên cứu này, các điều kiện nhân giống nấm quế linh đã được xác định với môi trường nhân giống cấp 1 được điều chỉnh từ môi trường PDA với dịch chiết từ 200g khoai lang/L nước thay cho khoai tây và pH 7,0. Môi trường nhân giống meo hạt cấp 2 cho kết quả tốt nhất với môi trường lúa bỏ sung 2,5% cám gạo, 2,5% cám bắp và 0,5% pepton. Đồng thời, môi trường nhân giống cấp 3 với cơ chất mật cưa cao su có bổ sung 5,0% cám gạo, 0,5% urea, 0,1% MgSO₄ là môi trường giá môi thuận lợi cho sự dòng hóa cơ chất của hệ sợi tơ nấm quế linh. Như vậy, các môi trường thích hợp cho sự nhân giống các cấp của nấm quế linh đã được xác định và là cơ sở để phát triển công nghệ nuôi trồng loại nấm này trong tương lai.

Từ khóa: *Humphreya endertii*, nấm quế linh, nấm dược liệu, môi trường nhân giống

1. GIỚI THIỆU

Giá trị dược liệu và tầm quan trọng của nấm ngày càng được khẳng định ở cả phương Đông và phương Tây trong nhiều thế kỷ qua [1, 2]. Căn cứ trên các báo cáo được ghi nhận, có khoảng 140.000 loài nấm đã được định danh và các chất chuyển hóa của chúng có khả năng kháng oxy hóa, kháng khuẩn, kháng virus, kháng nấm, chống khối u, điều hòa miễn dịch, [2, 3]. Các nghiên cứu về giá trị dược liệu của nấm được tiến hành trên nhiều loài khác nhau như nấm nhộng trùng thảo (*Cordyceps militaris*), nấm đông trùng hạ thảo (*Ophiocordyceps sinensis*), nấm linh chi (*Ganoderma* spp.), nấm vân chi (*Trametes* spp.), nấm thượng hoàng (*Phellinus igniarius*), nấm hương (*Lentinula* sp.), nấm trà (*Tylophylus* sp.) [4]. Ngoài ra, một số loài nấm ăn như nấm kim châm (*Flammulina velutipes*), nấm rơm (*Volvariella volvacea*), nấm bào ngư (*Pleurotus* spp.) nấm mộc nhĩ (*Auricularia polytricha*), nấm ngọc châm (*Hypsizygus marmoreus*), nấm mỡ (*Agaricus bisporus*), nấm đùi gà (*Pleurotus eryngii*) đã được nghiên cứu và chứng minh có giá trị dinh dưỡng cao cũng như sở hữu các hoạt tính chống oxy hoá [5-8].

Trong số các loài nấm đã được nghiên cứu về giá trị dược liệu, nhóm nấm linh chi được xem là nhóm nấm có vai trò quan trọng, tham gia vào việc điều trị các bệnh như ung thư, tiêu đường, cao huyết áp, Trong đó, nấm linh chi đã được nuôi trồng và thương mại hoá từ những năm 1970 [9, 10]. Nhiều hợp chất sinh học như polysaccharide, triterpenoid, steroid, lucidenic N acid, ganoderic acid, ganodermanontriol, các protein điều chỉnh miễn dịch FIPs (Fungal Immunomodulation Proteins) trong nấm linh chi đã được chứng minh có vai trò quan trọng làm dược liệu để hỗ trợ điều trị hiệu quả các loại bệnh khác nhau [9, 11-13].

Bên cạnh việc nghiên cứu các giá trị dược liệu của các loài nấm nói chung và nhóm nấm linh chi nói riêng, việc phát triển các loài nấm mới trong nhóm nấm này là cần thiết. Năm 2009, nấm quế linh *Humphreya endertii* đã được nhóm tác giả Lê Xuân Thám phát hiện đầu tiên tại vườn quốc gia Cát Tiên (Đồng Nai – Lâm Đồng) và năm 2016, sự hiện diện của loài nấm này tiếp tục được ghi nhận ở vườn quốc gia Phước Bình (Ninh Thuận) [14, 15]. Khả năng kháng khuẩn và khả năng gây độc tế bào ung thư NCI H460 và HepG2 của loài nấm này đã được chứng minh [16]. Như vậy, với các giá trị dược liệu đã được ghi nhận của nấm quế linh, việc phát triển nuôi trồng loài nấm này ở nước ta là một nhiệm vụ thiết thực. Trong nhiệm vụ bảo tồn nguồn gen của quốc gia, Vườn quốc gia Phước Bình – Ninh Thuận đã tiến hành nuôi trồng thử

nghiệm bước đầu các loài nấm linh chi trong họ Ganodermataceae, trong đó có nấm quế linh *Humphreya endertii*. Để phát triển quy trình nuôi trồng các loại nấm, cần nghiên cứu chọn lọc ra các môi trường dinh dưỡng và điều kiện thích hợp cho từng bước trong quá trình nhân giống. Do đó, trong nghiên cứu này, các công thức môi trường phù hợp cho việc nhân giống nấm ở các cấp đã được nghiên cứu và thiết lập, tạo cơ sở để ứng dụng vào thực tế sản xuất, góp phần bảo tồn và phát triển thêm một loài nấm quý tiềm năng của Việt Nam.

2. VẬT LIỆU & PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Phân lập nấm quế linh

Mẫu nấm quế linh *Humphreya endertii* được thu nhận tại Vườn quốc gia Phước Bình, Ninh Thuận, Việt Nam [15] và được phân lập trên môi trường PDA (Potato Dextrose Agar), ủ tại nhiệt độ phòng ($30^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$) cho tơ nấm phát triển. Các ống giống nấm gốc được cấy chuyển trên môi trường PDA và được lưu trữ trong tủ mát 4°C cho các thí nghiệm tiếp theo.

2.2. Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng cấp 1 lên sự sinh trưởng tơ nấm quế linh

Để kiểm tra ảnh hưởng của các yếu tố môi trường dinh dưỡng lên sự phát triển của hệ sợi tơ nấm quế linh, tơ nấm quế linh được nuôi ủ trong các môi trường khác nhau về giá trị pH, thành phần dịch chiết từ thực vật và nguồn đạm bổ sung.

Môi trường thạch PDA và môi trường lỏng PDB (Potato Dextrose Broth) được điều chỉnh ở các giá trị pH khác nhau (pH 5,0-pH 9,0) được cho vào các vật chứa tương ứng là đĩa Petri (12 ml/đĩa) và lọ thủy tinh (50 ml/lọ). Tơ nấm quế linh được nhân giống trên môi trường PDA và được cấy vào các đĩa Petri và các lọ thủy tinh với lượng giống bằng nhau (kích thước mẫu tơ 5 mm x 5 mm). Các lô thí nghiệm được ủ tại nhiệt độ phòng và theo dõi sự phát triển hệ sợi tơ nấm bằng cách đo đường kính hệ sợi tơ nấm trên đĩa Petri theo ngày và sinh khối khô (gram) thu được sau 14 ngày nuôi ủ trong môi trường lỏng.

Khảo sát ảnh hưởng của dịch chiết thực vật lên sự phát triển của tơ nấm được thực hiện trên 3 loại dịch chiết của khoai tây, khoai lang, khoai mỡ. Dịch chiết được chuẩn bị bằng cách nấu 200 g khoai mỗi loại trong 1 lít nước cho đến khi khoai mềm thì thu lấy dịch và loại bỏ phần xác bã. Phần dịch chiết của 200g khoai sẽ được sử dụng cho 1 lít môi trường. Các môi trường khác nhau về thành phần dịch chiết cũng được chuẩn bị ở dạng rắn và lỏng và sự phát triển hệ sợi tơ nấm quế linh được kiểm tra tương tự như trên.

Nguồn đạm được thử nghiệm là pepton, cao nấm men, bột trùn (trùn quế được phân hủy triệt để bằng enzyme (Protease SEB-Neutral PL lỏng xuất xứ Ấn Độ được công ty Hưng Thịnh Việt Nam cung cấp) và sấy phun để thu nhận ở dạng bột khô) với hàm lượng 5 g/lít môi trường. Môi trường PDA và PDB được bổ sung các nguồn đạm khác nhau và sử dụng để khảo sát tốc độ phát triển của hệ sợi tơ nấm quế linh tương tự như đã đề cập ở trên.

2.3. Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng meo hạt lên sự phát triển tơ nấm quế linh

Môi trường meo hạt được sử dụng để khảo sát là hạt thóc được nấu nứt vỏ. Các thành phần dinh dưỡng bổ sung vào lúa bao gồm cám gạo, cám bắp, pepton và urea với các công thức phối trộn như: MH1 (bổ sung 5% cám gạo); MH2 (bổ sung 5% cám bắp); MH3 (bổ sung 2,5% cám gạo và 2,5% cám bắp); MH4 (bổ sung 2,5% cám gạo, 2,5% cám bắp và 0,5% pepton). Tơ nấm được cấy vào các môi trường meo hạt khác nhau và đo chiều dài phát triển của hệ sợi tơ nấm theo 2 hướng của bình meo theo ngày. Tốc độ phát triển của hệ sợi tơ nấm được tính theo chiều dài lan tơ/ngày (mm/ngày).

2.4. Khả năng dòng hóa cơ chất trên môi trường giá môi bổ sung dinh dưỡng khác nhau

Tốc độ dòng hóa cơ chất của tơ nấm quế linh được kiểm tra trên môi trường với cơ chất là mùn cưa cao su và bổ sung thêm các thành phần khác như cám gạo, cám bắp, urea, MgSO_4 . Sự phối trộn theo các nghiệm thức như sau: GM1 (bổ sung 5% cám gạo); GM2 (bổ sung 5% cám bắp); GM3 (bổ sung 5% cám gạo và 0,5% urea); GM4 (bổ sung 5% cám gạo, 0,5% urea, 0,1% MgSO_4). Các môi trường giá môi khác nhau được đóng vào các bịch Poly Propylen chuyên dụng trong trồng nấm với trọng lượng ~600 g/bịch và được cấy meo hạt sau khi đã hấp khử trùng tại 121°C trong 2 giờ. Khả năng dòng hóa cơ chất được xác định theo chiều dài phát triển của hệ sợi tơ nấm (theo 4 hướng của bịch phôi) theo thời gian cho đến khi phủ đầy cơ chất.

2.5. Phương pháp thống kê và xử lý số liệu

Các thí nghiệm được thực hiện với 3 lần lặp lại, Số liệu thu thập được tính giá trị trung bình các lần lặp lại, độ lệch chuẩn. Tất cả các số liệu được xử lý bằng công cụ Data analysis trong Microsoft excel 365 và thống kê bằng phần mềm Statgraphics XVIII (One-way ANOVA, n=3).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

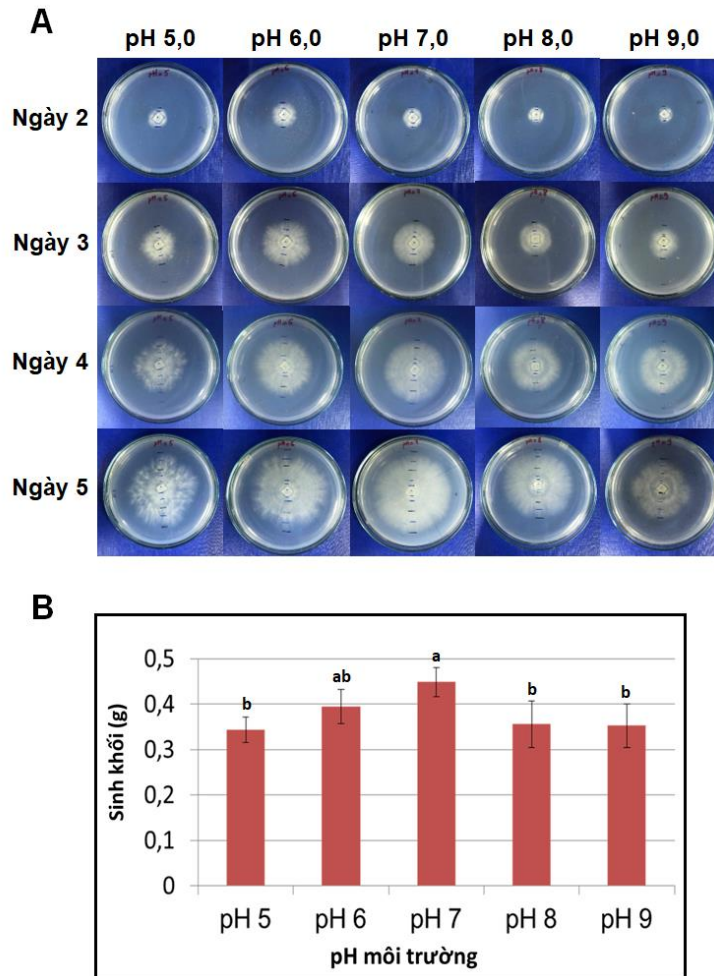
3.1. Ảnh hưởng của pH môi trường lên sự phát triển của hệ sợi tơ nấm quế linh

Tơ nấm quế linh có thể sinh trưởng và phát triển trong môi trường có phổ pH rộng từ 5,0–9,0. Hệ sợi tơ nấm quế linh phát triển và tạo thành vòng lan tơ sau 2 ngày nuôi ủ, tơ nấm phát triển đều ở các môi trường có pH khác nhau. Tơ nấm tiếp tục phát triển theo thời gian nuôi ủ, tuy nhiên, có sự ảnh hưởng của pH lên chiều dài hệ sợi tơ nấm được ghi nhận (Hình 1A). Tơ nấm phát triển mạnh trong môi trường có pH trong khoảng 6,0–7,0 với bán kính hệ sợi tơ tương ứng $40,6 \pm 0,8$ mm và $43,0 \pm 0,6$ mm sau 5 ngày nuôi ủ. Hệ sợi tơ nấm ở các điều kiện pH 5,0, 8,0 và 9,0 có bán kính tương tự nhau trong khoảng 34,6–38,1 mm, đồng thời có sự khác biệt trong cấu trúc của hệ sợi tơ nấm khi quan sát bằng mắt thường. Hệ sợi tơ nấm phát triển đều, mật độ dày và sát bề mặt thạch trong môi trường pH 7,0. Mật độ của hệ sợi tơ nấm giảm trong các môi trường có pH acid (pH 5,0) hoặc kiềm (pH 9,0). Đặc biệt ở môi trường pH 5,0, hệ sợi tơ nấm thưa, rời bồng, không sát bề mặt thạch. Kết quả tương tự được quan sát thấy trong sự hình thành sinh khối của hệ sợi tơ nấm quế linh trong các môi trường lỏng có pH khác nhau (Hình 1B).

Bảng 1: Đường kính hệ sợi tơ nấm trên môi trường thạch có pH khác nhau. (a,b,c,d) Các chữ cái viết khác nhau trong cùng một hàng biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa ($p < 0.05$).

	pH 5,0	pH 6,0	pH 7,0	pH 8,0	pH 9,0
Ngày 1	Tơ nấm bắt đầu phát triển				
Ngày 2	$6,3 \pm 0,4^a$	$6,2 \pm 0,4^a$	$5,3 \pm 0,4^b$	$4,2 \pm 0,2^c$	$4,0 \pm 0,0^c$
Ngày 3	$12,3 \pm 0,6^a$	$12,5 \pm 0,2^a$	$12,3 \pm 0,0^a$	$9,4 \pm 0,2^b$	$7,5 \pm 1,0^c$
Ngày 4	$24,9 \pm 0,8^c$	$31,0 \pm 0,3^a$	$28,1 \pm 0,6^b$	$23,6 \pm 0,8^c$	$21,3 \pm 1,2^d$
Ngày 5	$36,5 \pm 1,1^d$	$43,0 \pm 0,6^a$	$40,6 \pm 0,8^b$	$38,1 \pm 0,3^c$	$34,6 \pm 1,6^d$
Ngày 6	$51,0 \pm 1,0^b$	$56,5 \pm 0,3^a$	$55,8 \pm 0,4^a$	$49,4 \pm 1,1^b$	$51,2 \pm 1,4^b$

Sinh khối của hệ sợi tơ nấm được hình thành nhiều nhất trong môi trường có pH 7,0 với $0,449 \pm 0,032$ g, tiếp theo là sinh khối trong môi trường pH 6,0 với $0,395 \pm 0,037$ g. Sinh khối hệ sợi tơ nấm trong điều kiện pH 5,0, 8,0 và 9,0 có giá trị tương đương nhau từ $0,343 \pm 0,028$ g đến $0,356 \pm 0,051$ g, phân tích thống kê cho thấy không có sự khác biệt trong 3 điều kiện pH này. Ảnh hưởng của pH lên sự phát triển của hệ sợi tơ nấm cũng được kiểm tra trong các nghiên cứu của Jo và cộng sự (2009) trên nấm linh chi *Ganoderma applanatum*, kết quả được báo cáo cho thấy 6 dòng linh chi *G. applanatum* thích nghi tốt trong điều kiện pH 6,0–9,0 [17]. Một số nghiên cứu trên các dòng linh chi *G. lucidum* thì pH thích hợp cho sự phát triển của hệ sợi tơ là khoảng 5,0–9,0 và 5,5–6,0 [18, 19]. Như vậy, tơ nấm quế linh có thể phát triển trong môi trường có khoảng pH rộng 5,0–9,0 và tốt nhất là khoảng pH trung tính 7,0.



Hình 1: Ảnh hưởng của pH môi trường lên sự phát triển của hệ sợi tơ nấm quế linh. (A) Hệ sợi tơ nấm trên môi trường thạch; (B) Sinh khối hệ sợi tơ nấm trong môi trường lỏng sau 14 ngày nuôi ủ. (a,b) Các chữ cái viết khác nhau biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa ($p < 0.05$).

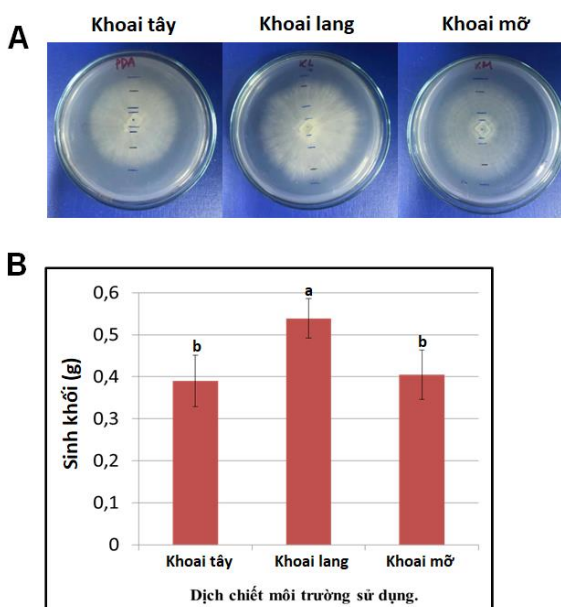
3.2. Ảnh hưởng của dịch chiết thực vật lên sự phát triển của hệ sợi tơ nấm quế linh

Thành phần dinh dưỡng có vai trò quan trọng trong sự sinh trưởng và phát triển của sinh vật. Trong công nghệ nuôi trồng nấm, môi trường thạch PDA thường được sử dụng để phân lập và nhân giống cấp 1. Dịch chiết khoai tây trong môi trường PDA sẽ cung cấp các thành phần protein, vitamin và khoáng chất cho sự phát triển của hệ sợi tơ nấm. Bên cạnh đó, dịch chiết từ các loại thực vật cũng được sử dụng trong nghiên cứu vi sinh vật học. Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của dịch chiết của khoai lang và khoai mỡ lên sự phát triển của hệ sợi tơ nấm quế linh đã được khảo sát, tạo cơ sở cho việc sử dụng môi trường thay thế hoặc thiết lập môi trường thích hợp cho quá trình nhân giống nấm. Kết quả thể hiện ở Hình 2 cho thấy cả 3 loại dịch chiết đều hỗ trợ cho sự sinh trưởng và phát triển của hệ sợi tơ nấm quế linh, trong đó, môi trường sử dụng dịch chiết khoai lang cho kết quả tốt nhất với bán kính của hệ sợi tơ nấm là $38,3 \pm 0,5$ mm, cao hơn môi trường sử dụng dịch chiết khoai mỡ và khoai tây tương ứng là $31,7 \pm 0,5$ mm và $27,6 \pm 0,3$ mm sau 4 ngày nuôi ủ (Hình 2A). Hơn nữa, mật độ hệ sợi tơ nấm trong môi trường dịch chiết khoai lang cũng dày hơn, tơ nấm phân bố đều hơn so với 2 môi trường dịch chiết còn lại. Kết quả tương tự khi thu nhận sinh khối hệ sợi tơ nấm trong môi trường lỏng với $0,539 \pm 0,047$ g ở môi trường dịch chiết khoai lang, cao hơn 33%–38,2% so với 2 môi trường còn lại (Hình 2B). Không có sự khác biệt giữa 2 môi trường sử dụng dịch chiết khoai tây và khoai mỡ khi phân tích sinh khối hệ sợi tơ thu được sau 14 ngày nuôi ủ (ANOVA, $n=3$, độ tin cậy 95%).

KHẢO SÁT ĐIỀU KIỆN NHÂN GIỐNG...

Bảng 2: Đường kính hệ sợi tơ nấm trên môi trường có các dịch chiết khác nhau. (a,b,c) Các chữ cái viết khác nhau trong cùng một hàng biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa ($p < 0.05$).

	Dịch chiết khoai tây (PDA)	Dịch chiết khoai lang	Dịch chiết khoai mỡ
Ngày 1	Tơ nấm bắt đầu phát triển		
Ngày 2	6,8±0,3 ^b	7,8±0,3 ^a	8,0±0,8 ^a
Ngày 3	11,8±0,2 ^c	18,3±0,5 ^a	14,1±0,8 ^b
Ngày 4	27,6±0,3 ^c	38,3±0,5 ^a	31,7±0,5 ^b
Ngày 5	43,9±1,1 ^c	48,6±0,4 ^a	46,5±0,3 ^b
Ngày 6	55,4±1,5 ^b	59,5±0,9 ^a	58,0±1,0 ^a



Hình 2: Ảnh hưởng của các dịch chiết khoai lên sự phát triển của tơ nấm. (A) Hệ sợi tơ nấm trên đĩa Petri sau 4 ngày nuôi ủ; (B) Sinh khối hệ sợi tơ nấm trong môi trường lỏng sau 14 ngày. (a,b) Các chữ cái viết khác nhau biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa ($p < 0.05$).

Sự phát triển nổi trội của hệ sợi tơ nấm quý linh trong môi trường chứa dịch chiết khoai lang có thể được giải thích do trong hàm lượng đường cao trong khoai lang là có vai trò bổ sung trực tiếp và dồi dào nguồn Carbon và năng lượng cho sự sinh trưởng của hệ sợi tơ nấm bên cạnh các thành phần, protein, vitamin và khoáng chất khác. Trong nghiên cứu của Ilag và cộng sự (1982), môi trường dịch chiết khoai lang và môi trường dịch chiết khoai tây PDA đã được thử nghiệm trên 7 loại nấm khác nhau (1 chủng nấm rơm và 6 chủng nấm mốc), hệ sợi tơ nấm trên môi trường chứa dịch chiết khoai lang đã cho kết quả lan tơ cao hơn hệ sợi tơ nấm trên môi trường chứa dịch chiết khoai tây (PDA) [20]. Kết quả tương tự cũng được tìm thấy trong nghiên cứu của Amadi và cộng sự (2012) về sự phát triển ưu thế của hệ sợi tơ nấm trên môi trường dịch chiết khoai lang so với môi trường PDA [21]. Vậy dịch chiết khoai lang được lựa chọn để nuôi cấy hệ sợi tơ nấm quý linh trên môi trường thạch nhân giống cấp 1.

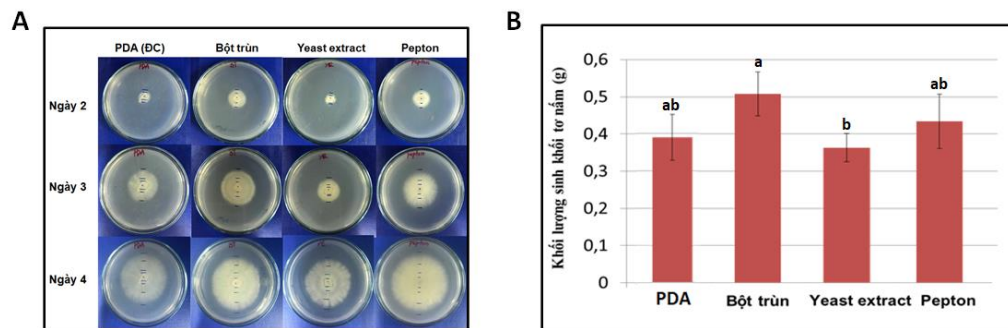
3.3. Ảnh hưởng của các nguồn đạm lên sự phát triển của hệ sợi tơ nấm quý linh

Nguồn đạm ảnh hưởng lớn đến sự sinh trưởng và phát triển của tơ nấm và thường được bổ sung vào môi trường nhân giống để gia tăng sự sinh trưởng của tơ nấm. Trong nghiên cứu này, ba nguồn đạm pepton, cao nấm men, bột trùn được bổ sung vào môi trường nhân giống cấp 1 và tốc độ tăng trưởng hệ sợi tơ nấm

trên môi trường rắn cũng như môi trường lỏng đã được ghi nhận (Hình 3).

Bảng 3: Đường kính hệ sợi tơ nấm trên môi trường có nguồn đạm khác nhau. (a,b,c) Các chữ cái viết khác nhau trong cùng một hàng biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa ($p < 0.05$).

	Bột trùn	Cao nấm men	Pepton
Ngày 1	Tơ nấm bắt đầu phát triển		
Ngày 2	8,0±0,5 ^a	6,4±0,2 ^b	8,4±0,2 ^a
Ngày 3	15,6±0,4 ^a	10,7±1,4 ^b	15,4±0,3 ^a
Ngày 4	31,0±0,2 ^b	23,2±1,3 ^c	32,0±0,4 ^a
Ngày 5	47,1±0,1 ^b	37,6±0,4 ^c	50,3±0,9 ^a
Ngày 6	59,2±0,6 ^b	52,6±0,5 ^c	63,2±0,9 ^a



Hình 3: Ảnh hưởng của các nguồn đạm khác nhau lên sự phát triển của hệ sợi tơ nấm quý linh. (A) Hệ sợi tơ nấm trên môi trường thạch; (B) Sinh khối hệ sợi tơ nấm. (a,b) Các chữ cái viết khác nhau biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa ($p < 0.05$).

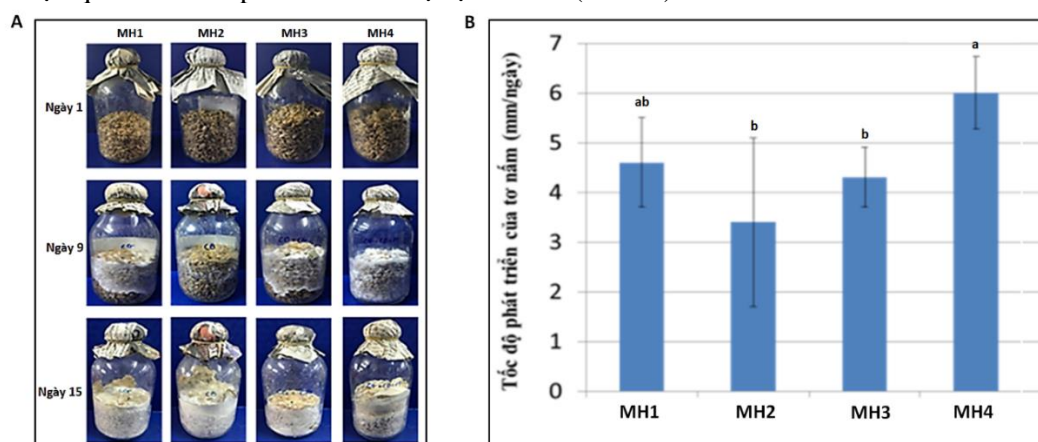
Hệ sợi tơ nấm quý linh trên môi trường PDA bổ sung nguồn đạm pepton có tốc độ lan tơ nhanh nhất, đạt 32,0±0,4 mm vào ngày thứ 4 và cao hơn tốc độ phát triển của hệ sợi tơ nấm trên môi trường PDA bổ sung nguồn đạm bột trùn ~1 mm. Môi trường PDA bổ sung nguồn đạm cao nấm men cho kết quả thấp nhất trong 3 nghiệm thức với 23,2±1,3 mm. Tuy nhiên, kết quả thu nhận sinh khối của hệ sợi tơ nấm trong môi trường lỏng cho thấy môi trường bổ sung bột trùn với 0,508±0,059 g sinh khối cao hơn hai môi trường khảo sát còn lại. Điều này có thể giải thích bởi thành phần của nguồn đạm pepton bao gồm các chuỗi peptide ngắn và acid amin tự do dễ dàng được tơ nấm hấp thu và sử dụng cho sự sinh trưởng, trong khi cao nấm men chứa lượng lớn protein chưa được phân cắt làm hạn chế sự hấp thu của tơ nấm. Đồng thời, bột trùn là sản phẩm của sự dịch thủy phân trùn quế, chứa một lượng đa dạng các oligopeptide, các acid amin tự do không thể thay thế và khoáng chất nên hệ sợi tơ nấm dễ dàng hấp thu và kích thích sự tăng trưởng của hệ sợi tơ nấm hơn so với cao nấm men. Trong nghiên cứu của Jo và cộng sự (2009), nguồn cao nấm men được bổ sung vào môi trường khoáng tối thiểu đã thúc đẩy sự phát triển của hệ sợi tơ nấm *G. applanatum*, trong khi Jeong và cộng sự (2005) thì cho thấy nguồn nitrogen tối ưu là bột cám bắp (corn steep power) cho *G. applanatum* [17, 22]. Tuy nhiên, khi so sánh với kết quả nuôi cấy tơ nấm quý linh trên các môi trường có dịch chiết khác nhau, tốc độ phát triển cũng như sinh khối tơ nấm trên môi trường dịch chiết khoai lang cao hơn nổi bật (0,539±0,047 g), điều này có thể nhận định tơ nấm quý linh không phải nhóm nấm ưa đạm, và nguồn đạm chỉ cần ở lượng đủ cho sự sinh trưởng của tơ nấm.

3.4. Sự phát triển của hệ sợi tơ nấm quý linh trên môi trường meo hạt được bổ sung dinh dưỡng khác nhau

Nhân giống nấm trên môi trường meo hạt giúp tăng nhanh sinh khối hệ sợi tơ nấm và thường được thực hiện trong các quy trình trồng nấm hiện nay. Thành phần dinh dưỡng trong môi trường meo hạt cũng ảnh

KHẢO SÁT ĐIỀU KIỆN NHÂN GIỐNG...

hường đến tốc độ sinh trưởng của hệ sợi tơ nấm. Trong khảo sát này, môi trường meo hạt được bổ sung thêm các thành phần cám gạo, cám bắp, pepton và sự tăng trưởng của hệ sợi tơ nấm theo thời gian nuôi ủ được ghi nhận qua chiều dài phát triển của hệ sợi tơ nấm (Hình 4).

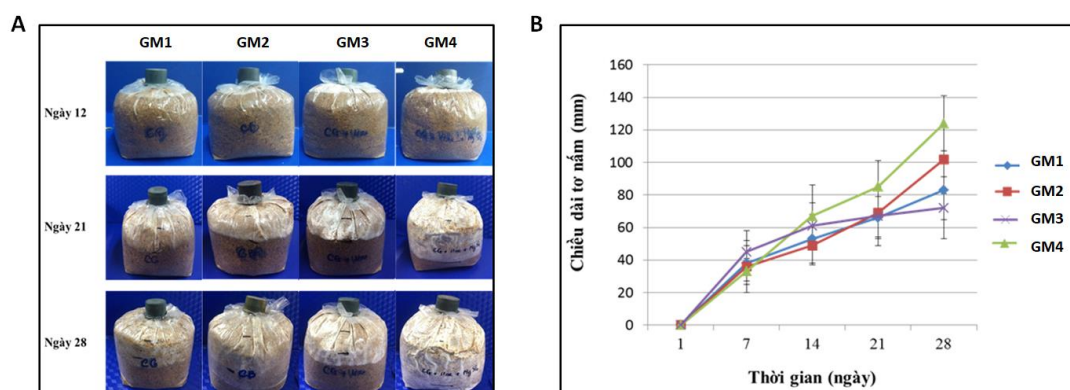


Hình 4. Sự phát triển của hệ sợi tơ nấm quế linh trên các môi trường meo hạt khác nhau. (A) Hệ sợi tơ nấm trên môi trường meo hạt; (B) Tốc độ phát triển của hệ sợi tơ nấm (a,b) Các chữ cái viết khác nhau biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa ($p < 0.05$).

Sự tăng trưởng của hệ sợi tơ nấm quế linh trên môi trường meo hạt có bổ sung 5% cám bắp (MH2) cho kết quả thấp nhất với chiều dài 31,0±2,8 mm, tiếp đến là môi trường có bổ sung thêm 2,5% cám gạo với 39,0±3,4 mm, và môi trường 5% cám gạo (MH1) là 42,0±2,4 mm sau 9 ngày nuôi ủ. Sự phát triển của hệ sợi tơ nấm được ghi nhận là tốt nhất khi nuôi trên môi trường có bổ sung cám bắp, cám gạo và pepton với chiều dài hệ sợi tơ 54,0±3,5 mm sau 9 ngày nuôi ủ và tốc độ tăng trưởng trung bình 6,0±0,9 mm/ngày, ngoài ra, mật độ của hệ sợi tơ nấm trên môi trường này cũng cho thấy dày hơn, tơ nấm bám sát môi trường, hệ sợi tơ phân nhánh tốt. Điều này có thể được giải thích bởi sự cung cấp thêm nguồn đường, khoáng vitamin từ cám gạo cũng như bổ sung thêm nguồn đạm từ pepton cho sự phát triển mạnh mẽ của hệ sợi tơ nấm. Như vậy, trong quy trình nhân giống nấm quế linh, môi trường meo hạt cho sự tăng sinh khối hệ sợi nên được bổ sung thêm cám gạo và pepton.

3.5. Tốc độ dòng hóa cơ chất của tơ nấm quế linh trên môi trường giá môi bổ sung các nguồn dinh dưỡng khác nhau

Trên các môi trường giá môi với cơ chất là mùn cưa cao su được bổ sung thành phần dinh dưỡng khác nhau như cám gạo, cám bắp, urea và $MgSO_4$, tốc độ dòng hóa cơ chất của tơ nấm quế linh cho thấy có sự khác biệt giữa các môi trường giá môi (Hình 5).



Hình 5. Sự phát triển của hệ sợi tơ nấm quế linh trên các môi trường giá môi khác nhau. (A) Hệ sợi tơ nấm trên môi trường giá môi; (B) Chiều dài hệ sợi tơ nấm ở các thời gian nuôi ủ khác nhau trên các môi trường giá môi.

Sau 21 ngày nuôi ủ, hệ sợi tơ nấm có chiều dài tương tự nhau ở ba môi trường bổ sung cám gạo (GM1), cám bắp (GM2) và cám gạo cùng urea (GM3), trong khi đó môi trường GM4 được bổ sung cám gạo, urea và MgSO₄ thì cho thấy hệ sợi tơ phát triển nhanh nhất và cao hơn 3 môi trường còn lại. Kết quả của chiều dài hệ sợi tơ nấm được quan sát sau 28 ngày nuôi ủ cho thấy hệ sợi tơ nấm phủ đầy bịch phôi của GM4 trong khi tơ nấm ở các môi trường khác vẫn chưa phủ kín bịch phôi. Ngoài ra, hệ sợi tơ nấm trên môi trường GM4 còn cho thấy tơ nấm trắng đều, mật độ hệ sợi tơ dày hơn các môi trường còn lại. Điều này cho thấy tốc độ dòng hóa cơ chất của hệ sợi tơ nấm quế linh trên môi trường GM4 với thành phần bổ sung là cám gạo, urea và MgSO₄ tốt nhất. Điều này có thể giải thích do các yếu tố dinh dưỡng như nguồn đạm, khoáng, vitamin có trong thành phần cám gạo và urea giúp, bên cạnh đó, việc bổ sung MgSO₄ làm tăng thêm nguồn ion kim loại mà hoạt động như các cofactor của nhóm enzyme phân hủy cơ chất làm mục gỗ đặc trưng trong họ nấm linh chi. Môi trường giá môi này cũng tương tự như môi trường để trồng nấm linh chi *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst trong nghiên cứu của Jeewanthi và cộng sự (2017) [23]. Do đó, hệ sợi tơ nấm trên môi trường này thể hiện tốc độ dòng hóa cơ chất cao nhất, phù hợp cho việc phát triển môi trường giá môi để nuôi trồng loại nấm này.

4. KẾT LUẬN

Việc nhân giống là giai đoạn không thể thiếu trong công nghệ nuôi trồng nấm. Sự phát triển của giống nấm ảnh hưởng đến lợi nhuận và năng suất của quá trình nuôi trồng nấm. Trong nghiên cứu này, các môi trường nhân giống thích hợp cho nấm quế linh được kiểm tra, thành phần môi trường dinh dưỡng ở các cấp nhân giống được xác định. Môi trường nhân giống cấp 1 thích hợp cho loài nấm này là môi trường được chuẩn bị từ dịch chiết của 200g khoai lang/L và 20g glucose, môi trường nhân giống cấp 2 là môi trường hạt từ lúa có bổ sung 2,5% cám gạo, 2,5% cám bắp và 0,5% pepton, và môi trường nhân giống cấp 3 với mùn cưa cao su thêm 5,0% cám gạo, 0,5% urea, 0,1% MgSO₄. Kết quả thu được của nghiên cứu này tạo điều kiện cho sự phát triển của một loài nấm dược liệu mới tại Việt Nam.

LỜI CẢM ƠN

Chúng tôi xin chân thành cảm ơn ông Nguyễn Công Vân và ông Lưu Văn Luông, Vườn quốc gia Phước Bình, Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh Ninh Thuận đã cung cấp giống nấm quế linh cho các thí nghiệm trong đề tài nghiên cứu khoa học này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Yihuai. G., Eli .C., Shufeng Z., *Immunomodulating Activities of Ganoderma, a Mushroom with Medicinal Properties*. Food Reviews International, 2004. **20**(2): p. 123-161.
2. Wasser, S. P., *Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms*. Applied microbiology and biotechnology, 2011. **89**(5): p. 1323-1332.
3. Yang, Q. and Jong, S., *Medicinal mushrooms in China*. Mushroom Sci, 1989. **12**: p. 631-643.
4. Trịnh Tam Kiệt, *Nấm lớn ở Việt Nam Tập 1*. 2011, NXB Khoa học Tự nhiên và Công nghệ. 83-86.
5. Nguyễn Lê Anh Đào và cộng sự, *Ảnh hưởng của cao chiết từ ba loài nấm ăn đến khả năng chống oxy hoá dầu cá*. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ, 2021. **57** (CĐ Thủy Sản (Aquaculture)): p. 91-98.
6. Ngô Xuân Mạnh, Lương Thị Hà và Ngô Xuân Trung, *Hàm lượng polyphenol và khả năng chống oxy hóa của chúng trong một số loại nấm ăn*. Tạp chí Khoa học và Phát triển, 2015. **13**(2): p. 272-278.
7. Hung, P. V. and Nhi, N. N. Y., *Nutritional composition and antioxidant capacity of several edible mushrooms grown in the Southern Vietnam*. International Food Research Journal, 2012. **19**(2): p. 611.
8. Lê Thanh Hải, Nguyễn Minh Trí và Huỳnh Nguyễn Duy Bảo, *Nghiên cứu tách chiết và khảo sát hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết nấm rơm*. Tạp chí Khoa học - Công nghệ Thủy sản, 2013(4): p. 95-99.
9. Xuanwei. Z., et al, *Ganodermataceae: natural products and their related pharmacological functions*. The American Journal of Chinese Medicine, 2007. **35**(4): p. 559-574.
10. Ma. H. T., Hsieh. J. F., and Chen. S. T., *Anti-diabetic effects of Ganoderma lucidum*. Phytochemistry, 2015. **114**: p. 109-113.
11. Trung. H. V, et al., *The triterpenoid and steroid from the fruiting body of Ganoderma applanatum (Pers.) Pat. in Viet Nam*. Vietnam Journal of Science and Technology, 2018. **56**(5): p. 550-556.
12. Yu. C, et al., *Ganoderma: A Cancer Immunotherapy Review*. Frontiers in Pharmacology, 2018. **9**(1217).

13. Nghien. N. X., et al, *Morphological Characteristics, Yield Performance, and Medicinal Value of Some Lingzhi Mushroom (Ganoderma lucidum) Strains Cultivated in Tam Dao, Vietnam*. Vietnam Journal of Agricultural Sciences, 2019. **2**(1): p. 321-331.
14. Lê Xuân Thám và cộng sự, *Phát hiện đại diện đầu tiên của chi *Humphreya stey*. mới được phát hiện ở vườn quốc gia Cát Tiên (Đồng Nai-Lâm Đồng)-loài nấm Linh chi endertii: *Humphreya endertii**. Tạp chí sinh học, 2009. **31**(1): p. 39-45.
15. *Bảo tồn nguồn gen nấm Linh chi Vườn Quốc gia Phước Bình*. Báo tin tức, 2019. Ngày 9/9/2019 (<https://baotintuc.vn/kinh-te/bao-ton-nguon-gen-nam-linh-chi-vuon-quoc-gia-phuoc-binh-20190909084816058.htm>).
16. Nguyễn Thị Diệu Hạnh và cộng sự, *Khả năng gây độc tế bào ung thư và kháng khuẩn của dịch chiết *Ganoderma lucidum* và *Humphreya endertii* từ vườn quốc gia Phước Bình*. Journal of Science and Technology-IUH, 2019. **39**(03).
17. Jo. W. S., et al., *Culture conditions for the mycelial growth of *Ganoderma applanatum**. Mycobiology, 2009. **37**(2): p. 94-102.
18. Jayasinghe, C., et al., *Favorable culture conditions for mycelial growth of Korean wild strains in *Ganoderma lucidum**. Mycobiology, 2008. **36**(1): p. 28-33.
19. Cho, S. M., et al., *Morphological characterization and culture conditions of a white mutant of *Ganoderma lucidum**, Korean Journal of (Applied) Microbiology & Biotechnology, 1993. **21**(6): p. 520-526.
20. Ilag, L. L., Pua. A. R., and Marfil. V. A, *Sweet potato sucrose agar-an inexpensive culture medium for fungal growth [Philippines]*. Philippine Phytopathology, 1982.
21. Amadi, O. and A. Moneke, *Use of starch containing tubers for the formulation of culture media for fungal cultivation*. African Journal of Microbiology Research, 2012. **6**(21): p. 4527-4532.
22. Jeong, Y., et al., *Optimum conditions for the mycelial growth and exo-biopolymer production by a submerged culture of *Elfvigia applanata**. Kor. J. Mycol. News Letter, 2005. **17**(1): p. 97.
23. Jeewanthi. L. A. M. N., Ratnayake. K., and Rajapakse. P., *Growth and yield of reishi mushroom [*Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst] in different sawdust substrates*. Journal of Food and Agriculture, 2017. **10**(1&2): p. 8-16.

STUDY ON PROPAGATION OF *Humphreya endertii* FROM PHUOC BINH NATIONAL PARK

NGOC AN NGUYEN¹, HANH THI DIEU NGUYEN¹, DUNG VO ANH TRUONG^{2,3}, DUY TAN GIANG¹, TAN VIET PHAM^{1*}

¹*Institute of Biotechnology and Food technology, Industrial University of Ho Chi Minh City*

²*Department of Biology and Biotechnology, University of Science.*

³*Vietnam National University, Ho Chi Minh City*

**Corresponding author: phamtanviet@iuh.edu.vn*

Abstract: The importance of medicinal mushrooms has been known for centuries. The increasing number of studies on the medicinal value of Ganodermataceae resulted in the development of cultivation technology of these mushrooms. *Humphreya endertii*, discovered in recent years in Cat Tien and Phuoc Binh national parks, has been identified as a potential medicinal mushroom. Therefore, more studies are needed to be carried out in order to artificially cultivate and produce this species. In this study, media of *Humphreya endertii* propagation were successfully determined. The agar-media were modified from PDA (Potato Dextrose Agar) containing extract of 200g sweet potato instead of potatoes and has a pH value of 7.0. The development of seed spawn was best achieved on rice grain supplemented with 2.5% rice bran, 2.5% corn bran, and 0.5% peptone. Moreover, the compost composed of rubber sawdust substrate and supplemented with 5.0% rice bran, 0.5% urea, 0.1% MgSO₄ was found to be a favorable substrates for the mycelial growth. These defined suitable media for the propagation of *Humphreya endertii* mushroom have place a good foundation for *Humphreya endertii* cultivation in the near future.

Keywords: *Humphreya endertii*, que linh, medicinal mushroom, mushroom propagating media

Ngày nhận bài: 05/10/2022

Ngày chấp nhận đăng: 21/12/2022