

ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI VÀ ĐIỀU KIỆN SINH TRƯỞNG HỆ SỢI, NUÔI TRỒNG QUẢ THỂ NẤM LINH CHI ĐEN (*Amauroderma rugosum*) Am20

Trần Thu Hà¹, Lê Thanh Nhân², Nguyễn Văn Giang^{3*}

¹Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển nấm, Viện Di truyền Nông nghiệp

²Viện Công nghệ sinh học Ứng dụng

³Học viện Nông nghiệp Việt Nam

*Tác giả liên hệ: nvgiang@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 15.08.2024

Ngày chấp nhận đăng: 16.10.2024

TÓM TẮT

Nấm linh chi đen (*Amauroderma rugosum*) có chứa nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học, được xem như một loại dược liệu truyền thống ở nhiều nước châu Á. Tuy nhiên, các nghiên cứu về loài nấm này trên thế giới cũng như ở Việt Nam còn rất khiêm tốn. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm mô tả hình thái, phân tích phát sinh loài và tối ưu hóa các điều kiện nhân nuôi hệ sợi, quả thể của chủng nấm linh chi đen Am20 thu thập tại Đồng Nai, Việt Nam. Kết quả nghiên cứu về hình thái, kết hợp với dữ liệu trình tự nucleotide vùng ITS cho thấy mẫu nấm linh chi đen Am20 có độ tương đồng cao với loài *A. rugosum*. Nghiên cứu cũng đã lần đầu tiên nhân nuôi thành công hệ sợi và quả thể loài nấm này ở Việt Nam. Hệ sợi chủng nấm *A. rugosum* Am20 sinh trưởng thuận lợi nhất trên môi trường PDA, pH 6-7, nhiệt độ 30°C. Hệ sợi của chủng nấm này có thể nhân nuôi được trên các loại hạt ngũ cốc như lúa tẻ, lúa mì. Chủng nấm Am20 có khả năng hình thành, phát triển quả thể trên cơ chất mùn cưa, lõi ngô. Thành phần cơ chất thích hợp nhất là 89% mùn cưa, 10% cám gạo, 1% CaCO₃; năng suất nấm đạt 21,1 ± 2,45 g/kg cơ chất khô.

Từ khóa: *Amauroderma rugosum*, pH, nhiệt độ, hạt ngũ cốc, cơ chất.

Morphological Characteristics and Culture Conditions for Mycelial Growth and Fruiting of Black Lingzhi Mushroom (*Amauroderma rugosum*) Am20

ABSTRACT

Amauroderma rugosum contains various biologically active compounds and is considered a traditional medicine in many Asian countries. However, there was little research on this mushroom species in the world and in Vietnam. This study aimed to describe the morphology, analyze the phylogeny, and optimize the conditions for culturing the mycelium and fruiting bodies of the strain Am20 collected in Dong Nai, Vietnam. The results of the morphological study, combined with molecular data on the ITS region sequence showed that the strain Am20 had high similarity to other strains of *A. rugosum*. The culturing results showed the mycelia of *A. rugosum* strain Am20 grew well in a PDA medium at pH 6-7 and a temperature of 30°C. Mycelia of this strain could be cultured on the cereal grains such as rice and wheat. The *A. rugosum* strain Am20 was able to form and develop fruiting bodies on substrates containing sawdust and corn cobs. The most suitable substrate was 89% sawdust, 10% rice bran, and 1% powder CaCO₃. The yield reached 21.1 ± 2.45 g/kg dry substrates.

Keywords: *Amauroderma rugosum*, pH, temperature, cereal grains, substrates, mycelial growth, fruiting body formation.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Chi nấm linh chi đen *Amauroderma* được Murill đề cập lần đầu tiên vào năm 1905. Phương pháp phân loại nấm dựa trên các dữ

liệu phân tử kết hợp mô tả hình thái đã xếp các loài *Amauroderma* vào một nhóm chung *Amauroderma* s.lat. (Costa-Rezende & cs., 2017). Sun & cs. (2020) đã dựa trên đặc điểm bề mặt lỗ bào tăng đổi màu khi bị thương đã nhóm

2 loài *Amauroderma rude* và *A. rugosum* vào một chi mới tên là *Sanguinoderma*.

Các loài nấm thuộc chi *Amauroderma* cùng với các loài thuộc chi *Ganoderma* có tiềm năng trong điều trị bệnh và được sử dụng như một loại dược liệu truyền thống ở nhiều nước châu Á (Hapuarachchi & cs., 2018). Hai loài *A. rude* và *A. rugosum* đã được thuần hóa thành công ở Trung Quốc và được sử dụng điều trị ung thư, hạ huyết áp, giảm viêm, lợi tiểu và tăng cường khả năng miễn dịch (Lin & cs., 2021). Trong nấm *A. rugosum* có chứa các hợp chất có hoạt tính sinh học cao như sterol, flavonoid, phenolic, polysaccharide, triterpene và các loại axit béo (Zheng & cs., 2022). *A. rugosum* phân bố chủ yếu tại các vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới như Trung Quốc, nam Thái Bình Dương, Đài Loan, Cộng hòa Ghi-nê và Úc. Tuy nhiên, nấm *A. rugosum* chưa được nghiên cứu rộng rãi về mặt khoa học (Zheng & cs., 2022), các nghiên cứu về loài *A. rugosum* trên thế giới chỉ tập trung đến việc thiết lập lại hệ thống phân loại của chi *Amauroderma* và phân tích thành phần hóa học, tiềm năng dược liệu của loài nấm này.

Ở Việt Nam, loài *A. rugosum* có phạm vi phân bố khá rộng. Nhiều nghiên cứu điều tra về nấm đã ghi nhận sự xuất hiện của loài nấm này ở Việt Nam như Trần Thị Phú & cs. (2018), Nguyen & Khanh (2017) và Dương Minh Tuyên & cs. (2022). Mặc dù vậy, các nghiên cứu về điều kiện nhân nuôi nhân tạo nấm linh chi đen *A. rugosum* ở Việt Nam gần như chưa có. Nghiên cứu này được thực hiện với chủng nấm linh chi đen *A. rugosum* Am20 thu thập tại Mã Đà, Đồng Nai với mục đích mô tả đặc điểm hình thái giải phẫu, phân tích phát sinh loài và đánh giá đặc điểm sinh trưởng, phát triển của chủng nấm trong điều kiện nhân tạo. Kết quả của nghiên cứu góp phần khai thác và phát triển các loài nấm *Amauroderma* có giá trị dược liệu cao ở nước ta.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thu thập, phân lập chủng nấm

Nấm linh chi đen chủng Am20 được thu thập tại Khu Bảo tồn thiên nhiên - Văn hóa

Đồng Nai (GPS: 11°12'13.3"N 107°01'12.8"E). Mô sinh dưỡng của quả thể nấm Am20 được phân lập và nhân nuôi trên môi trường PDA (Potatoes Dextrose Agar), nhiệt độ 25°C, không cần ánh sáng. Hệ sợi của chủng nấm bảo quản ở nhiệt độ 8°C tại Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển nấm, Viện Di truyền.

2.2. Hình thái giải phẫu

Các đặc điểm hình thái vĩ mô như quả thể, mũ nấm, cuống nấm, thịt nấm, bào tăng được mô tả dựa trên kết quả quan sát tại thực địa và mẫu vật tiêu bản. Mã màu được xác định theo Kornerup & Wanscher (1978). Dữ liệu hình thái vĩ mô thu được khi quan sát các mẫu dưới kính hiển vi quang học theo các phương pháp được mô tả bởi Li & cs. (2014). Các đặc điểm và phép đo vĩ mô được thực hiện trên các chế phẩm tiêu bản nhuộm Cotton Blue và thuốc thử Melzer. Các đặc điểm như sợi nấm, bào tử đảm được quan sát và chụp ảnh ở độ phóng đại 1.000 lần bằng kính hiển vi và định lượng bằng phần mềm Piximetre version 5.2.

2.3. Tách chiết DNA và thực hiện phản ứng PCR

DNA từ hệ sợi của chủng nấm được tách chiết bằng phương pháp của Winnepeninckx & cs. (1993) có hiệu chỉnh. Phản ứng PCR khuếch đại vùng trình tự ITS được thực hiện với cặp mồi ITS1/ITS4 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' và 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White & cs., 1990). Tổng thể tích của một phản ứng là 25µl, bao gồm 5,0µl Reaction buffer; 0,5µl DNA polymerase; 0,5µl mỗi xuôi ITS1; 0,5µl mỗi ngược ITS4; 15,5µl nước cất và 3,0µl DNA khuôn. Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng ExoSAP-IT và đọc trình tự tại Công ty 1st Base, Malaysia.

2.4. Phân tích trình tự DNA và dựng cây phát sinh loài

Trình tự nucleotide vùng ITS của chủng Am20 được phân tích và so sánh với các trình tự nucleotide vùng ITS của các loài nấm lớn khác bằng công cụ BLASTn trên Genbank để xác định loài tương đồng. Cây phát sinh loài được

phân tích dựa trên phương pháp Maximum likelihood bằng công cụ MEGA X với giá trị bootstrap 1.000 lần lặp lại để đánh giá độ mức độ ủng hộ nhánh của cây (Kumar & cs., 2018).

2.5. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy

Các môi trường nuôi cấy: MEA (Malt Extract Agar, g/l): Peptone 3,0; malt extract 30; agar 15); PDA (Potatoes Dextrose Agar, g/l): Dịch chiết từ 200g khoai tây, D-glucose 20, agar 20); SDA (Sabouraud Dextrose Agar, g/l): D-glucose 20, peptone 10, agar 15 và CZ (Czapek-Dox, g/l): Sucrose 30; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5; K_2HPO_4 1,0; KH_2PO_4 1,0; $NaNO_3$ 3,0; KCl 0,5; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,01; agar 20) được sử dụng để đánh giá khả năng sinh trưởng của hệ sợi chủng nấm Am20. Môi trường sau khi hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C, trong 20 phút được rót vào các đĩa Petri (80 × 15mm). Mỗi đĩa Petri được cấy một miếng giống Am20 (Ø 8,0mm). Nuôi sợi nấm chủng Am20 ở nhiệt độ 25°C, không cần ánh sáng. Thí nghiệm lặp lại 3 lần, mỗi nhắc lại bố trí 5 đĩa Petri/công thức.

2.6. Ảnh hưởng của pH

Môi trường tối ưu cho sự sinh trưởng của chủng nấm Am20 được sử dụng để đánh giá tác động của pH. Giá trị pH 5, 6, 7, 8 của môi trường trước khử trùng được hiệu chỉnh bằng dung dịch NaOH 1N hoặc HCl 1N và ổn định bằng đệm HEPES với hàm lượng 7,0 g/l (Trần Thu Hà & cs., 2023). Thí nghiệm lặp lại 3 lần, mỗi nhắc lại bố trí 5 đĩa Petri/công thức.

2.7. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Nhiệt độ tối ưu cho sự sinh trưởng hệ sợi của chủng nấm Am20 được kiểm tra bằng cách nuôi hệ sợi nấm ở nhiệt độ 20, 25, 30 và 35°C. Sử dụng môi trường và giá trị pH tối ưu được lựa chọn ở mục 2.5 và 2.6. Thí nghiệm lặp lại 3 lần, mỗi nhắc lại bố trí 5 đĩa Petri/công thức.

2.8. Ảnh hưởng của các loại hạt ngũ cốc

Bốn loại hạt được sử dụng làm giá thể để nhân nuôi chủng nấm Am20 gồm lúa tẻ, lúa mì, bo bo và kê. Ngâm hạt trong nước sạch 5-6 giờ,

loại bỏ tạp chất và luộc sôi trong 30-45 phút. Trộn đều hạt với 1,0% $CaCO_3$, chia vào các ống nghiệm (200 × 25mm), mỗi ống nghiệm chứa 50g giá thể và hấp khử trùng ở 121°C trong 60 phút (Nguyễn Thị Luyện & cs., 2023). Mỗi ống nghiệm được cấy một miếng giống nấm Am20 (10 × 10mm) và nuôi sợi ở nhiệt độ 25°C, không cần ánh sáng (Wannasawang & cs., 2023). Thí nghiệm lặp lại 3 lần, mỗi nhắc lại bố trí 5 ống nghiệm/công thức.

2.9. Ảnh hưởng của thành phần cơ chất

Hai loại nguyên liệu chính được sử dụng để nuôi trồng chủng Am20 là mùn cưa cao su và lõi ngô nghiền. Mùn cưa, lõi ngô được xử lý bằng nước vôi (pH13-14), ủ 7 ngày và phối trộn theo các tỷ lệ 100:0, 75:25, 50:50, 25:75 và 0:100. Các công thức cơ chất được bổ sung 10% cám gạo, 1% $CaCO_3$ và hiệu chỉnh độ ẩm đạt 62-65%, pH6-7. Cơ chất được đóng vào các túi nilon PE chịu nhiệt (370 × 190mm), mỗi túi chứa 1,0kg cơ chất và hấp khử trùng ở 121°C, trong 180 phút. Mỗi túi cơ chất được cấy 10g giống nấm Am20 trên giá thể hạt lúa tẻ, nuôi sợi ở nhiệt độ 25°C, không cần ánh sáng. Chăm sóc quả thể chủng Am20 ở nhiệt độ 25-30°C, độ ẩm 85-95%, ánh sáng 500lux. Thí nghiệm lặp lại 3 lần, mỗi nhắc lại được bố trí 10 túi cơ chất/công thức.

2.10. Các chỉ tiêu theo dõi

Tốc độ sinh trưởng hệ sợi (mm/ngày) là phần chiều dài hệ sợi nấm sinh trưởng được trong một đơn vị thời gian (Nguyen & cs., 2019). Sinh khối hệ sợi (gam) xác định sau 6 ngày nuôi sợi, hệ sợi chủng Am20 được tách ra khỏi môi trường nuôi cấy bằng cách đun sôi và rửa sạch lại bằng nước nóng, sau đó sấy khô đến khối lượng không đổi (Wannasawang & cs., 2023). Mật độ hệ sợi nấm được quan sát và đánh giá theo 4 mức: Hệ sợi dày/C (Compact), hệ sợi hơi dày/SC (Somewhat Compact), hệ sợi hơi mỏng/ST (Somewhat Thin), hệ sợi mỏng/T (Thin) (Jo & cs., 2009).

Thời gian hình thành quả thể (ngày) là thời gian được tính từ khi cấy giống đến khi mầm quả thể nấm đầu tiên xuất hiện. Khối lượng quả thể (gam/túi) được xác định bằng khối lượng nấm khô thu được trên một túi cơ chất. Năng

suất (g/kg) là khối lượng nấm khô thu được trên 1,0kg cơ chất khô (Wannasawang & cs., 2023).

2.11. Xử lý số liệu

Kết quả nghiên cứu được xử lý thống kê bằng phần mềm Excel 2019 và Graphpad Prism 9.1. Sự khác biệt giữa các công thức được đánh giá bằng phân tích phương sai ANOVA một chiều (one-way ANOVA) và so sánh cặp đôi theo chuẩn Tukey ở mức ý nghĩa $P < 0,05$.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

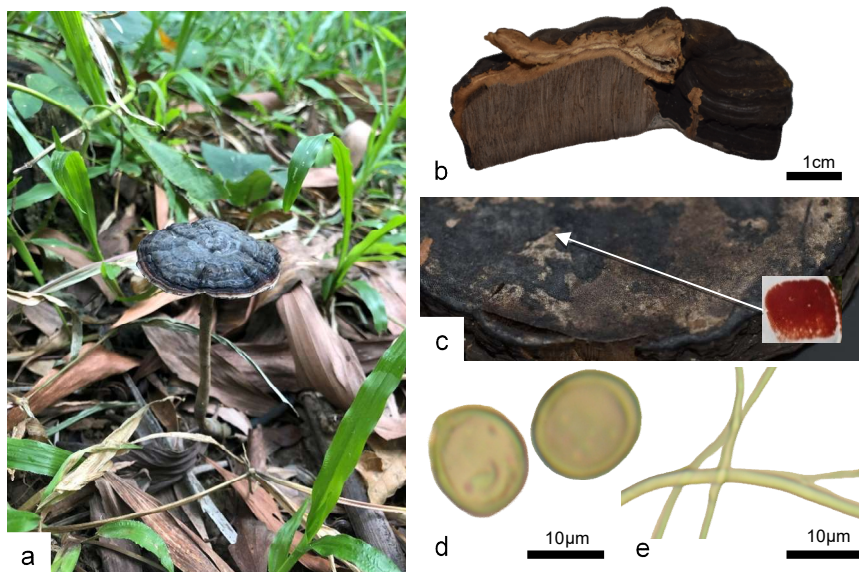
3.1. Đặc điểm hình thái giải phẫu

Quả thể nấm chủng Am20 dạng gần tròn, lồi; kích thước $5,0 \times 5,5\text{cm}$. Mũ nấm màu nâu đen đến xám, xỉn màu, nhiều nếp gấp gồ ghề; bề mặt có các vòng đồng tâm. Mép mũ nấm tù, màu đen bóng, xẻ vào mũ nấm (Hình 1a). Lớp mô thịt màu trắng kem khi tươi, màu nâu nhạt khi khô, dày đến 1,0cm ở gần gốc, cứng (Hình 1b). Lớp bào tử màu nâu đậm, không phân tầng, dày đến 1,2cm (Hình 1b). Bề mặt lỗ bào tử màu xám, nhanh chóng chuyển sang màu đỏ khi bị thương, sau đó chuyển dần thành màu đen; các lỗ tròn hoặc đa giác, 3-5 lỗ/mm

(Hình 1c). Cuống nấm hình trụ, kiểu đính tâm, màu xám, phủ lông mịn.

Bào tử đảm có hình cầu, không cắt đầu, 2 lớp vỏ, màu vàng nhạt, kích thước $9,6-11,5 \times 7,8-9,4\mu\text{m}$ (Hình 1d). Hệ sợi 3 dạng trimitic; sợi nguyên thủy thành mỏng, phân nhánh, $1,5-2\mu\text{m}$; sợi bên có thành dày, phân nhánh, $2\mu\text{m}$; sợi cứng thành dày đến gần đặc, $2,0-3,0\mu\text{m}$ (Hình 1e). Lớp biểu bì gồm các tế bào hình chùy xếp sát nhau, màu vàng nâu.

Từ các kết quả nghiên cứu về hình thái cho thấy chủng nấm Am20 có các đặc điểm hình thái vĩ mô, vi mô tương đồng với các mô tả của Hapuarachchi & cs. (2018) và Sun & cs. (2020) về loài *Amauroderma rugosum*. Hapuarachchi & cs. (2018) và Sun & cs. (2020) cho biết, loài *A. rugosum* (= *Sanguinoderma rugosum*) có quả thể hàng năm, quả thể có cuống; mũ nấm xỉn màu, có các vòng đồng tâm; mép mũ nấm nhăn nheo, tù hoặc gợn sóng; thịt nấm dày đến 0,8cm, lớp trên màu nâu nhạt; bề mặt lỗ bào tử màu trắng kem khi tươi và chuyển màu đỏ máu khi bị thương; lỗ tròn đến đa giác, 3-5 hoặc 5-7 lỗ/mm; bào tử đảm hình cầu, màu vàng nâu, kích thước $(10,1-11,6) \times (7,9-9,4)\mu\text{m}$ đến $(10,2-11,3) \times (8,3-9,2)\mu\text{m}$.

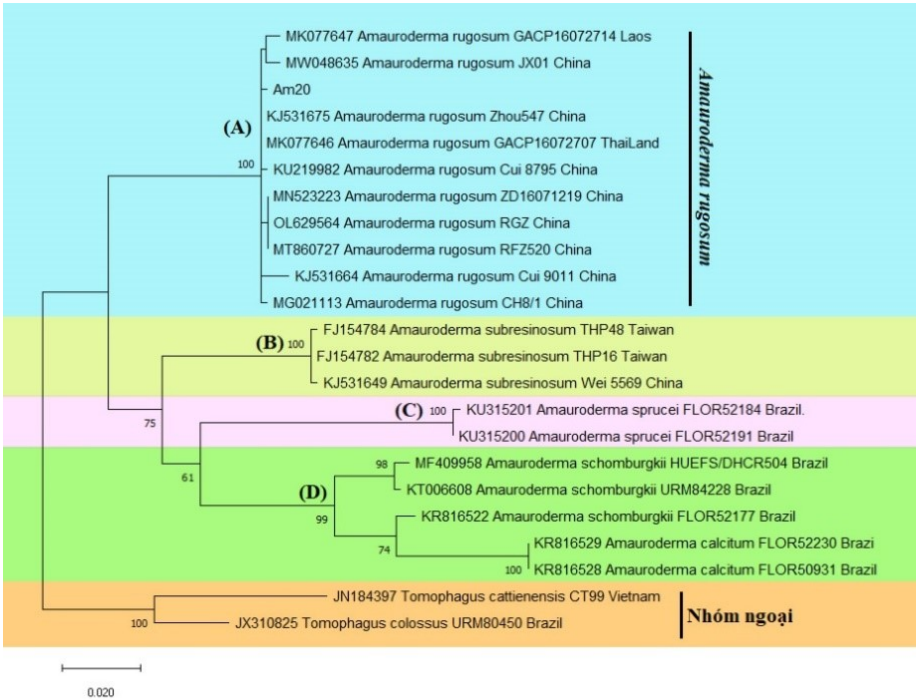


Ghi chú: a: Quả thể nấm; b: Lớp mô thịt và ống nấm; c: Bề mặt lỗ bào tử; d: Bào tử đảm; e: Hệ sợi nấm.

Hình 1. Các đặc điểm hình thái của mẫu Am20

Bảng 1. Kết quả so sánh trình tự nucleotide vùng ITS của chủng Am20 trên Genbank

Loài	Mã trình tự	Chiều dài (bp)	Độ tương đồng (%)	Độ bao phủ %	Nguồn gốc
<i>Amauroderma rugosum</i>	MK077647	660	99,65	70,0	Lào
<i>Amauroderma rugosum</i>	KU219982	619	99,82	79,0	Trung Quốc
<i>Amauroderma rugosum</i>	KJ531675	635	99,82	79,0	Trung Quốc
<i>Amauroderma rugosum</i>	OL629564	640	99,83	81,0	Trung Quốc
<i>Amauroderma rugosum</i>	MK077646	635	99,66	81,0	Thái Lan
<i>Amauroderma rugosum</i>	MN523223	606	99,66	81,0	Trung Quốc



Hình 2. Cây phát sinh loài của nấm *A. rugosum* chủng Am20 dựa trên trình tự nucleotid vùng ITS. Giá trị ML bootstrap trên 50%

3.2. Cây phát sinh loài của nấm linh chi đen chủng Am20

Trình tự nucleotide vùng ITS của chủng nấm Am20 có độ dài 716bp, kết quả so sánh với các trình tự tham chiếu đã được công bố trên Genbank cho thấy, chủng nấm Am20 có độ tương đồng cao (trên 99%) với các loài *A. rugosum* như MK077647, KU219982, KJ531675, OL629564, MK077646, MN523223 (Bảng 1).

Cây phát sinh loài được xây dựng bằng phần mềm MEGA X dựa trên dữ liệu nucleotide của mẫu Am20 và 22 trình tự truy xuất từ

Genbank. Trong đó *Tomophagus cattiensis* CT199 và *Tomophagus colossus* URM80450 được sử dụng làm nhóm ngoại. Phân tích cây phát sinh loài (Hình 2) cho thấy các trình tự ITS này có thể phân chia thành 4 nhóm: Nhóm A, bao gồm trình tự mẫu Am20 và 10 trình tự *A. rugosum* được truy xuất trên Genbank, giá trị bootstrap là 100%. Nhóm B, bao gồm các trình tự *A. subresinosum*, giá trị bootstrap là 100%. Nhóm C, bao gồm các trình tự *A. sprucei* có nguồn gốc từ Brazil với giá trị bootstrap 100%. Nhóm D, bao gồm các trình tự *A. schomburgkii*, *A. calcitum* có nguồn gốc từ Brazil với giá trị bootstrap 99%. Nhóm này có

thể chia thành hai nhóm phụ: nhóm phụ thứ nhất bao gồm *A. schomburgkii* HUEFS/DHCR504 và *A. schomburgkii* UMR 84288 với giá trị bootstrap 98%; nhóm phụ thứ hai gồm *A. schomburgkii* FLOR52177 và *A. calcitum* FLOR52230, FLOR50931 với giá trị bootstrap 74%.

3.3. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy

Hệ sợi nấm *A.rugosum* chủng Am20 có thể sinh trưởng trên 3 loại môi trường MEA, PDA, SDA. Trên môi trường CZ không ghi nhận sự sinh trưởng của hệ sợi nấm chủng Am20. Khả năng sinh trưởng hệ sợi của chủng Am20 trên môi trường MEA, PDA và SDA có sự sai khác thống kê $P < 0,05$. Chủng nấm Am20 sinh trưởng nhanh nhất khi được nuôi trên môi trường PDA, tốc độ sinh trưởng hệ sợi đạt $6,55 \pm 0,10$ mm/ngày, sinh khối sợi nấm đạt $0,247 \pm 0,011$ g, mật độ hệ sợi hơi dày (SC, Hình 3).

Lựa chọn đúng môi trường nuôi cấy tối ưu cho sự sinh trưởng, phát triển của nấm là điều kiện cần để đảm bảo được năng suất nấm. Các môi trường như PDA, PGA (Potatose Glucose Agar), MEA và MCM (Mushroom Complete

Medium) là những môi trường được ghi nhận là tốt nhất cho sinh trưởng của nhiều loài nấm đảm. Trong đó, môi trường PDA và MEA mang lại hiệu quả tối đa đối với sinh trưởng hệ sợi nấm do chứa nhiều thành phần dinh dưỡng phù hợp (Krupodorova & cs., 2021). Mutaat & cs. (2010) cho biết, hệ sợi nấm *Amauroderma* sp. có thể sinh trưởng tốt trên môi trường PDA hoặc môi trường lỏng từ dịch chiết khoai tây.

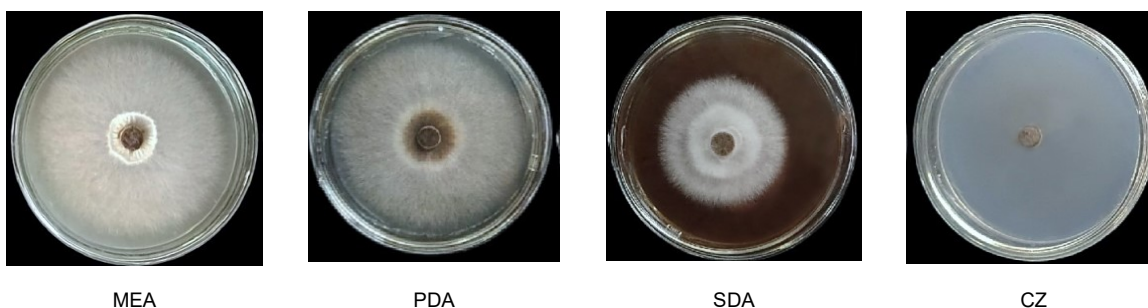
3.4. Ảnh hưởng của pH

Hệ sợi nấm chủng Am20 có thể sinh trưởng trên môi trường PDA có giá trị pH trước khử trùng trong khoảng pH từ 5-8. Tuy nhiên, tốc độ sinh trưởng, sinh khối và mật độ hệ sợi có sự sai khác ($P < 0,05$) giữa các giá trị pH. Hệ sợi nấm chủng Am20 sinh trưởng nhanh nhất tại giá trị pH 6-7, tốc độ sinh trưởng hệ sợi nấm đạt $6,36 \pm 0,12$ đến $6,58 \pm 0,07$ mm/ngày, sinh khối hệ sợi từ $0,217 \pm 0,012$ đến $0,207 \pm 0,005$ g, mật độ hệ sợi hơi dày (SC, Hình 4). Tại giá trị pH5 trước khi khử trùng, chủng Am20 sinh trưởng chậm nhất, tốc độ sinh trưởng hệ sợi đạt $3,59 \pm 0,14$ mm/ngày.

Bảng 2. Sinh trưởng hệ sợi nấm của chủng Am20 trên các loại môi trường nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy	Tốc độ sinh trưởng hệ sợi (mm/ngày)	Sinh khối hệ sợi (gam)	Mật độ hệ sợi
MEA	$6,01^b \pm 0,16$	$0,202^b \pm 0,012$	SC
PDA	$6,55^a \pm 0,10$	$0,247^a \pm 0,011$	SC
SDA	$3,87^c \pm 0,09$	$0,148^c \pm 0,018$	C
CZ	$0,0^d \pm 0,00$	$0,0^d \pm 0,0$	-

Ghi chú: Giá trị là giá trị trung bình $\pm$ SD của tốc độ sinh trưởng hệ sợi, sinh khối sợi nấm. Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột là khác nhau có ý nghĩa thống kê theo xếp hạng Duncan với $P < 0,05$.

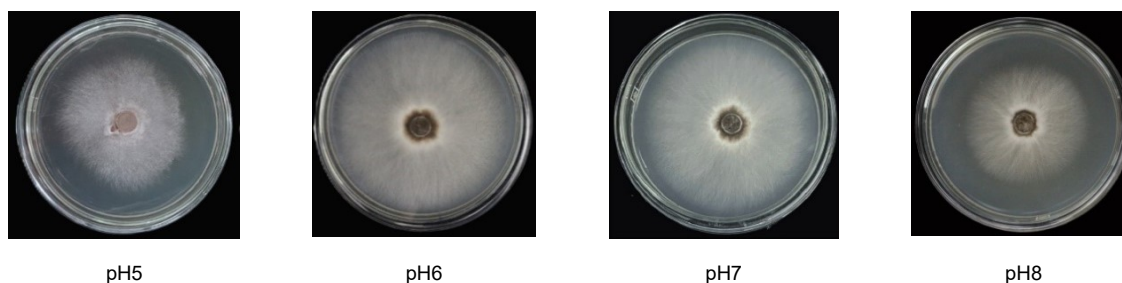


Hình 3. Hệ sợi nấm chủng Am20 sau 5 ngày nuôi sợi trên các môi trường nuôi cấy

Bảng 3. Sinh trưởng hệ sợi nấm của chủng Am20 trên các pH môi trường khác nhau

pH	Tốc độ sinh trưởng hệ sợi (mm/ngày)	Sinh khối hệ sợi (gam)	Mật độ hệ sợi
5	$3,59^c \pm 0,14$	$0,153^B \pm 0,014$	SC
6	$6,58^a \pm 0,07$	$0,242^A \pm 0,011$	SC
7	$6,36^a \pm 0,12$	$0,217^A \pm 0,012$	SC
8	$4,84^b \pm 0,08$	$0,167^B \pm 0,010$	SC

Ghi chú: Giá trị là giá trị trung bình $\pm$ SD của tốc độ sinh trưởng hệ sợi, sinh khối sợi nấm. Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột là khác nhau có ý nghĩa thống kê theo xếp hạng Duncan với $P < 0,05$.



Hình 4. Hệ sợi nấm chủng Am20 sau 5 ngày nuôi sợi trên pH môi trường khác nhau

pH môi trường tác động đến sự sinh trưởng của sợi nấm thông qua sự phân hóa chức năng của màng tế bào và ảnh hưởng đến quá trình tổng hợp chất chuyển hóa. Độ pH còn ảnh hưởng đến độ hòa tan của các loại muối và sự hấp thụ các chất cần thiết từ môi trường của màng tế bào. Mỗi loài nấm được ghi nhận sinh trưởng nhanh nhất ở một phạm vi pH nhất định, thường dao động từ 3-9 (Krupodorova & cs., 2021). Loài nấm *G. lucidum* thích hợp với pH4-9 (Nguyen & cs., 2019), *G. orbiforme* với pH4-6 (Wannasawang & cs., 2023), *A. subresinosum* với pH5 (Trần Thu Hà & cs., 2023) và *A. subrugosum* với pH 6-7,5 (Gaijuan & cs., 2015). Giá trị pH 6-7 được xác định là pH môi trường tối ưu trước khi trùng đôi với nấm *A. rugosum* chủng Am20. Kết quả này phù hợp với báo cáo của Trần Việt Hùng & cs. (2021), trong đó ghi nhận chủng nấm *A. subresinosum* gia tăng kích thước hệ sợi mạnh nhất ở giá trị pH7.

3.5. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Hệ sợi nấm chủng Am20 sinh trưởng nhanh nhất khi được nuôi ở nhiệt độ 30°C với tốc sinh

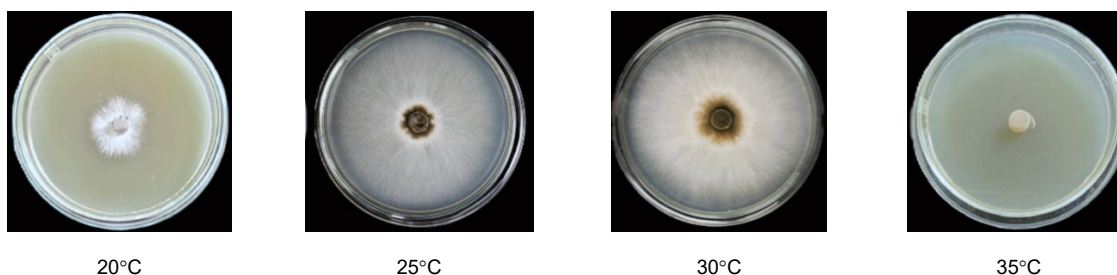
trưởng hệ sợi đạt $6,78 \pm 0,10$ mm/ngày, sinh khối hệ sợi đạt $0,304 \pm 0,008$ g, mật độ hệ sợi nấm dày (C, Hình 5). Ở nhiệt độ 20°C sinh trưởng của hệ sợi của chủng nấm giảm, tốc độ sinh trưởng hệ sợi đạt $1,72 \pm 0,06$ mm/ngày. Ở nhiệt độ 35°C hệ sợi nấm của chủng Am20 không có khả năng sinh trưởng (Bảng 4, Hình 5).

Nhiệt độ ảnh hưởng trực tiếp đến quá trình đồng hóa, vận chuyển chất dinh dưỡng, hô hấp và sinh tổng hợp của nấm (Krupodorova & cs., 2021). Phần lớn các loài nấm đảm sinh trưởng được trong phạm vi nhiệt độ nuôi cấy từ 20 đến 30°C. Jo & cs. (2006) báo cáo rằng sự sinh trưởng của hệ sợi nấm bị ức chế ở nhiệt độ cao hơn 30°C và thấp hơn 20°C. Gaijuan & cs. (2015) xác định nhiệt độ tối ưu khi nuôi sợi nấm chủng *A. subrugosum* GZ-01 là 28°C. Trần Thu Hà & cs. (2023) cho biết nhiệt độ tối ưu với chủng nấm *A. subresinosum* Am4 là 25°C. Nghiên cứu này xác định nhiệt độ thích hợp cho sự sinh trưởng hệ sợi của nấm *A. rugosum* chủng Am20 là 25-30°C, trong đó tối ưu là 30°C.

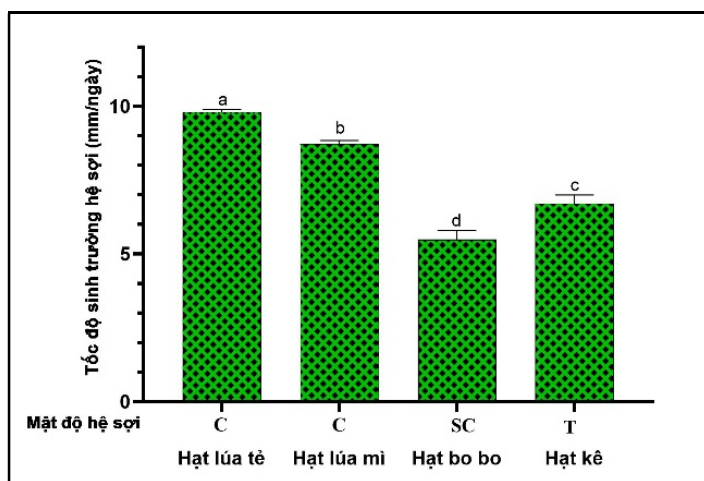
Bảng 4. Sinh trưởng hệ sợi nấm của chủng Am20 nuôi ở các nhiệt độ khác nhau

Nhiệt độ (°C)	Tốc độ sinh trưởng hệ sợi (mm/ngày)	Sinh khối hệ sợi (g)	Mật độ hệ sợi
20	1,72 ^c ± 0,06	0,080 ^c ± 0,008	SC
25	6,56 ^b ± 0,10	0,248 ^B ± 0,005	SC
30	6,75 ^a ± 0,10	0,304 ^A ± 0,008	C
35	0,0 ^d ± 0,00	0,0 ^D ± 0,00	-

Ghi chú: Giá trị là giá trị trung bình ± SD của tốc độ sinh trưởng hệ sợi, sinh khối sợi nấm. Các chữ cái khác nhau trong một cột là khác nhau có ý nghĩa thống kê theo xếp hạng Duncan với $P < 0,05$.



Hình 5. Hệ sợi nấm chủng Am20 sau 5 ngày nuôi sợi ở các nhiệt độ khác nhau



(a)



(b)

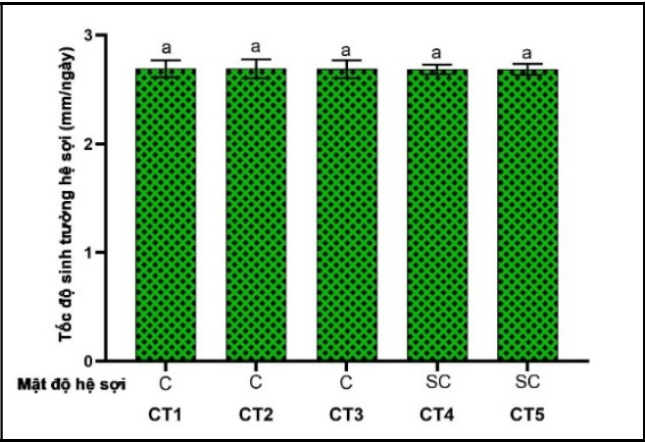
Ghi chú: 1: Hạt lúa tẻ, 2: Hạt lúa mì, 3: Hạt bo bo, 4: Hạt kê.

Hình 6. Tốc độ sinh trưởng hệ sợi (a) và mật độ hệ sợi nấm chủng Am20 sau 10 ngày nuôi sợi trên giá thể hạt (b)

3.6. Ảnh hưởng của loại giá thể hạt ngũ cốc

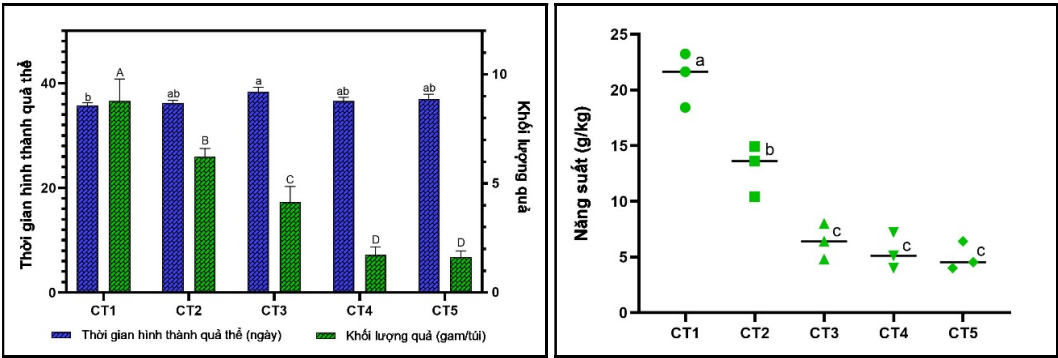
Sinh trưởng hệ sợi nấm *A. rugosum* chủng Am20 trên 4 loại giá thể hạt gồm hạt lúa tẻ, lúa mì, bobo và kê có sự sai khác thống kê $P < 0,05$ (Hình 6a). Hệ sợi nấm của chủng Am20 sinh

trưởng nhanh nhất trên giá thể hạt lúa tẻ, tốc độ sinh trưởng hệ sợi $9,78 \pm 0,11$ mm/ngày, mật độ hệ sợi dày (C, Hình 6b). Trên giá thể hạt bobo, hệ sợi của chủng nấm sinh trưởng với tốc độ chậm nhất, đạt $5,49 \pm 0,31$ mm/ngày, mật độ sợi hơi dày (SC, Hình 6b).



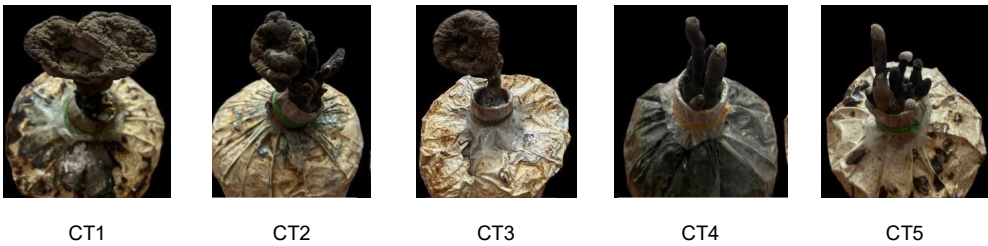
Ghi chú: CT1: 100:0, CT2: 75:2, CT3: 50:50, CT4: 25:75 và CT5: 0:100.

Hình 7. Sinh trưởng hệ sợi của chủng Am20 trên các loại cơ chất



Ghi chú: CT1: 100:0, CT2: 75:25, CT3: 50:50, CT4: 25:75 và CT5: 0:100.

Hình 8. Sinh trưởng, phát triển quả thể của chủng nấm Am20 trên các loại cơ chất



Ghi chú: CT1: 100:0, CT2: 75:25, CT3: 50:50, CT4: 25:75 và CT5: 0:100.

Hình 9. Hình thái quả thể chủng nấm Am20 trồng trên các loại cơ chất

Kích thước của hạt ngũ cốc ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng của hệ sợi nấm. Các hạt ngũ cốc có kích thước nhỏ sẽ nhanh chóng được bao bọc bởi hệ sợi nấm hơn các hạt có kích thước lớn (Devi & Sumbali, 2021). Tuy nhiên, các loại hạt ngũ cốc lớn hơn lại được ưu tiên sử dụng để

nuôi hệ sợi nấm, vì các loại hạt này thường chứa nhiều dinh dưỡng hơn, vừa hỗ trợ tốt sự sinh trưởng của sợi nấm vừa kéo dài thời gian lưu trữ giống nấm (Lee & cs., 2014). Thực tế, nhiều loại hạt ngũ cốc có kích thước lớn như hạt kê, lúa mì, cao lương, ngô, lúa đã được sử

dụng để nhân nuôi giống nấm (Baghel & cs., 2020; Devi & Sumbali, 2021; Gonkhom & cs., 2022; Wannasawang & cs., 2023).

3.7. Ảnh hưởng của thành phần cơ chất

Hệ sợi nấm chủng Am20 có thể sinh trưởng tốt trên cơ chất gồm mùn cưa cao su, lõi ngô nghiền, bổ sung 10% cám gạo và 1% CaCO_3 . Tốc độ sinh trưởng hệ sợi của chủng nấm Am20 trên các cơ chất có tỷ lệ mùn cưa : lõi ngô khác nhau không sai khác thống kê, mật độ hệ sợi từ hơi dày đến dày (Hình 7). Ngược lại, khả năng hình thành và phát triển quả thể của chủng nấm Am20 có sự sai khác giữa các công thức cơ chất ($P < 0,05$). Chủng nấm Am20 nuôi trồng trên cơ chất có tỷ lệ mùn cưa : lõi ngô là 100:0 (CT1) có thời gian hình thành quả thể ngắn nhất ($35,76 \pm 0,51$ ngày), khối lượng quả thể lớn nhất đạt $8,778 \pm 1,018$ g/túi, năng suất đạt $21,1 \pm 2,45$ g/kg cơ chất khô, quả thể dạng tròn, cân đối (Hình 9). Trên cơ chất có tỷ lệ mùn cưa:lõi ngô là 25:75 (CT4) và 0:100 (CT5) năng suất quả thể của chủng Am20 thấp nhất

Mùn cưa và lõi ngô là hai trong số những loại nguyên liệu chính để nuôi trồng nấm linh chi (Zhou, 2017). Ueitele & cs. (2014) trồng nấm linh chi *G. lucidum* trên cơ chất lõi ngô năng suất đạt 5,32%, Nguyen & cs. (2019) trồng nấm linh chi *G. lucidum* trên cơ chất mùn cưa năng suất đạt 2,49%. Năng suất của nấm linh chi phụ thuộc vào thành phần cơ chất, điều kiện môi trường và chủng giống (Ince & cs., 2024). Năng suất của nấm linh chi đen *A. elmerianum* và *A. subresinosum* trồng trên cơ chất mùn cưa đạt lần lượt là 75-125 và 56 g/kg cơ chất. Năng suất của nấm *G. carnosum* trên cơ chất có tỷ lệ mùn cưa cao chiếm ưu thế hơn, đạt 53,90 g/kg cơ chất (Baktemur & cs., 2022).

4. KẾT LUẬN

Nấm linh chi đen chủng Am20 thu thập tại Đồng Nai có đặc điểm hình thái và trình tự nucleotide vùng gen ITS tương đồng cao với loài *A. rugosum*, giá trị bootstrap trên cây phát sinh loài đạt 100%. Hệ sợi nấm *A. rugosum* chủng Am20 sinh trưởng tốt trên môi trường PDA với pH trước khử trùng là 6-7 và nhiệt độ 30°C. Các loại hạt ngũ cốc như lúa tẻ và lúa mì được sử

dụng để nhân nuôi hệ sợi chủng nấm Am20, hệ sợi của chủng nấm tăng trưởng tốt nhất trên cơ chất hạt lúa tẻ. Chủng nấm Am20 có thể hình thành, phát triển quả thể trên cơ chất gồm mùn cưa, lõi ngô nghiền được bổ sung 10% cám gạo, 1% CaCO_3 . Năng suất nấm linh chi đen *A. rugosum* chủng Am20 trên cơ chất có tỷ lệ mùn cưa : lõi ngô là 100:0 (89 mùn cưa, 10% cám gạo, 1% CaCO_3) là lớn nhất; khối lượng quả thể đạt $8,778 \pm 1,018$ gam/túi, năng suất đạt $21,1 \pm 2,45$ g/kg cơ chất khô.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Baghel D., Shukla C.S., Singh H.K., Banvasi P. & Kerketta V. (2020). Effect of cereal grains on spawn development and different substrates on growth and yield of *Hypsizygus ulmarius*. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 9(5): 2175-2181.
- Baktemur G., Kara E., Yazar M., Yilmaz N., Ađcam E., Akyildiz A. & Taskin H. (2022). Yield, quality and enzyme activity of shiitake mushroom (*Lentinula edodes*) grown on different agricultural wastes. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca. 50(1): 12553.
- Costa-Rezende R.D.H., Góes-Neto G.L., Reck M.A., Crespo E. & Drechsler-Santos E.R. (2017). Morphological reassessment and molecular phylogenetic analyses of *Amauroderma* s. lat. raised new perspectives in the generic classification of the Ganodermataceae family. Persoonia. 39: 254-269.
- Devi S. & Sumbali G. (2021). Suitability of three different cereal grains for spawn development and their impact on the growth and yield of *Macrocybe gigantea* (Massee) Pegler & Lod. Journal of Applied and Natural Science. 13(1): 204-209.
- Dương Minh Tuyền, Trương Hoàng Đan & Lý Văn Lợi (2022). Xác định giá trị và sự phân bố của nấm lớn tại khu bảo tồn thiên nhiên đất ngập nước Lũng Ngọc Hoàng. Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn. 1 + 2: 144-151.
- Gaijuan Q., Shanshan W., Quingjun C., Haolin Z. & Guoqing Z. (2015). Isolation, identification, and biological characteristics of a wild *Amauroderma* mushroom. Chinese Journal of Applied and Environmental. 21(3): 464-469.
- Gonkhom D., Luangharn T., Hyde K.D., Stadler M. & Thongklang N. (2022). Optimal conditions for mycelial growth of medicinal mushrooms belonging to the genus *Hericium*. Mycological Progress. 21: 82.
- Hapuarachchi K.K., Karunarathna S.C., Phengsintham P., Kakumyan P., Hyde K.D. & Wen T.C. (2018).

- Amauroderma* (Ganodermataceae, Polyporales)-bioactive compounds, beneficial properties and two new records from Laos. *Asian Journal of Mycology*. 1(1): 121-136.
- Ince G., Soylu M.K. & Çömlekçioğlu N. (2024). Effects of cultivation substrate composition on biological productivity and quality parameters of *Ganoderma lucidum*. *Harran Tarým ve Gıda Bilimleri Dergisi*. 28(2): 235-247.
- Jo W.S., Cho Y.Y., Cho D.H., Park S.D., Yoo Y.B. & Seo S.J. (2009). Culture conditions for the mycelial growth of *Ganoderma applanatum*. *Mycobiology*. 37(2): 94-102.
- Jo W.S., Ryu, Y.H., Choi S.G., Seo G.S., Sung J.M. & Uhm J.Y. (2006). The Culture Conditions for the Mycelial Growth of *Phellinus* spp. *Mycobiology*. 34: 200-205.
- Kornerup A. & Wanscher J.H. (1978). *Methuen Handbook of Colour*. London, Eyre Methuen, UK.
- Krupodorova T.A., Barshteyn V.Y. & Sekan, A.S. (2021). Review of the basic cultivation conditions influence on the growth of basidiomycetes. *Current Research in Environmental & Applied Mycology (Journal of Fungal Biology)*. 11(1): 494-531.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C. & Tamura K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*. 35(6): 1547-1549.
- Lee B.J., Lee M.A., Kim Y.G., Lee K.W., Lee B.E. & Seo G.S. (2014). Characteristics and suitability of various cereal grains in spawn production of button mushroom. *Journal of Mushroom*. 12: 237-243.
- Li H.J., Cui B.K. & Dai Y.C. (2014). Taxonomy and multi-gene phylogeny of *Datronia* (Polyporales, Basidiomycota). *Persoonia*. 32: 170-182.
- Lin W., Shi Y., Jia G., Sun H., Sun T. & Hou D. (2021). Genome sequencing and annotation and phylogenomic analysis of the medicinal mushroom *Amauroderma rugosum*, a traditional medicinal species in the family Ganodermataceae. *Mycologia*. 113(2): 268-277.
- Mutaat H.H., Awang M.R., Daud F., Rashid R.A. & Sum M.M.M.d-A. (2010). Mycelium characterization of the *Amauroderma* sp. collected from Royal Belum. *Research and Development Seminar 2010*. Malaysia. 43(26).
- Nguyen B.T.T, Ngo N.X., Le V.V., Nguyen L.T., Ry Kana, & 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.
- Nguyen N.P.D & Khanh T.D. (2017). Impacts of Ecological Factors on the Distribution of *Amauroderma* Murrill genus in central highlands of Vietnam. *Journal of Scientific and Engineering Research*. 4(9): 238-243.
- Nguyễn Thị Luyện, Nguyễn Thị Huyền Trang, Ngô Xuân Nghiễn & Nguyễn Xuân Cảnh (2023). Một số đặc điểm sinh trưởng hệ sợi, sự hình thành và phát triển quả thể nấm Linh chi (*Ganoderma orbiforme*) FM6 thu thập tại Vườn quốc gia Pù Mát. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*. 21(12): 1622-1634.
- Sun Y.F., Costa-Rezende D.H., Xing J.H., Zhou J.L., Zhang B., Gibertoni T.B., Gates G., Glen M., Dai Y.C. & Cui B.K. (2020). Multi-gene phylogeny and taxonomy of *Amauroderma* s. lat. (Ganodermataceae). *Persoonia*. 44: 206-239.
- Trần Thị Phú, Dương Thị Thu Trang, Võ Phước Khánh & Trương Thị Cao Vinh (2018). Đa dạng thành phần loài nấm lớn ở xã Trà Núi, huyện Bắc Trà My, tỉnh Quảng Nam. *Tạp chí Khoa học, Đại học Quảng Nam*. 16: 73-86.
- Trần Thu Hà, Nguyễn Hàm Chi & Nguyễn Văn Giang (2023). Khảo sát đặc điểm sinh trưởng hệ sợi của chủng nấm Linh chi đen *Amauroderma subresinosum* Am-4. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*. 21(12): 1647-1658.
- Trần Việt Hùng, Phan Nguyễn Trường Thắng, Dương Minh Tân; Nguyễn Phương Đại Nguyên, Trần Quốc Lộc, Đỗ Thị Hà, Nguyễn Tiến Đạt & Lê Thị Thu Hiền (2021). Nghiên cứu ứng dụng và chuyển giao công nghệ phục vụ khai thác bảo tồn và phát triển một số chế phẩm từ một vài loài nấm Linh chi (*Ganoderma* spp.) tại khu vực Tây nguyên. Báo cáo kết quả thực hiện nhiệm vụ KH&CN cấp Quốc gia. Viện Kiểm nghiệm Thuốc thành phố Hồ Chí Minh. 494tr.
- Ueitele I.S.E., Kadhila-Muandingi N.P. & Matundu N. (2014). Evaluating the production of *Ganoderma* mushroom on corn cob. *African Journal of Biotechnology*. 13(22): 2215-2219.
- Wannasawang N., Luangharn T., Thawthong A., Charoensup R., Jaidee W., Tongdeesontorn W., Hyde K.D. & Thongklang N. (2023). Study of Optimal Conditions to Grow Thai *Ganoderma*, Fruiting Test, Proximate and Their Alpha Glucosidase Inhibitory Activity. *Life*. 13: 1887. <https://doi.org/10.3390/life13091887>.
- White T.J., Bruns T., Lee S.H. & Taylor J.W. (1990). *PCR protocols: a guide to methods and application*. San Diego. 315-322.
- Winnepeninckx B., Backeljau T. & De Wachter R. (1993). Extraction of high molecular weight DNA from molluscs. *Trend in Genetics-Cell Press*. 9(12): 407.
- Zheng C.W., Cheung T.M.Y. & Leung G.P.H. (2022). A review of the phytochemical and pharmacological properties of *Amauroderma rugosum*. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*. 38: 509-516.
- Zhou X. (2017). Cultivation of *Ganoderma lucidum*: Technology and Applications. In book: *Edible and Medicinal Mushrooms*. 385-413.