

Nghiên cứu kỹ thuật nhân giống đầu dòng nấm rễ dài *Oudemansiella raphanipes* (Beck.) Pegler & T.W.K. Young

Phạm Thị Thu^{1*}, Nguyễn Duy Trình¹, Phạm Xuân Hội²

¹Trung tâm Nghiên cứu và phát triển nấm

²Viện Di truyền nông nghiệp

Ngày nhận bài 27/2/2019; ngày chuyển phản biện 6/3/2019; ngày nhận phản biện 15/4/2019; ngày chấp nhận đăng 24/4/2019

Tóm tắt:

Nấm rễ dài *Oudemansiella raphanipes* (Beck.) Pegler & T.W.K. Young được biết đến nhiều trên thế giới do có giá trị dược liệu và giá trị dinh dưỡng cao. Nhằm xác định những điều kiện phù hợp cho sợi nấm rễ dài sinh trưởng trong môi trường nhân giống đầu dòng, các tác giả đã tiến hành nghiên cứu và xác định được môi trường nuôi cấy phù hợp nhất là Lilly và Glucose - peptone. Nhiệt độ và pH tối ưu cho sự sinh trưởng của nấm rễ dài trong điều kiện nhân giống đầu dòng là $25\pm 1^\circ\text{C}$ và $\text{pH}=7$ với nguồn carbon và nitơ là D-fructose và cao nấm men (yeast extract).

Từ khóa: giống đầu dòng, nấm rễ dài.

Chỉ số phân loại: 4.1

Investigation on propagation of master spawn technology of *Oudemansiella raphanipes* (Beck.) Pegler & T.W.K. Young

Thi Thu Pham^{1*}, Duy Trinh Nguyen¹, Xuan Hoi Pham²

¹Mushroom Research Development Center

²Institute for Agricultural Genetics

Received 27 February 2019; accepted 24 April 2019

Abstract:

Oudemansiella raphanipes (Beck.) Pegler & T.W.K. Young has been known popularly due to its great medical and nutritional values. The aim of this study was to acquire basic data regarding the suitable conditions for *Oudemansiella raphanipes* (Beck.) Pegler & T.W.K. Young mycelial growth in culture medium. The results of the study illustrated that Lilly and glucose-peptone were selected as the most suitable culture media for cultivation of *Oudemansiella raphanipes* (Beck.) Pegler & T.W.K. Young. The optimal temperature and pH for the mycelial growth of *Oudemansiella raphanipes* (Beck.) Pegler & T.W.K. Young were $25\pm 1^\circ\text{C}$ and $\text{pH}=7$, respectively. The carbon and nitrogen sources for the optimal mycelial growth were D-fructose and yeast extract, respectively.

Keywords: long root, master spawn.

Classification number: 4.1

Đặt vấn đề

Nấm rễ dài *Oudemansiella raphanipes* (Beck.) Pegler & T.W.K. Young thuộc họ *Tricholomataceae*, bộ *Agaricales*, ngành nấm đảm *Basidiomycota* có nhiều đặc tính dược liệu quý, chứa các hợp chất kháng nấm bệnh quan trọng như Mucidin (strobilurin A) và Oudemansin, được sử dụng để kiểm soát các bệnh về nấm mốc trên các loại thực vật khác nhau. Chất Oudemansin được chiết xuất từ nấm rễ dài không chỉ chứa hoạt tính kháng nấm mà còn có tác dụng ức chế đối với sarcoma 180 và ung thư biểu mô Ehrlich trên chuột [1] cũng như có tác dụng hỗ trợ điều trị huyết áp cao và tác dụng ức chế trên *Pyricularia oryzae* gây bệnh đạo ôn [2].

Nhiều nghiên cứu về kỹ thuật nhân giống và nuôi trồng nấm rễ dài đã được công bố trên thế giới. Theo Sang Beom Kim và cs (2005) [3], môi trường Lilly (2 g asparagine, 10 g maltose, 0,5 g MgSO_4 , 1 g KH_2PO_4) là môi trường nhân giống cấp I phù hợp cho nấm rễ dài phát triển ở nhiệt độ 25°C và $\text{pH}=6$. Nguồn cacbon và nitơ tối ưu cho sự sinh trưởng và phát triển của sợi nấm rễ dài là xylose và alanin, tỷ lệ C/N 20:1 với glucose 3% (w/v). Nghiên cứu của Miles (1993) [4] khẳng định, trong thời gian lan sợi nấm gần như không cần ánh sáng, ánh sáng quá mạnh có thể kìm hãm sự sinh trưởng của sợi nấm.

Mặc dù có nhiều giá trị dinh dưỡng và giá trị dược liệu nhưng nấm rễ dài hiện vẫn là đối tượng mới ở Việt Nam. Với mục tiêu đa dạng hóa nguồn gen sinh học, tạo cơ sở cho sự phát triển của nấm rễ dài cũng như nâng cao năng suất

*Tác giả liên hệ: Email: pttu6988@gmail.com

và chất lượng các chủng nấm mới, chúng tôi tiến hành đánh giá một số yếu tố ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của nấm rế dài trong môi trường nhân giống đầu dòng (hay còn gọi là giống cấp I).

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

Giống nấm rế dài *Oudemansiella raphanipes* (Beck.) Pegler & T.W.K. Young ký hiệu T_M được Trung tâm Nghiên cứu và phát triển nấm nhập từ Trung tâm Nghiên cứu nấm châu Á - Thái Bình Dương (Phúc Kiến, Trung Quốc).

Phương pháp nghiên cứu

pH môi trường nhân giống: giống gốc nấm rế dài 10 ngày tuổi có kích thước 5x5 mm được cấy chuyển sang cấp I trên môi trường PGA đặt ở giữa đĩa petri. Môi trường nhân giống cấp I đã được điều chỉnh pH trong phạm vi pH=4-9 với NaOH hoặc HCl và nuôi trong điều kiện tối trong 10 ngày ở 25°C.

Nhiệt độ nhân giống: nhân giống cấp 1 nấm rế dài trên môi trường PGA ở các ngưỡng nhiệt độ khác nhau (15, 20, 25, 30 và 35°C) với pH là 6. Sự tăng trưởng sợi nấm được theo dõi theo phương pháp của Shim và cs (1997) [5].

Môi trường nhân giống cấp I nấm rế dài được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Thành phần môi trường nhân giống cấp I nấm rế dài.

Môi trường Thành phần (g/l)	PGA	MY	Lilly	PG(M)	Glucose-peptone	Mushroom-complete
Asparagine	-	-	2	-	-	-
Glucose	20	10	-	20	10	-
Yeast extract	-	3	-	-	10	2
Peptone	-	5	-	-	10	2
Malt extract	-	3	-	5	15	20
Maltose	-	-	10	-	-	-
MgSO ₄	-	-	0,5	-	-	0,5
KH ₂ PO ₄	-	-	1	-	-	0,5
K ₂ HPO ₄	-	-	-	-	-	1
Potatoes	200	-	-	200	-	-
Agar	20	20	20	20	20	20
pH	6	6	6	6	6	6

Ghi chú: “-” không xác định.

Ảnh hưởng của nguồn carbon: môi trường nhân giống được tạo từ peptone 5 g + MgSO₄ 0,05 g + KH₂PO₄ 0,46 g + K₂HPO₄ 1,0 g + thiamine-HCl 120 µg + agar 20 g, bổ sung nước cất cho đủ 1.000 ml. Mỗi nguồn carbon được thêm vào môi trường cơ bản ở nồng độ 0,1M trên 1.000 ml và được trộn đều [5].

Ảnh hưởng của nguồn nitơ: môi trường nhân giống được tạo từ: glucose 20 g + MgSO₄ 0,05 g + KH₂PO₄ 0,46 g + K₂HPO₄ 1,0 g + thiamine-HCl 120 µg + agar 20 g, bổ sung nước cất cho đủ 1.000 ml, sau đó được bổ sung với 6 nguồn nitơ. Các nguồn nitơ được thêm vào môi trường nhân giống ở nồng độ 0,02M [5]. 5 nguồn carbon và 6 nguồn nitơ được sử dụng trong nghiên cứu này bao gồm:

Công thức	Nguồn carbon	Nguồn nitơ
CT1	D-fructose	NaNO ₃
CT2	Glucose	NH ₄ NO ₃
CT3	Sucrose	Yeast
CT4	Maltose	Peptone
CT5	Manose	(NH ₄) ₂ SO ₄
CT6	-	(NH ₄) ₂ HPO ₄

Đặc điểm sinh trưởng, phát triển hệ sợi giống cấp I nấm rế dài: chỉ tiêu đánh giá đặc điểm sinh trưởng hệ sợi gồm đường kính sinh trưởng hệ sợi và mật độ hệ sợi. Mật độ sợi được đánh giá theo Kadiri (1998) [6] gồm các mức:

++: mật độ hệ sợi rất thưa	++++: mật độ hệ sợi dày
+++: mật độ hệ sợi thưa	+++++: mật độ hệ sợi dày đặc
++++: mật độ hệ sợi trung bình	

Đường kính hệ sợi (mm): hệ sợi được đo trong 10 ngày.

Phương pháp xử lý số liệu

Mỗi thí nghiệm được tiến hành lặp lại 3 lần. Số liệu được xử lý bằng phần mềm thống kê Excel 2010 và IRRISTAT 5.0.

Kết quả và thảo luận

Ảnh hưởng của môi trường nhân giống

6 loại môi trường đang được sử dụng phổ biến hiện nay trong nhân giống nấm gốc và giống cấp I là: PGA, MY, PG(M), Lilly, Glucose - peptone, Mushroom - complete. Căn cứ vào chỉ tiêu theo dõi, kết quả ghi nhận ở bảng 2 cho thấy, 2 môi trường Lilly và Glucose - peptone phù hợp cho sợi nấm rế dài phát triển. Mật độ hệ sợi dày đặc, phát triển dạng tỏa tròn đều, lan nhanh và có màu trắng đặc trưng của giống.

Bảng 2. Ảnh hưởng của các môi trường khác nhau đến sinh trưởng hệ sợi nấm rế dài trong giai đoạn nhân giống cấp I.

Công thức	Môi trường	Đường kính hệ sợi (mm)	Mật độ hệ sợi	Đặc điểm hệ sợi
CT1	PGA	65,9	++++	Hệ sợi dày mượt, có màu trắng đặc trưng.
CT2	MY	51,0	+++++	Hệ sợi dày, lan chậm, có màu trắng đặc trưng.
CT3	Lilly	69,3	+++++	Hệ sợi dày đặc, mượt và có màu trắng đặc trưng
CT4	PG(M)	63,6	++++	Hệ sợi dày, mượt, có màu trắng đặc trưng.
CT5	Glucose - peptone	67,1	+++++	Hệ sợi dày đặc, mượt và có màu trắng đặc trưng.
CT6	Mushroom - complete	56,3	+++	Hệ sợi trung bình, mượt và có màu trắng đặc trưng.
LSD		1,4		
CV%		3,1		



Hình 1. Ảnh hưởng của môi trường nhân giống đến sinh trưởng hệ sợi nấm rế dài.

Dựa vào kết quả nghiên cứu, có thể thấy sợi nấm rế dài có khả năng thích nghi trên nhiều loại môi trường nhân giống khác nhau. Trong các môi trường được chúng tôi tiến hành theo dõi thì môi trường Lilly và Glucose - pepton là 2 loại môi trường cho sự sinh trưởng hệ sợi nhanh nhất và mật độ hệ sợi dày mượt hơn cả (hình 1). Theo Sang Beom Kim và cs (2005) [3], môi trường phù hợp cho nấm rế dài phát triển là môi trường Lilly và Hamada (Dextrose 10 g/l, Ebirose 5 g/l, Hyponex 3 g/l, Yeast extract 3 g/l, agar 20 g/l).

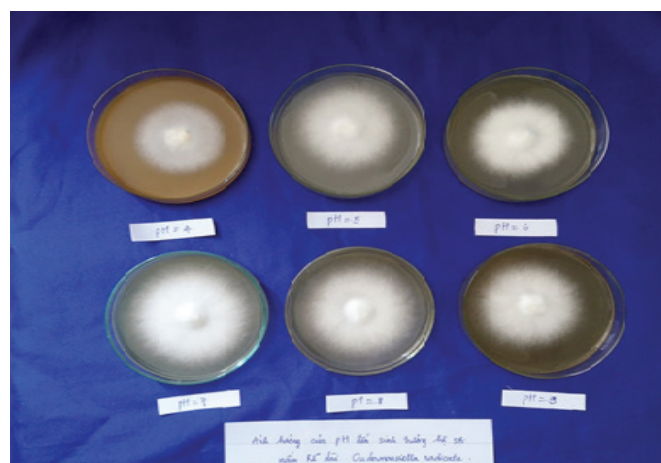
Ảnh hưởng của pH

pH là nhân tố ảnh hưởng đến sinh khối, khả năng hấp phụ chất dinh dưỡng, hình thái và cấu trúc tế bào, độ tan của muối và trạng thái ion của cơ chất, hoạt động của enzyme [7]. Với kết quả nghiên cứu về pH, 6 giá trị pH được chúng

tôi tiến hành đánh giá là: 4, 5, 6, 7, 8 và 9. Kết quả thí nghiệm ở bảng 3 cho thấy, hệ sợi nấm rế dài rất mạnh, thưa và yếu ở ngưỡng pH=4, tốc độ lan sợi cũng thấp nhất (61,4 mm); môi trường có pH=7,0-8,0 hệ sợi sinh trưởng tốt, tốc độ phát triển nhanh, mật độ sợi dày đặc, sợi bông và mượt, tốc độ mọc sợi nhanh nhất. Ở pH=5,0 hoặc pH=9,0 tốc độ sinh trưởng của hệ sợi chậm hơn, mật độ hệ sợi ở mức trung bình. Như vậy sợi nấm rế dài có khả năng sinh trưởng tốt trong môi trường có ngưỡng pH rộng từ 5 đến 9 (hình 2).

Bảng 3. Ảnh hưởng của pH đến sinh trưởng hệ sợi nấm rế dài trong giai đoạn nhân giống cấp I.

Công thức	pH	Đường kính hệ sợi (mm)	Mật độ hệ sợi	Đặc điểm hệ sợi
CT1	4	61,4	++	Sợi mảnh, yếu, lan chậm
CT2	5	69,2	+++	Sợi mỏng
CT3	6	72,6	++++	Sợi dày
CT4	7	81,1	+++++	Sợi dày đặc, bông và mượt, lan nhanh
CT5	8	75,5	+++++	Sợi dày, mượt và lan nhanh
CT6	9	63,8	+++	Sợi mỏng
LSD		1,5		
CV%		3,0		



Hình 2. Ảnh hưởng của pH đến sinh trưởng hệ sợi nấm rế dài.

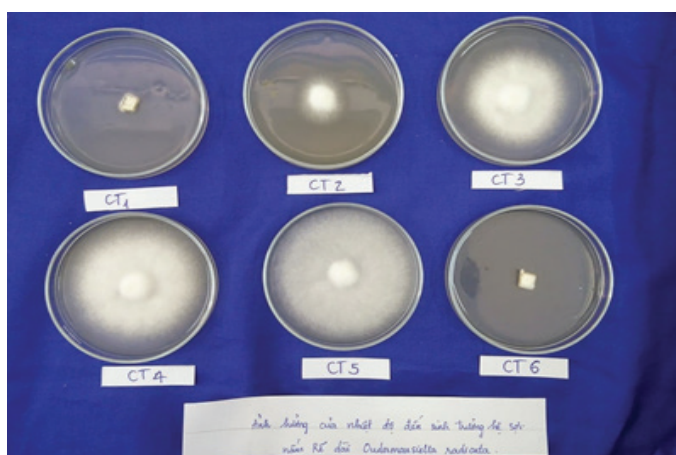
Ảnh hưởng của nhiệt độ

Theo Vladimir (2012) [8], dải nhiệt độ từ 25 đến 28°C là phù hợp nhất để hầu hết các loài nấm nhân sinh khối. Để tìm ra nhiệt độ phù hợp cho sự hình thành và phát triển của hệ sợi nấm rế dài, chúng tôi đã nghiên cứu đánh giá sự sinh trưởng hệ sợi nấm ở 6 ngưỡng nhiệt độ: 10±1°C, 15±1°C, 20±1°C, 25±1°C, 30±1°C và 35±1°C. Kết quả thu được (bảng 4) cho thấy, nhiệt độ 25±1°C phù hợp nhất cho nấm rế dài phát triển,

hệ sợi màu trắng đặc trưng của giống, phát triển nhanh dạng tủa tròn đều, đường kính hệ sợi 68,5 mm. Ở ngưỡng $10\pm 1^\circ\text{C}$ sợi nấm phát triển rất kém, hệ sợi mỏng, ở 30°C hệ sợi phát triển nhanh nhất nhưng mật độ hệ sợi thưa hơn. Đặc biệt, sợi nấm rễ dài không thể phát triển trong điều kiện nhiệt độ 35°C (hình 3). Do đó, ngưỡng $25\pm 1^\circ\text{C}$ là nhiệt độ thích hợp cho công tác nhân giống cấp I nấm rễ dài. Kết quả này tương đồng với các nghiên cứu đã được công bố trước đó.

Bảng 4. Ảnh hưởng của nhiệt độ tới sinh trưởng hệ sợi nấm rễ dài.

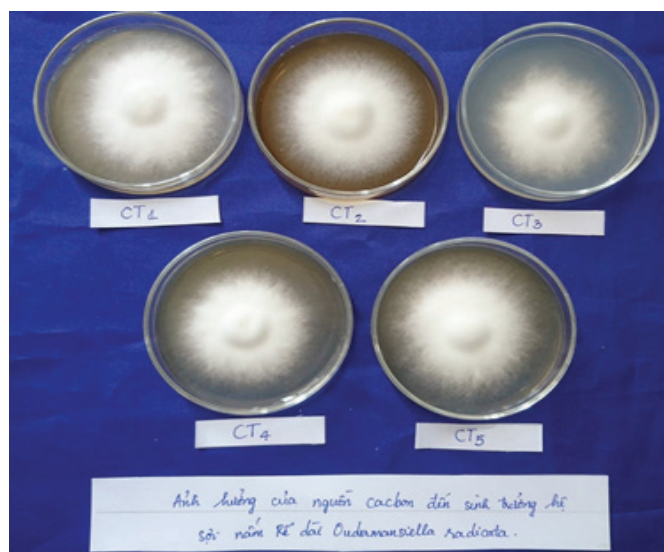
Công thức	Nhiệt độ ($^\circ\text{C}$)	Đường kính hệ sợi (mm)	Mật độ hệ sợi	Đặc điểm hệ sợi
CT1	$10\pm 1^\circ\text{C}$	5,2	+	Sợi rất mảnh, yếu
CT2	$15\pm 1^\circ\text{C}$	15,2	+++	Sợi trung bình, lan chậm
CT3	$20\pm 1^\circ\text{C}$	52,7	+++++	Sợi rất dày, bông và mượt
CT4	$25\pm 1^\circ\text{C}$	68,5	+++++	Sợi rất dày, bông và mượt
CT5	$30\pm 1^\circ\text{C}$	71,4	+++	Sợi trung bình, lan nhanh
CT6	$35\pm 1^\circ\text{C}$	-	-	-
LSD		1,6		
CV%		4,1		



Hình 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh trưởng hệ sợi nấm rễ dài.

Ảnh hưởng của nguồn cacbon và nitơ

Cacbon và nitơ là hai nhân tố cơ bản cho sự sinh trưởng của vi sinh vật. Nguồn cacbon ảnh hưởng đến quá trình sinh trưởng và chuyển hóa của vi sinh vật. Giống nấm rễ dài đã được nhân giống trong môi trường chứa các nguồn cacbon khác nhau (D-fructose, glucose, manose, maltose và sucrose). Kết quả cho thấy, không có sự khác nhau về đặc điểm hệ sợi tại các công thức; trong các nguồn cacbon được khảo sát, D-Fructose cho mật độ hệ sợi dày, mượt và đường kính hệ sợi lớn nhất (68,3 mm) (hình 4, bảng 5).

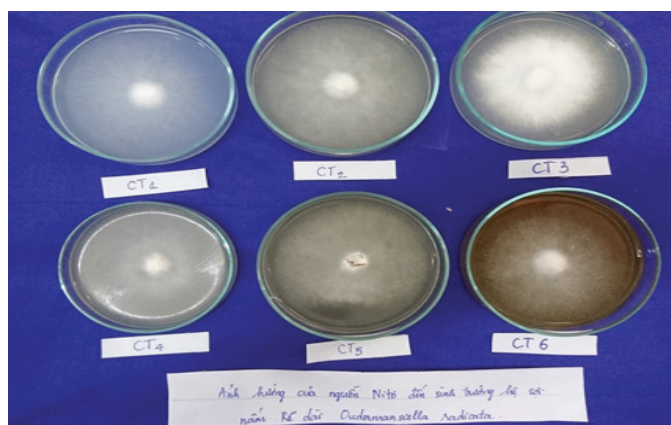


Hình 4. Ảnh hưởng của nguồn cacbon đến sinh trưởng hệ sợi nấm rễ dài.

Bảng 5. Ảnh hưởng của các nguồn cacbon và nitơ đến sinh trưởng hệ sợi nấm rễ dài.

Công thức	Nguồn cacbon	Đường kính hệ sợi (mm)	Mật độ hệ sợi	Nguồn nitơ	Đường kính hệ sợi (mm)	Mật độ hệ sợi
CT1	D-fructose	68,3	+++++	NaNO_3	57,2	++
CT2	Glucose	66,0	+++++	NH_4NO_3	62,1	+++
CT3	Sucrose	55,7	++++	Yeast	61,7	+++++
CT4	Maltose	59,2	+++++	Peptone	60,5	++++
CT5	Manose	62,4	+++++	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	54,1	+++
CT6	-	-	-	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	51,3	++
LSD		1,2			1,7	
CV%		4,2			3,8	

Nitơ là nhân tố cần thiết trong tổng hợp enzyme trong cả quá trình chuyển hóa sơ cấp và thứ cấp. 6 nguồn nitơ đã được khảo sát lần lượt gồm: NaNO_3 , NH_4NO_3 , yeast, peptone, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ và $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Kết quả (bảng 5) cho thấy, các nguồn nitơ khác nhau có ảnh hưởng rõ rệt đến sự sinh trưởng hệ sợi cũng như mật độ hệ sợi của nấm rễ dài. Dựa vào mật độ hệ sợi cũng như tốc độ lan sợi (hình 5), chúng tôi nhận định có thể sử dụng cao nấm men (yeast) để cung cấp nguồn nitơ cho nấm rễ dài trong môi trường nhân giống cấp 1. Theo nghiên cứu của Myoung Jun Jang và cs (2009) [9] thì nguồn nitơ hữu cơ cho hiệu quả nhân giống tốt hơn so với nguồn nitơ vô cơ (NaNO_3 , NH_4NO_3 và NH_4Cl).



Hình 5. Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến sinh trưởng hệ sợi nấm rế dài.

Kết luận

Từ kết quả nghiên cứu thu được, nhóm tác giả kiến nghị nên sử dụng môi trường nhân giống cấp 1 cho nấm rế dài là môi trường Lilly (2 g asparagine + 10 g maltose + 0,5 g $MgSO_4$ + 1 g KH_2PO_4 + 20 g agar) hoặc Glucose - peptone (10 g glucose + 10 g yeast extract + 10 g peptone + 15 g Malt extract + 20 g agar). Nhiệt độ, pH tối ưu cho sự sinh trưởng của giống nấm rế dài lần lượt là $25 \pm 1^\circ C$, pH=7 với nguồn carbon và nitơ lần lượt là D-fructose và yeast extract.

Tiếp tục các nghiên cứu để nhân giống và nuôi trồng nấm rế dài ở quy mô lớn hơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] J.Z. Ying, et al. (1987), *Icons of medicinal fungi from China*, Science Press.
- [2] W.H. Park, H.D. Lee (1999), *Illustrated book of Korean Medicinal mushrooms*, Kyo-Hak Publishing C. Ltd.
- [3] Sang Beom Kim, et al. (2005), "The Optimal Culture Conditions for the Mycelial Growth of *Oudemansiella radicata*", *Mycobiology*, **33**(4), pp.230-234.
- [4] P.G. Miles (1993), "Biological background for mushroom breeding", *Genetics and Breeding of Edible Mushroom*, Gordon and Breach Science publishers.
- [5] J.O. Shim, et al. (1997), "The cultural conditions affecting the mycelial growth of *Grifola umbellata*", *Korean J. Mycol.*, **25**, pp.209-213.
- [6] M. Kadiri (1998), "Spawn and fruit body production of *Pleurotus sajor-caju* in Abeokuta Nigeria", *Nigerian Journal of Botany*, **11**, pp.125-131.
- [7] G.L. Yang, H.B. Xue (2000), *Specialized cultivation manual about edible and medicinal mushroom*, China Agricultural Press.
- [8] E. Vladimir (2012), "Submerged cultivation of medicinal mushrooms: bioprocesses and products", *International Journal of Medicinal Mushrooms*, **14**(3), pp.211-239.
- [9] Myoung Jun Jang, et al. (2009), "Optimal Conditions for the Mycelial Growth of *Coprinus comatus* Strains", *Mycobiology*, **37**(2), pp.103-108.