

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



PHẠM VĂN LỘC

**XÂY DỰNG BỘ CHŨNG NẤM BÀO NGƯ'
CÓ TIỀM NĂNG THƯƠNG MẠI**

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Mã số: 9 42 02 01

TP. HỒ CHÍ MINH – 2023

Công trình được hoàn thành tại: Học viện Khoa học và Công nghệ,
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Người hướng dẫn khoa học:

1. TS. Nguyễn Hoàng Dũng
2. TS. Hồ Bảo Thùy Quyên

Phản biện 1: PGS.TS. Phan Thị Phương Trang

Phản biện 2: TS. Nguyễn Thị Liên Thương

Phản biện 3: PGS.TS. Nguyễn Bảo Quốc

Luận án được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ
cấp Học viện họp tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện
Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam vào hồi
giờ, ngày tháng năm 2023

Có thể tìm hiểu luận án tại:

1. Thư viện Học viện Khoa học và Công nghệ
2. Thư viện Quốc gia Việt Nam

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của luận án

Nông nghiệp Việt Nam tạo ra khoảng 50 triệu tấn phụ phẩm mỗi năm, do vậy ngành trồng nấm được kỳ vọng trở thành một trong những ngành chủ lực của nông nghiệp. Tuy vậy, cho đến nay, sự phát triển của ngành này vẫn còn hạn chế cả về sản lượng và số loài nuôi trồng. Để thúc đẩy ngành trồng nấm phát triển, rất cần có những giống nấm tốt, năng suất cao, phù hợp với điều kiện nuôi trồng. Tuy vậy các giống nấm nuôi trồng hiện nay tại nước ta có nhiều nguồn khác nhau, đa phần giống gốc được nhập từ nước ngoài, chỉ có một số ít chủng nấm được sưu tầm trong nước. Thông tin về giống, năng suất nuôi trồng và chất lượng không đồng bộ; chất lượng phôi giống không ổn định theo thời gian. Giống nấm thường được bảo quản bằng phương pháp cây chùy và sau một thời gian xuất hiện các dấu hiệu thoái hoá. Do đó cần phải có những trang thiết bị chuyên dụng để bảo quản, cũng như phát triển các kỹ thuật bảo tồn, phục tráng giống; và cần quan tâm hơn nữa đến công tác lai tạo, cải tiến giống.

Nấm bào ngư (*Pleurotus* spp.) hay nấm sò là một trong những giống nấm nuôi trồng quan trọng nhất của thế giới với sản lượng xếp ở vị trí thứ 2 sau nấm hương. Nấm bào ngư không chỉ có giá trị dinh dưỡng cao mà còn chứa nhiều thành phần có hoạt tính sinh học cũng như khả năng ứng dụng trong xử lý môi trường. Tại Việt Nam, bào ngư là loại nấm được trồng phổ biến đặc biệt là tại khu vực Đông Nam Bộ. Trong các giống nấm bào ngư hiện đang nuôi trồng, bào ngư xám và bào ngư trắng là giống chủ lực do phù hợp với điều kiện nuôi trồng và nhu cầu tiêu thụ cao của thị trường. Tuy nhiên vấn đề giống nấm chưa

được quan tâm đúng mức, nên cần được chú trọng để đẩy mạnh sản xuất.

Xuất phát từ thực tiễn trên, việc xây dựng bộ sưu tập các chủng nấm trên cơ sở thông tin về nguồn gốc, định danh, đa dạng di truyền và đặc điểm của các chủng nấm đang được sản xuất và tiêu thụ phổ biến trên thị trường sẽ tạo nền tảng ban đầu cho nghiên cứu ứng dụng.

2. Mục tiêu nghiên cứu của luận án

Xây dựng bộ sưu tập các chủng song nhân và dòng đơn bội của các giống nấm bào ngư trắng và bào ngư xám có tiềm năng thương mại.

3. Nội dung nghiên cứu chính của luận án

- Thu thập và định danh các chủng nấm bào ngư được nuôi trồng phổ biến.
- Khảo sát một số đặc điểm sinh học của các chủng nấm bào ngư thu thập được.
- Thu thập và khảo sát một số đặc điểm sinh học của các dòng đơn bội của các chủng nấm bào ngư.
- Thử nghiệm phân nhóm kiểu di truyền bắt cặp các dòng đơn bội bằng một số marker sinh học phân tử.

Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. GIỚI THIỆU VỀ NẤM BÀO NGƯ

1.1.1. Giới thiệu chung

Nấm bào ngư (*Pleurotus* spp.) là chi nấm ăn có phân bố rộng khắp trên thế giới với sản lượng đứng thứ 2 sau nấm hương (*Lentinula edodes*) (Royse và cs., 2017). Chi nấm này không chỉ có giá trị dinh dưỡng cao mà còn chứa nhiều thành phần có hoạt tính sinh học và các ứng dụng khác nhau trong nhiều lĩnh vực (Cohen và cs., 2002). Với

hơn 25 loài được nuôi trồng trên toàn thế giới, chi *Pleurotus* là một trong những chi nấm trồng rất đa dạng nhất. Cho đến nay, quan hệ di truyền cũng như việc phân loại các loài thuộc chi *Pleurotus* chưa thống nhất. Singer (1986) phân loại các loài thuộc chi *Pleurotus* gồm khoảng 36 loài. Trong khi đó, Chang và Miles (2004) cho rằng chi *Pleurotus* gồm khoảng 50 loài.

1.1.2. Vòng đời và đặc điểm di truyền giới tính

Chu trình sống của nấm bào ngư điển hình cho nhóm nấm đảm bao gồm hai pha chính: pha đơn nhân (monokaryon - n) và pha song nhân (dikaryon - n+n) (Barh và cs., 2019). Hai hệ sợi đơn nhân dung hợp tế bào chất với nhau tạo thành hệ sợi song nhân có khả năng hình thành quả thể (tạo mấu/clamp connection) chỉ khi 2 hệ sợi đơn nhân tạo được kiểu hình dị hợp ở cả 2 gen điều khiển sự bắt cặp (AxBx, AyBy).

1.2. THU THẬP VÀ GIỮ GIỐNG NẤM

1.2.1. Thu thập

Thông thường các bộ sưu tập giống có được từ các nguồn: giống gốc từ các viện nghiên cứu, cơ quan lưu trữ giống; giống phân lập từ giống thương mại, nuôi trồng, phân lập từ các chủng giống bản địa.

1.2.2. Giữ giống nấm

Giữ giống trong thời gian ngắn: cấy chuyển định kỳ

Giữ giống trong thời gian dài: hạn chế dinh dưỡng, hạn chế oxy, đông khô, lạnh đến lạnh sâu, giữ giống trong ni tơ lỏng (Chang và Miles, 2004).

1.3. ĐỊNH DANH NẤM

Việc xác định danh nấm có vai trò quan trọng. Việc định danh chính xác hỗ trợ cho nhiều lĩnh vực khác như bảo quản nguồn gen,

bảo tồn đa dạng sinh học... Đây là bước đầu tiên của quá trình nghiên cứu đánh giá các đặc điểm về sau. Để xác định chính xác chính xác phương pháp cơ bản là dựa vào các đặc điểm hình thái (đại thể và vi thể). Bên cạnh đó nhiều phương pháp khác cũng được sử dụng riêng lẻ hay phối hợp để xác định loài (Guzmán, 2000).

1.3.1. Định danh dựa trên các đặc điểm hình thái

Việc phân tích bằng hình thái đòi hỏi phải quan sát kỹ lưỡng các đặc điểm và đối chiếu với các khóa phân loại.

1.3.2. Định danh dựa trên sự tương hợp loài

Nguyên tắc của phương pháp này là: cho hệ sợi loài nấm cần định danh lai với các loài nấm của chi *Pleurotus* đã xác định tên loài. Những loài khác nhau nhóm tương hợp sẽ không lai được với nhau (Shnyreva và Shtaer, 2006).

1.3.3. Định danh dựa trên các trình tự bảo tồn

Phần lớn các phương pháp phân loại thuộc nhóm này đều sử dụng các trình tự bảo tồn nằm trong gen mã hóa các RNA của ribosome (rDNA) và một vài gen mã hóa một số protein đặc biệt khác. Trong các vùng trình tự, ITS là vùng trình tự được sử dụng rộng rãi trong định gen nấm (Shnyreva và cs., 2012).

1.4. PHÂN TÍCH ĐA DẠNG DI TRUYỀN BẰNG KỸ THUẬT AFLP

AFLP đã được sử dụng phổ biến trong phân tích đa dạng di truyền nấm lớn. Kỹ thuật AFLP được giới thiệu bởi Vos và cs. (1995) và trở thành phương pháp phổ biến trong đánh giá đa dạng di truyền. AFLP có thể đánh giá nhanh độ đa dạng di truyền dựa trên sự đa dạng của các đoạn DNA được khuếch đại có chọn lọc sau khi cắt bởi 2 enzyme giới hạn thông qua PCR.

1.5. ĐÁNH GIÁ CHẤT LƯỢNG GIỐNG

Chất lượng giống nấm thường được đánh giá ở các mức độ khác nhau: DNA và biểu hiện gen, dựa trên enzyme của giống nấm và các thử nghiệm sinh hóa, sinh trưởng của hệ sợi tơ trên các môi trường dinh dưỡng. Đặc biệt quan trọng nhất là đánh giá sự lan tơ trên cơ chất nuôi trồng và hiệu suất sinh học (BE - biological efficiency) khi trồng thử nghiệm.

1.6. CÁC PHƯƠNG PHÁP CẢI TIẾN GIỐNG NẤM

Các tính trạng được quan tâm là năng suất cao, chất lượng quả thể tốt, không sinh bào tử, chống chịu với các nhân tố sinh học và phi sinh học.... Một số phương pháp cải tiến giống được sử dụng bao gồm: xử lý đột biến, chuyển gen, dung hợp tế bào trần, lai sợi nấm. Trong đó, lai giữa hai sợi nấm đơn bội là phương pháp phổ biến và đơn giản để tạo giống mới.

Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. NỘI DUNG 1: THU THẬP, ĐỊNH DANH VÀ PHÂN TÍCH ĐA DẠNG DI TRUYỀN CÁC CHỦNG NẤM BÀO NGƯ ĐƯỢC NUÔI TRỒNG PHỔ BIẾN

2.1.1. Thu thập mẫu

Để thực hiện đề tài, các chủng nấm bào ngư trắng và bào ngư xám thương mại tại các tỉnh phía nam đã được thu nhận.

2.1.2. Xử lý mẫu tươi, phân lập mẫu

Mẫu quả thể nấm sau khi quan sát, mô tả, chụp ảnh, tiến hành phân lập tại chỗ hoặc đem về phòng thí nghiệm để phân lập nhanh (Nguyễn Lâm Dũng, 2014).

2.1.3. Phương pháp định danh bằng đặc điểm hình thái

Mẫu quả thể nấm bào ngư được định danh bằng các mô tả hình thái theo phương pháp giải phẫu và phân tích mẫu nấm của Largent (1977), Largent và cs. (1977). Kết quả phân tích được so sánh với các mô tả của Miller (1969), Corner (1981), Petersen và Krisai-Greilhuber (1996), Segedin và cs. (1995), Petersen và Krisai-Greilhube (1999), Guzmán (2000), Lechner cs. (2005), Zmitrovich và Wasser (2016).

2.1.4. Phương pháp định danh bằng đặc điểm sinh học phân tử

Các mẫu nấm bào ngư được định danh dựa trên trình tự vùng ITS theo phương pháp của James và cs. (2006); xây dựng cây phát sinh loài bằng phần mềm MEGA X.

2.1.5. Phương pháp phân tích đa dạng di truyền bằng kỹ thuật AFLP

Phân tích đa dạng di truyền bằng AFLP được thực hiện dựa trên công bố của Pawlik và cs. (2012).

2.2. NỘI DUNG 2. KHẢO SÁT MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC CỦA CÁC CHỦNG NẤM BÀO NGƯ THU THẬP ĐƯỢC

2.2.1. Phương pháp khảo sát khả năng phát triển hệ sợi của các chủng giống nấm ở môi trường thạch đĩa và môi trường lỏng

2.2.1.1. *Khảo sát tốc độ lan tơ của các chủng nấm trên môi trường thạch đĩa*

Nuôi cấy các đĩa thạch đến khi hệ sợi nấm của chủng đầu tiên lan kín đĩa và xác định tốc độ lan tơ của hệ sợi ($\text{mm}^2/\text{ngày}$).

2.2.1.2. *Khảo sát sinh khối của các chủng nấm khi nuôi cấy trên môi trường lỏng*

Thí nghiệm được tiến hành trong điều kiện lỏng tĩnh theo mô tả của Kupradit và cs. (2020) có điều chỉnh để phù hợp cho thí nghiệm.

2.2.2. Phương pháp khảo sát tốc độ lan tơ trên cơ chất mặt cưa cao su

2.2.2.1. Khảo sát tốc độ lan tơ trên đĩa Petri mặt cưa

Nuôi cấy các đĩa nấm trên mặt cưa đến khi hệ sợi nấm của chúng đầu tiên lan kín đĩa và xác định tốc độ lan tơ của hệ sợi ($\text{mm}^2/\text{ngày}$).

2.2.2.2. Khảo sát tốc độ lan tơ trên ống nghiệm mặt cưa

Nuôi cấy các ống nghiệm nấm trên mặt cưa và xác định tốc độ lan tơ của hệ sợi ($\text{mm}/\text{ngày}$).

2.2.3. Khảo sát tỉ lệ chuyển hóa

Khảo sát này được tiến hành theo Magae và cs. (2005).

2.2.4. Khảo sát hiệu suất sinh học các chủng nấm bào ngư và phân tích mối tương quan giữa tốc độ lan tơ trên cơ chất mặt cưa với hiệu suất sinh học

2.2.4.1. Khảo sát hiệu suất sinh học

Nuôi trồng trên môi trường đã hấp khử trùng (mặt cưa 79%, cám bắp 20%, CaSO_4 1%) và xác định hiệu suất sinh học (Stamets, 2011).

2.2.4.2. Phân tích mối tương quan giữa tốc độ lan tơ trên cơ chất mặt cưa với hiệu suất sinh học

2.3. NỘI DUNG 3. THU THẬP VÀ KHẢO SÁT MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC CỦA CÁC DÒNG ĐƠN BỘI CỦA CÁC CHỦNG NẤM BÀO NGƯ

2.3.1. Thu thập và giữ giống các dòng đơn bội

4 chủng nấm được tiến hành thu nhập dòng đơn bội bao gồm: ABI-F000241, ABI-F000252, ABI-F00253, ABI-F000224. Tiến hành thu nhận bào tử theo mô tả của Gharehaghaji và cs. (2007).

2.3.2. Khảo sát sinh trưởng của các dòng đơn bội trên môi trường dinh dưỡng

Thực hiện tương tự phần 2.2.1.1

2.3.3. Khảo sát tỉ lệ chuyển hóa các dòng đơn bội

Khảo sát này được tiến hành theo Magae và cs. (2005).

2.3.4. Xác định kiểu bắt cặp của các dòng đơn bội

Khảo sát này được tiến hành theo Tran Thi Ngoc My và cs. (2005).

2.4. NỘI DUNG 4. THỬ NGHIỆM PHÂN NHÓM KIỂU DI TRUYỀN BẮT CẶP CÁC DÒNG ĐƠN BỘI BẰNG MỘT SỐ MARKER SINH HỌC PHÂN TỬ

Nghiên cứu chọn 8 dòng đơn bội đại diện cho 4 kiểu di truyền bắt cặp một của một chủng nấm bào ngư xám.

2.4.1. Phân tích đa dạng di truyền các dòng đơn bội bằng kỹ thuật AFLP

Thực hiện tương tự phần 2.1.5

2.4.2. Thử nghiệm phân nhóm kiểu di truyền bắt cặp các dòng đơn bội bằng một số cặp mồi chuyên biệt của nấm đùi gà

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. THU THẬP, ĐỊNH DANH VÀ PHÂN TÍCH ĐA DẠNG DI TRUYỀN CÁC CHỦNG NẤM BÀO NGƯ ĐƯỢC NUÔI TRỒNG PHỔ BIẾN

3.1.1. Thu thập và nuôi cấy giữ giống các chủng nấm bào ngư

Tổng cộng đã thu thập được 15 chủng nấm bào ngư tại 8 tỉnh/thành phố thuộc khu vực phía nam như: Đồng Nai, Tây Ninh, Bình Dương, Bà Rịa - Vũng Tàu, TP. Hồ Chí Minh, Bình Thuận, Vĩnh Long, Cần Thơ và Lâm Đồng. Tất cả đều là chủng thương mại (trừ chủng tự nhiên tại Lâm Đồng). Trong đó có 10 chủng thuộc nhóm nấm bào ngư xám, 4 chủng thuộc nhóm nấm bào ngư trắng, 1 chủng nấm thuộc nhóm bào ngư tiểu yến.

3.1.2. Định danh các chủng nấm bằng các đặc điểm hình thái

3.1.2.1. Các chủng bào ngư xám

Các đặc điểm của mũ nấm, phiến nấm và bào tử của 10 chủng nấm bào ngư xám có nhiều điểm tương đồng với loài *P. pulmonarius* và *P. ostreatus*. Các đặc điểm vi thể về giá trị Q của bào tử (2,1 – 2,5), hình dáng mũ nấm và độ dày mũ nấm tương đồng với loài *P. pulmonarius*. Như vậy 10 chủng nấm bào ngư xám có thể thuộc loài *P. pulmonarius*.

3.1.2.2. Các chủng bào ngư trắng

Các đặc điểm của mũ nấm, phiến nấm và bào tử của 4 chủng nấm bào ngư trắng có nhiều điểm tương đồng với loài *P. pulmonarius* và *P. ostreatus*. Các đặc điểm vi thể về giá trị Q của bào tử (2,7 – 2,9); màu sắc (trắng); độ dày mũ nấm tương đồng với loài *P. ostreatus*. Như vậy 4 chủng nấm bào ngư trắng có thể thuộc loài *P. ostreatus*.

3.1.2.3. Chủng nấm bào ngư tiểu yến

Chủng nấm tiểu yến ABI-F000201 có đặc điểm đại thể tương đồng với loài *P. pulmonarius* và *P. ostreatus*; nhưng các đặc điểm vi thể, đặc biệt giá trị Q (2,8) thì giống với loài *P. ostreatus* hơn. Do đó chủng này có thể thuộc loài *P. ostreatus*.

3.1.3. Định danh các chủng nấm thu thập được bằng đặc điểm sinh học phân tử

3.1.3.1. Phân tích vùng trình tự ITS

Khi so sánh dữ liệu trên GenBank Các chủng nấm đều thuộc chi *Pleurotus* với mức độ tương đồng cao. Trong đó, 10 mẫu được định danh là *P. pulmonarius*, 5 mẫu định danh là *P. ostreatus*. Kết quả định danh dựa trên trình tự ITS phù hợp với kết quả định danh dựa trên đặc điểm hình thái.

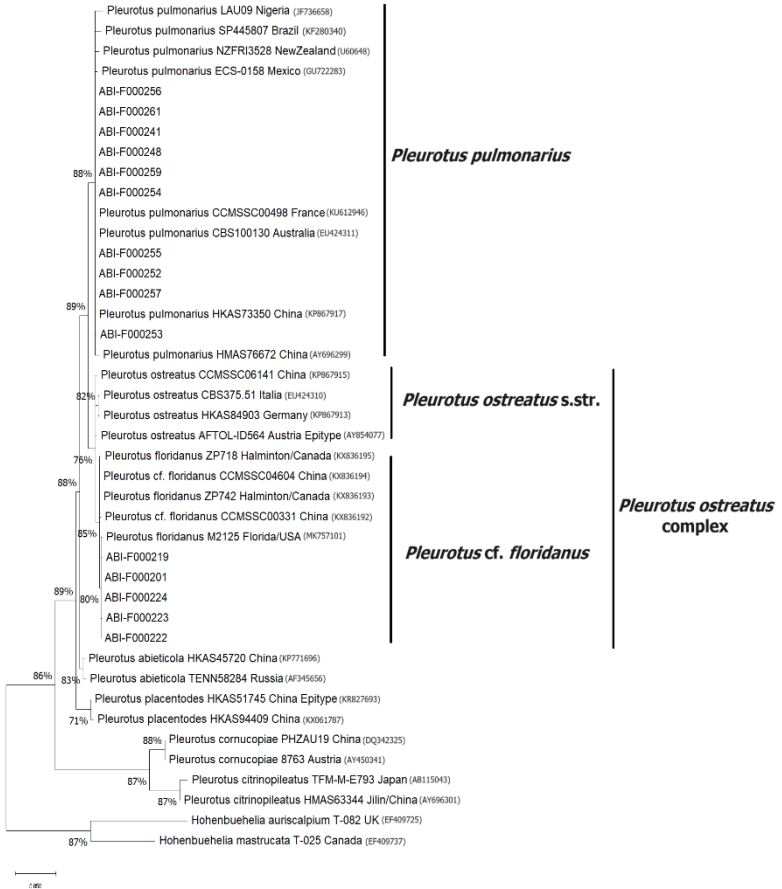
3.1.3.2. Xây dựng cây phát sinh loài trên vùng trình tự ITS

Các chủng bào ngư xám được xác định là *P. pulmonarius* tập hợp thành một nhánh với chỉ số bootstrap là 88% cùng với 8 trình tự tham chiếu của *P. pulmonarius*. Các chủng nấm bào ngư trắng và chủng nấm tiêu yến tạo thành một phân nhánh khác với chỉ số bootstrap đạt 80% với 5 trình tự tham chiếu của nhóm *Pleurotus. cf. floridanus*. (Hình 3.1).

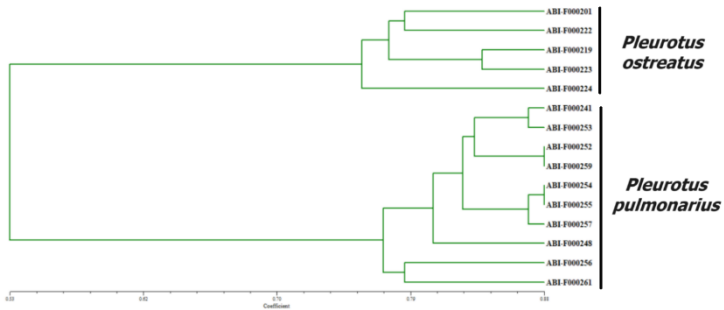
3.1.4. Phân tích đa dạng di truyền bằng kỹ thuật AFLP

Kết quả phân tích AFLP cho thấy sự đa dạng di truyền cao của các chủng nấm bào ngư thu thập được, hệ số tương đồng dao động từ 44 đến 88%. 15 chủng nấm làm 2 nhánh chính (Hình 3.2): nhánh 1 gồm các 5 chủng nấm thuộc loài *P. ostreatus*, hệ số tương đồng các chủng thuộc nhánh này dao động từ 72-84%. Nhánh 2 gồm 10 chủng nấm thuộc loài *P. pulmonarius*; hệ số tương đồng các chủng thuộc nhánh

này dao động từ 71-88%. Các chủng nấm cùng một loài thường có quan hệ di truyền gần hơn các chủng khác loài.



Hình 3.1. Cây phát sinh loài dựa theo trình tự ITS theo phương pháp Maximum Likelihood (ML) theo mô hình Kimura 2 yếu tố của các chủng *Pleurotus* spp. (bootstrap lặp lại 1000 lần).



Hình 3.2. Cây UPGMA dựa trên đa dạng di truyền 4 marker APLP các chủng nấm bào ngư

3.2. KHẢO SÁT MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC CỦA CÁC CHỦNG NẤM BÀO NGƯ THU THẬP ĐƯỢC

3.2.1. Khảo sát khả năng phát triển hệ sợi của các chủng nấm ở các môi trường thạch đĩa và môi trường lỏng

Bảng 3.1. Tốc độ lan tơ của các chủng nấm bào ngư trên môi trường PDA và sinh khối trên môi trường PDB

STT	Chủng nấm	Tên loài	Tốc độ lan tơ trung bình (mm ² /ngày)	Sinh khối khô (g/l)
1	ABI-F000201	<i>P. ostreatus</i>	184,5 ^g ± 19,4	3,14 ^{bcd} ± 0,49
2	ABI-F000219	<i>P. ostreatus</i>	800,1 ^b ± 43,8	3,37 ^{bc} ± 0,32
3	ABI-F000222	<i>P. ostreatus</i>	512,7 ^d ± 43,6	2,03 ^{ef} ± 0,42
4	ABI-F000224	<i>P. ostreatus</i>	414,9 ^e ± 56,3	2,95 ^{cd} ± 0,81
5	ABI-F000241	<i>P. pulmonarius</i>	752,8 ^{bc} ± 47,6	2,65 ^{de} ± 0,43
6	ABI-F000252	<i>P. pulmonarius</i>	726,8 ^c ± 22,7	2,25 ^e ± 0,40
7	ABI-F000253	<i>P. pulmonarius</i>	284,9 ^f ± 39,5	1,41 ^f ± 0,12
8	ABI-F000256	<i>P. pulmonarius</i>	369,6 ^e ± 33,7	1,49 ^f ± 1,10
9	ABI-F000259	<i>P. pulmonarius</i>	773,7 ^{bc} ± 39,5	4,16 ^a ± 0,32
10	ABI-F000261	<i>P. pulmonarius</i>	888,6 ^a ± 45,5	3,73 ^{ab} ± 0,41

Kết quả cho thấy tốc độ lan tơ của 10 chủng nấm trên môi trường PDA có sự khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê (Bảng 3.1). Chủng có tốc độ lan nhanh nhất là ABI-F000261 (chủng tự nhiên). Chủng có tốc độ lan tơ chậm nhất là ABI-F000201. Trên môi trường PDB, sinh khối khô có sự khác biệt ý nghĩa thống kê

3.2.2. Khảo sát tốc độ lan tơ trên cơ chất mạt cưa cao su

Bảng 3.2. Tốc độ lan tơ của các chủng nấm bào ngư trên Petri và ống nghiệm mạt cưa

ST T	Chủng nấm	Tên loài	Tốc độ lan tơ trên Petri (mm ² /ngày)	Tốc độ lan tơ trên ống nghiệm (mm/ngày)
1	ABI-F000201	<i>P. ostreatus</i>	629,8 ^c ± 98,4	5,69 ^d ± 0,24
2	ABI-F000219	<i>P. ostreatus</i>	681,1 ^{de} ± 75,5	7,21 ^b ± 0,16
3	ABI-F000222	<i>P. ostreatus</i>	768,1 ^{bc} ± 44,0	7,04 ^{bc} ± 0,49
4	ABI-F000224	<i>P. ostreatus</i>	729,1 ^{cd} ± 45,5	7,11 ^b ± 0,53
5	ABI-F000241	<i>P. pulmonarius</i>	819,2 ^{ab} ± 20,8	7,08 ^b ± 0,28
6	ABI-F000252	<i>P. pulmonarius</i>	857,7 ^a ± 43,0	7,66 ^a ± 0,21
7	ABI-F000253	<i>P. pulmonarius</i>	781,3 ^{abc} ± 78,4	7,21 ^b ± 0,16
8	ABI-F000256	<i>P. pulmonarius</i>	722,5 ^{cd} ± 58,8	6,64 ^c ± 0,16
9	ABI-F000259	<i>P. pulmonarius</i>	716,4 ^{cd} ± 23,2	7,67 ^a ± 0,45
10	ABI-F000261	<i>P. pulmonarius</i>	841,2 ^{ab} ± 27,9	7,81 ^a ± 0,17

Kết quả cho thấy tốc độ lan tơ của 10 chủng nấm trên Petri môi trường mạt cưa có sự khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê (Bảng 3.2). Chủng có tốc độ lan nhanh nhất là ABI-F000252. Chủng có tốc độ lan tơ chậm nhất là ABI-F000201.

Trên ống nghiệm mạt cưa tốc độ lan tơ của các chủng cũng có sự khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê (Bảng 3.2). Chủng có tốc độ lan nhanh nhất là ABI-F000261 (chủng tự nhiên). Chủng có tốc độ lan tơ chậm nhất là ABI-F000201

3.2.3. Khảo sát tỉ lệ chuyển hóa

Tỉ lệ chuyển hóa trên môi trường YBLB có sự khác biệt giữa các chủng nghiên cứu (Bảng 3.3). Màu môi trường thay đổi từ xanh lá cây tới vàng. Tỉ lệ chuyển hóa của các chủng dao động từ 30,32% đến 79,65%.

Bảng 3.3. Tỉ lệ chuyển hóa trên môi trường YBLB của các chủng nấm bào ngư

STT	Chủng nấm	Tên loài	Tỉ lệ chuyển hóa (%)
1	ABI-F000201	<i>P. ostreatus</i>	36,75 ^{cd} ± 12,64
2	ABI-F000219	<i>P. ostreatus</i>	45,36 ^{bcd} ± 15,15
3	ABI-F000222	<i>P. ostreatus</i>	53,40 ^{bc} ± 7,85
4	ABI-F000224	<i>P. ostreatus</i>	51,79 ^{bc} ± 13,60
5	ABI-F000241	<i>P. pulmonarius</i>	30,32 ^d ± 20,90
6	ABI-F000252	<i>P. pulmonarius</i>	59,72 ^b ± 11,84
7	ABI-F000253	<i>P. pulmonarius</i>	49,79 ^{bc} ± 17,14
8	ABI-F000256	<i>P. pulmonarius</i>	79,65 ^a ± 8,46
9	ABI-F000259	<i>P. pulmonarius</i>	45,64 ^{bcd} ± 11,81
10	ABI-F000261	<i>P. pulmonarius</i>	39,48 ^{cd} ± 12,19

3.2.4. Khảo sát hiệu suất sinh học và mối tương quan giữa tốc độ lan tơ trên cơ chất mật cưa với hiệu suất sinh học các chủng nấm bào ngư

Bảng 3.4. Hiệu suất sinh học, một số chỉ tiêu sinh trưởng, tỉ lệ chuyển hóa và tốc độ thể tích sinh khối tơ trên mật cưa của các chủng thuộc loài *P. ostreatus*

ST T	Chủng nấm	Hiệu suất sinh học (%)	Thể tích sinh khối trên mật cưa (mm ³ /ngày)
1	ABI-F000201	38,03 ^c ± 4,55	3597,17 ^b ± 648,19
2	ABI-F000219	46,52 ^b ± 3,92	4910,34 ^a ± 533,00
3	ABI-F000222	46,05 ^b ± 5,63	5403,13 ^a ± 472,53
4	ABI-F000224	49,73 ^a ± 5,78	5185,73 ^a ± 556,21

Bảng 3.5. Hiệu suất sinh học, một số chỉ tiêu sinh trưởng, tỉ lệ chuyển hóa và tốc độ thể tích sinh khối tơ trên mặt cưa của các chủng thuộc loài *P. pulmonarius*

ST T	Chủng nấm	Hiệu suất sinh học (%)	Thể tích sinh khối trên mặt cưa (mm ³ /ngày)
1	ABI-F000241	19,22 ^b ± 0,76	5806,38 ^b ± 342,00
2	ABI-F000252	22,34 ^a ± 2,06	6572,75 ^a ± 471,48
3	ABI-F000253	17,96 ^b ± 3,35	5625,64 ^b ± 467,25
4	ABI-F000256	16,02 ^c ± 3,70	4801,10 ^c ± 459,50
5	ABI-F000259	14,29 ^d ± 3,35	5493,18 ^b ± 314,71
6	ABI-F000261	23,43 ^a ± 3,38	6570,30 ^a ± 235,89

Kết quả ở Bảng 3.4 cho thấy hiệu suất sinh học của các chủng thuộc loài *P. ostreatus* có khác biệt. BE cao nhất ghi nhận ở chủng ABI-F000224 là 49,73%, tiếp theo là các chủng ABI-F000219, ABI-F000222 có BE dao động từ 46,05%-46,52%. BE thấp nhất (38,03%) ghi nhận ở chủng ABI-F000201. Trong khi đó, thể tích tốc độ sinh khối của các chủng ABI-F000219, ABI-F000222 và ABI-F000224 tương đương nhau (4910,34 – 5403,13 mm³/ngày) và cao hơn so với chủng ABI-F000201 (3597,17 mm³/ngày).

Theo kết quả Bảng 3.5, các chủng thuộc loài *P. pulmonarius* có sự khác biệt ý nghĩa. BE của chủng ABI-F000261 có giá trị cao nhất là 23,43%, tiếp theo là các chủng ABI-F000252, ABI-F000241, ABI-F000253, ABI-F000256 với BE dao động từ 16,02% - 23,34%. Giá trị BE thấp nhất (14,29%) ghi nhận ở ABI-F000259. Mặt khác, thể tích tốc độ sinh khối của chủng ABI-F000261 và ABI-F000252 là cao nhất và thấp nhất là chủng ABI-F000259. Bên cạnh đó, giá trị thể tích tốc độ sinh khối của các chủng thuộc loài *P. pulmonarius* có thể chia làm 3 nhóm: cao (ABI-F000261, ABI-F000252), trung bình (ABI-

F000241, ABI-F000253) và thấp (ABI-F000256, ABI-F000259). Đặc biệt hơn, những chủng trong các nhóm này tương tự với thứ tự giảm của BE. Do vậy, có sự liên quan giữa hiệu suất sinh học và thể tích tốc độ sinh khối.

3.3. THU THẬP VÀ KHẢO SÁT MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC CỦA CÁC DÒNG ĐƠN BỘI

3.3.1. Thu thập và giữ giống các dòng đơn bội

3.3.1.1. Thu thập các dòng đơn bội

Kết quả thu nhận được 80 dòng đơn bội (mỗi chủng 20 dòng). Các dòng đơn bội có 4 dạng hình thái: dạng rễ, dạng bông, dạng vân đồng tâm và dạng dày đặc.

3.3.1.2. Giữ giống các dòng đơn bội

Các dòng đơn bội được nuôi cấy trong ống thạch nghiêng MYA và bảo quản ở nhiệt độ 4 °C.

3.3.2. Khảo sát sinh trưởng các dòng đơn bội trên môi trường dinh dưỡng

3.3.2.1. Khảo sát các dòng của chủng nấm ABI-F000241

Các dòng đơn bội của chủng ABI-F000241 có tốc độ lan tở khác nhau. Trung bình từ: 15,8 – 428,8 mm²/ngày. Dòng nhanh nhất: 36. Các dòng chậm nhất: 37, 60.

3.3.2.2. Khảo sát các dòng của chủng nấm ABI-F000252

Các dòng đơn bội của chủng ABI-F000252 có tốc độ lan tở khác nhau. Trung bình từ: 26,9 – 399,2 mm²/ngày. Dòng nhanh nhất: 15. Các dòng chậm nhất: 16, 24, 30, 43.

3.3.2.3. Khảo sát các dòng của chủng nấm ABI-F000253

Các dòng đơn bội của chủng ABI-F000253 có tốc độ lan tở khác nhau. Trung bình từ: 75,2 – 410,8 mm²/ngày. Các dòng nhanh nhất: 23, 36, 44, 45. Các dòng chậm nhất: 42, 54.

3.3.2.4. Khảo sát các dòng của chủng nấm ABI-F000224

Các dòng đơn bội của chủng ABI-F000224 có tốc độ lan tở khác nhau, trung bình từ: 2,7 – 50,7 mm²/ngày. Dòng nhanh nhất: 46, dòng chậm nhất: 49.

3.3.3. Khảo sát tỉ lệ chuyển hóa các dòng đơn bội

3.3.3.1. Khảo sát dòng đơn bội chủng nấm ABI-F000241

Các dòng đơn bội có tỉ lệ chuyển hóa khác nhau từ 11,23% - 89,54%, dòng cao nhất: 45, dòng thấp nhất: 36.

3.3.3.2. Khảo sát dòng đơn bội chủng nấm ABI-F000252

Các dòng đơn bội có tỉ lệ chuyển hóa khác nhau từ 19,72% - 87,02%. Dòng cao nhất: 24, dòng thấp nhất: 13.

3.3.3.3. Khảo sát dòng đơn bội chủng nấm ABI-F000253

Các dòng đơn bội có tỉ lệ chuyển hóa khác nhau từ 14,29% - 86,97%. Dòng cao nhất: 08, dòng thấp nhất: 47.

3.3.3.4. Khảo sát dòng đơn bội chủng nấm ABI-F000224

Các dòng đơn bội có tỉ lệ chuyển hóa khác nhau từ 8,83% - 81,63%. Dòng có cao nhất là 44, dòng thấp nhất là 14.

Các dòng đơn bội của các chủng nấm có tỉ lệ chuyển hóa cao hơn so với chủng song nhân bố mẹ. Tỉ lệ chuyển hóa của dòng đơn bội tương đối cao. Do vậy, các dòng này có thể sử dụng làm vật liệu trong nghiên cứu lai tạo giống nấm.

3.3.4. Xác định kiểu di truyền bắt cặp của các dòng đơn bội

3.3.4.1. Xác định kiểu bắt cặp riêng các chủng nấm

Phân nhóm chủng nấm ABI-F000241

Nhóm A1B1 có 3 dòng (số thứ tự: 01, 05, 08); A1B2 có 5 dòng (số thứ tự: 04, 20, 26, 37, 60); nhóm A2B1 có 5 dòng (số thứ tự: 13, 19, 23, 36, 45); nhóm A2B2 có 7 dòng (số thứ tự: 06, 09, 24, 33, 34, 43, 59).

Phân nhóm chủng nấm ABI-F000252

Nhóm A1B1 có 8 dòng (số thứ tự: 02, 04, 12, 13, 15, 20, 22, 24); A1B2 có 2 dòng (số thứ tự: 27, 29); nhóm A2B1 có 5 dòng (số thứ tự: 07, 09, 31, 39, 43); nhóm A2B2 có 5 dòng (số thứ tự: 16, 30, 34, 33, 36).

Phân nhóm chủng nấm ABI-F000253

Nhóm A1B1 có 5 dòng (số thứ tự: 04, 08, 09, 36, 54); nhóm A1B2 có 5 dòng (số thứ tự: 01, 20, 23, 24, 37); nhóm A2B1 có 6 dòng (số thứ tự: 16, 41, 42, 44, 47, 52); nhóm A2B2 có 4 dòng (số thứ tự: 13, 27, 45; 51).

Phân nhóm chủng nấm ABI-F000224

Nhóm A1B1 có 2 dòng (số thứ tự: 20; 42); nhóm A1B2 có 10 dòng (số thứ tự: 02; 05; 19; 35; 44; 47; 49; 54; 55; 62); nhóm A2B1 có 1 dòng (số thứ tự: 18). A2B2 có 7 dòng (số thứ tự: 14; 45; 46; 50; 60; 61; 64).

Các kết quả 4 chủng nấm bào ngư đều tuân theo qui tắc di truyền của các loài dị tản tứ cực.

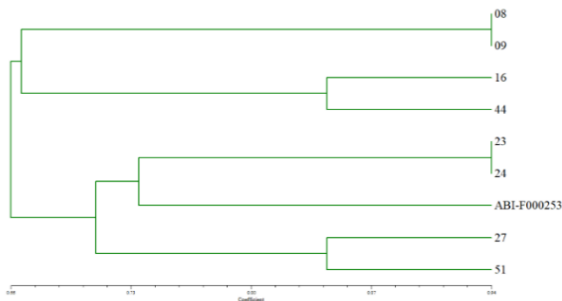
3.3.4.2. Lai chéo giữa các dòng đơn bội các chủng nấm bào ngư xám

Ba chủng nấm bào ngư thuộc loài *P. pulmonarius* có số alen của nhân tố A là 2; số alen của nhân tố B là 2. Do đó có thể 3 chủng này có cùng nguồn gốc giống ban đầu.

3.4. THỬ NGHIỆM PHÂN NHÓM KIỂU DI TRUYỀN BẮT CẶP CÁC DÒNG ĐƠN BỘI BẰNG MỘT SỐ MARKER SINH HỌC PHÂN TỬ

3.4.1. Phân tích đa dạng di truyền các dòng đơn bội bằng kỹ thuật AFLP

Có sự đa dạng di truyền cao của các dòng đơn bội nấm bào ngư thu thập được (hệ số tương đồng dao động từ 61–94%). Các dòng nấm cùng một kiểu di truyền bắt cặp có quan hệ di truyền gần nhau hơn so với các dòng khác kiểu di truyền bắt cặp. Mô hình cây phả hệ (Hình 3.3) chia các dòng đơn bội nấm làm 2 nhánh: nhánh 1 gồm các dòng có kiểu yếu tố di truyền bắt cặp là B1, nhánh 2 gồm các dòng có kiểu yếu tố di truyền bắt cặp là B2; kết quả AFLP giúp hỗ trợ khẳng định kết quả phân nhóm di truyền bắt cặp ở trên.

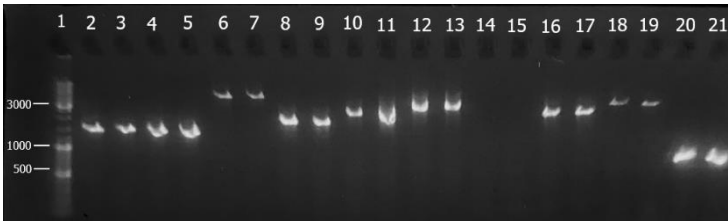


Hình 3.3. Cây UPGMA dựa trên đa dạng di truyền 4 marker AFLP các dòng đơn bội nấm bào ngư xám

3.4.2. Thử nghiệm phân nhóm kiểu di truyền bắt cặp các dòng đơn bội bằng một số cặp môi chuyên biệt của nấm đùi gà

Tái kiểm tra độ đặc hiệu của các cặp môi trên nấm đùi gà

Độ đặc hiệu của 10 cặp môi theo công bố của Ju và cs. (2020) được kiểm tra lại trên chủng nấm đùi gà thương mại. Kết quả thu nhận được sản phẩm PCR từ 9/10 cặp môi (Hình 3.4). Như vậy độ đặc hiệu của các cặp môi ổn định đối với nấm đùi gà.

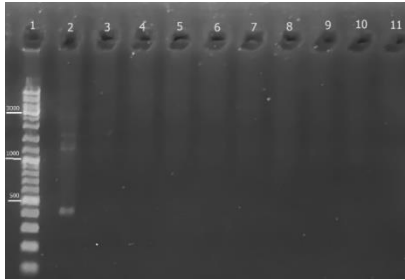


Hình 3.4. Kết quả điện di sản phẩm PCR của 10 cặp môi trên chủng nấm đùi gà (giếng 1: DNA marker, giếng 2, 3: môi số 1; giếng 4, 5: môi số 2; giếng 6, 7: môi số 3; giếng 8, 9: môi số 4; giếng 10, 11: môi số 5; giếng 12, 13: môi số 6; giếng 14, 15: môi số 7; giếng 16, 17: môi số 8; giếng 18, 19: môi số 9; giếng 20, 21: môi số 10)

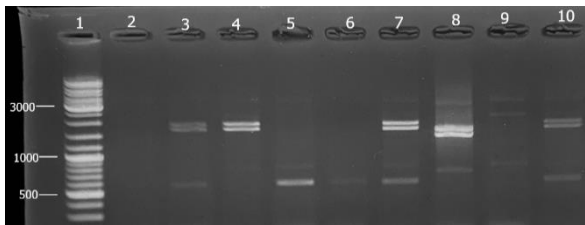
*Đánh giá khả năng áp dụng của các cặp môi với chủng nấm bào ngư xám *P. pulmonarius* trên dữ liệu sinh tin học*

Kết quả cho thấy không có đoạn trình tự phù hợp khi phân tích cả môi xuôi và môi ngược. Nếu chỉ phân tích từng môi xuôi và môi ngược cũng không có môi nào phù hợp 100% trình tự. Như vậy các cặp môi được sử dụng ở *P. eryngii* không đặc hiệu để khuếch đại đoạn trình tự chuyên biệt trên nấm *P. pulmonarius*. Kết quả chạy PCR thử nghiệm trên chủng song nhân ABI-F000253 và các dòng đơn bội cho

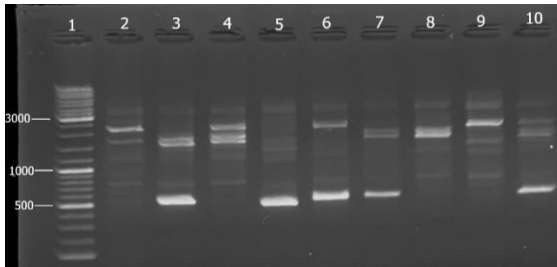
kết quả tương đồng với kết quả Blast, không có vạch điện di như mong muốn ở tất cả các cặp môi sử dụng (Hình 3.5-3.8).



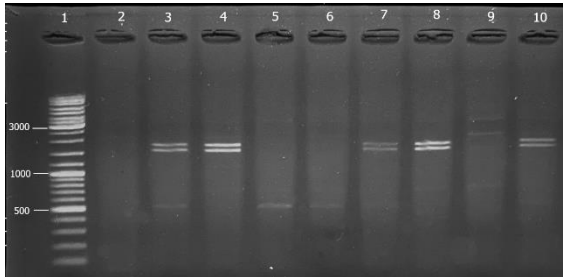
Hình 3.5. Kết quả điện di sản phẩm PCR của các cặp môi trên chủng nấm ABI-F000253 (giếng 1: DNA marker; giếng 2: môi số 1; giếng 3: môi số 2; giếng 4: môi số 3; giếng 5: môi số 4; giếng 6: môi số 5; giếng 7: môi số 6; giếng 8: môi số 7; giếng 9: môi số 8; giếng 10: môi số 9; giếng 11: môi số 10)



Hình 3.6. Kết quả điện di sản phẩm PCR của cặp môi số 1 ở nhiệt độ bắt cặp 60 °C trên các dòng đơn bội chủng nấm ABI-F000253 và chủng bố mẹ (giếng 1: DNA marker, giếng 2: dòng 08, giếng 3: dòng 09, giếng 4: dòng 23, giếng 5: dòng 24, giếng 6: dòng 16, giếng 7: dòng 44, giếng 8: dòng 27, giếng 9: dòng 51, giếng 10: chủng bố mẹ: ABI-F000253)



Hình 3.7. Kết quả điện di sản phẩm PCR của cặp mồi số 1 ở nhiệt độ bắt cặp 56 °C trên các dòng đơn bội chủng nấm ABI-F000253 và chủng bố mẹ



Hình 3.8. Kết quả điện di sản phẩm PCR của cặp mồi số 1 ở nhiệt độ bắt cặp 62 °C trên các dòng đơn bội chủng nấm ABI-F000253 và chủng bố mẹ

Chương 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1. KẾT LUẬN

- Đã xây dựng được bộ sưu tập chủng song nhân của các chủng nấm bào ngư thu thập tại các tỉnh phía nam. Trong đó bao gồm 10 chủng nấm bào ngư xám được định danh là loài *P. pulmonarius*, 4 chủng nấm bào ngư trắng được định danh là loài *P. ostreatus*, 1 chủng nấm bào ngư tiểu yến được định danh là loài *P. ostreatus*.
- Đã xác định được các đặc điểm sinh học của các chủng nấm bao gồm: tốc độ sinh trưởng trên môi trường PDA (184,5 – 886,6 mm²/ngày), sinh khối môi trường PDB (1,41 – 4,19 g/l), tốc độ lan tơ trên Petri mặt cưa (629,8 – 857,7 mm²/ngày), tốc độ lan tơ trên ống nghiệm mặt cưa (5,69 – 7,81 mm/ngày), tỉ lệ chuyển hóa trên môi trường YBLB (30,32 – 69,75%), hiệu suất sinh học trên giá thể mặt cưa (14,29 – 49,73%). Các chủng nấm trong bộ sưu tập có tiềm năng thương mại. Đặc biệt chủng nấm tự nhiên ABI-F00261 có nhiều đặc tính phù hợp để nuôi trồng.
- Đã xây dựng được bộ sưu tập 80 dòng đơn bội của 4 chủng nấm bào ngư. Các dòng đơn bội đã được xác định về đặc điểm sinh học và di truyền bắt cặp. Đồng thời đã xác định số alen của nhân tố A và B của 3 chủng bào ngư xám và dự đoán các chủng này có cùng nguồn gốc giống.
- Đã phân tích dữ liệu AFLP các dòng đơn bội chủng nấm bào ngư xám ABI-F000253 và thử nghiệm khả năng phân nhóm kiểu di truyền bắt cặp các dòng đơn bội của bằng một số cặp môi chuyên biệt.

4.2. KIẾN NGHỊ

- Tăng số lượng chủng nấm, điều chỉnh hình dạng và kích thước vật chứa trong thí nghiệm khảo sát sự tương quan giữa hiệu suất sinh học và tốc độ lan tơ trên mặt cưa.
- Thu nhận mẫu nấm bào ngư thương mại tại các khu vực địa lý xa hơn (miền trung, miền bắc), thu thập các mẫu nấm bào ngư tự nhiên để tăng độ đa dạng các alen xác định kiểu di truyền bắt cặp.
- Thử nghiệm khả năng hỗ trợ sàng lọc dòng đơn bội của nấm bào ngư xám bằng một số marker sinh học phân tử chuyên biệt khác.

NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

1. Lần đầu tiên đã cung cấp thông tin có liên quan về hình thái, đặc điểm sinh học, đặc điểm di truyền, sinh trưởng và phát triển của 10 chủng nấm bào ngư có tiềm năng thương mại thu thập tại các tỉnh phía nam.
2. Xây dựng bộ 80 dòng đơn bội của 4 chủng nấm bào ngư với các thông tin về di truyền bắt cặp và sinh trưởng.
3. Phân lập và đánh giá tiềm năng nuôi trồng của một chủng nấm bào ngư tự nhiên tại Lâm Đồng (ABI-F000261).

DANH MỤC CÁC BÀI BÁO ĐÃ XUẤT BẢN LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. **Pham, V. L.,** Pham, N. D. H., Nguyen, H. L. N., Nguyen, T. M. D., Nguyen, T. M. T., Nguyen, M. T., Nguyen, H. D. and Ho, B. T. Q. (2023). The relationship between mycelial growth and fruit body's yield of oyster mushrooms (*Pleurotus* spp.) collected from southern Vietnam. International Journal of Agricultural Technology, 19(1): 203-214.

2. **Pham, V. L.,** Pham, N. D. H., Nguyen, H. D., Le, T. H. and Ho, B. T. Q. (2023). Monokaryotic characteristics and mating types of phoenix mushroom (*Pleurotus pulmonarius*) cultivars in the south Vietnam. International Journal of Agricultural Technology, 19(1): 189-202.